

# Estrategias de Terapia Génica Aplicadas a Lesiones Agudas del Sistema Nervioso Central

Lic. María Luciana Negro Demontel



Orientador: Dr. Hugo Peluffo

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, UDELAR.

Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo.

# Resumen

Existe una gran variedad de vectores capaces de transferir ADN al sistema nervioso, capaces algunos de una expresión sostenida en el tiempo para la corrección de patologías crónicas, mientras que otros presentan una expresión transitoria más acorde al tratamiento de daños agudos.

Los vectores virales, aún siendo muy eficientes como vehículos de transferencia génica, presentan limitaciones entre las cuales cabe destacar la toxicidad e inmunogenicidad así como la posible mutagénesis insercional.

Los polipéptidos recombinantes modulares (o virus artificiales) fueron diseñados imitando características relevantes del ciclo de vida viral para optimizar la entrega de ADN en células blanco específicas. Su modo de acción se basa en la presencia de módulos funcionales específicos para la asociación y condensación del ADN (cola de poli-lisina K<sub>10</sub>), interacción con las integrinas de superficie celular (módulo RGD), escape endosomal (módulo poli-histidina H<sub>6</sub>) e importación nuclear (módulo NLS). Los vectores modulares han ido evolucionando en su función, y al día de hoy se encuentran varios prototipos ampliamente documentados para su uso como vectores de terapia génica. Los vectores HKRN y HNRK han sido el producto del perfeccionamiento en el diseño de vectores, generados tras la fusión directa de los dominios funcionales. Esto disminuye el tamaño del vector en comparación con su versión anterior NLSct, facilitando su captación celular. Estos vectores consisten en los 4 dominios biológicamente activos antes mencionados variando su disposición espacial. Si bien su acción ha sido documentada *in vitro*, aún no se encuentra caracterizada *in vivo*. Por otra parte no existe ningún estudio que compare este sistema de transfección versus la transducción mediada por lentivectores (LVs) en el sistema nervioso central (SNC) luego de una lesión aguda.

En el presente proyecto nos propusimos cuantificar la eficiencia, el potencial neuroprotector y los posibles efectos inmunogénicos o neurotóxicos de la transducción/transfección del SNC post traumático, con LVs de tercera generación (LVs 3G) versus vectores recombinantes modulares (NLSct, HNRK y HKRN). Se evaluaron estos parámetros utilizando modelos celulares *in vitro* y un modelo de trauma cerebral inducido por contusión cortical controlada en rata, y se compararon los resultados con el fin de seleccionar el vector más adecuado para la

transferencia génica tras una lesión aguda del SNC. Se analizaron los niveles de expresión del transgén GFP obtenidos tras los diferentes tratamientos, así como el desempeño sensitivo-motor y el perfil de expresión de IL1- $\beta$  a diferentes tiempos post lesión.

Fuimos capaces de comprobar que todos los sistemas utilizados en este estudio resultaron aptos para su utilización *in vivo* en lesiones agudas del SNC, induciendo una expresión de transgén biológicamente relevante en una ventana temporal adecuada para su utilización como agentes terapéuticos en dichas patologías, sin promover la activación de procesos inflamatorios importantes.

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Terapia génica</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Desarrollo de vectores</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Vectores virales</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3.1 Vectores Lentivirales</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.2 Lentivectores y SNC</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Vectores no-virales</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4.1 Vectores no-virales y vías para la transducción celular</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.2 Vectores modulares recombinantes “Virus artificiales”</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.3 Estrategias de producción de vectores recombinantes</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.4 Vectores recombinantes modulares para su utilización en el SNC</b> .....	<b>23</b>
<b>1.5 Lesiones agudas del SNC: Trauma encéfalo-craneano (TEC)</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5.1 Trauma e inflamación</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5.2 Epidemiología del trauma</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5.3 Modelos animales</b> .....	<b>31</b>
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Producción y Purificación de Lentivectores de Tercera Generación</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.1 Producción y purificación a mediana escala de plásmido libre de endotoxinas para la producción de vectores lentivirales</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.2 Puesta a punto de la producción y purificación de lentivectores de tercera generación</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.3 Producción de lentivectores de tercera generación a mediana escala</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.4 Titulación de los stocks lentivirales por citometría de flujo</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.5 Producción de lentivectores de tercera generación a gran escala</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 Transducción celular <i>in vitro</i> con lentivectores de tercera generación</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.1 Transducción de un cultivo de astrocitos aberrantes (ABAs)</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.2 Transducción de un cultivo de células HEK293T</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3 Puesta a punto de la producción y purificación del vector recombinante NLScT</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4 Producción, purificación y análisis de la eficiencia de los nano-vectores recombinantes HNRK y HKRN</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4.1 Producción y purificación de los nano-vectores recombinantes</b> .....	<b>41</b>

3.4.2	Detección de proteínas por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE).....	42
3.5	Análisis comparativo de la eficiencia de transducción celular de los distintos vectores de terapia génica <i>in vitro</i> .....	43
3.5.1	Optimización de la razón proteína/ADN para la transducción celular .....	43
3.5.2	Efecto trófico de los nano-vectores recombinantes.....	44
3.5.3	Efecto de la cloroquina y escape endosomal.....	44
3.5.4	Efecto del volumen de formación de complejos.....	44
3.5.5	Efecto de la presencia del suero en la transfección celular .....	45
3.6	Análisis comparativo de la eficiencia de transfección/transducción de los distintos vectores <i>in vivo</i> .....	45
3.6.1	Modelo de Trauma encéfalo-craneano (TEC) .....	45
3.6.2	Grupos experimentales y tratamiento post-traumático.....	46
3.6.3	Evaluación Funcional: Test de la cinta adhesiva (Sticky tape test).....	47
3.6.4	Obtención de muestras para ELISA y WB .....	47
3.6.5	Detección y cuantificación de proteínas GFP e IL1 $\beta$ por ELISA.....	48
3.6.6	Detección de proteínas por Western Blot (WB).....	48
3.6.7	Análisis estadísticos .....	49
4.	Resultados.....	50
4.1	Optimización del protocolo de producción y purificación de las partículas lentivirales de tercera generación. ....	50
4.1.1	Producción de LVs a pequeña escala.....	50
4.1.2	Producción de LVs a mediana escala.....	51
4.1.3	Producción de LVs a gran escala .....	53
4.1.4	Transducción de líneas celulares <i>in vitro</i> .....	54
4.2	Optimización del protocolo de producción y purificación de los vectores modulares recombinantes.....	55
4.2.1	Purificación del vector NLSct.....	55
4.2.2	Purificación de los nano-vectores HNRK y HKRN .....	56
4.3	Análisis y optimización de la eficiencia de la transfección <i>in vitro</i> de los nano-vectores recombinantes.....	59
4.3.1	Optimización de la relación proteína/ADN.....	59
4.3.2	Interacción con receptores de membrana y efecto neurotrófico.....	62
4.3.3	Ruta de escape endosomal.....	64
4.3.4	Efecto del volumen de formación de complejos vector/ADN.....	65
4.3.5	Efecto de la presencia de suero .....	65

4.3.6 Efecto de la liofilización.....	66
4.4 Análisis comparativo de los distintos vectores para la transducción del SNC <i>in vivo</i> , en un modelo de trauma encéfalo-craneano .....	66
4.4.1 Eficiencia de la transducción medida por la expresión de GFP .....	66
4.4.2 Detección de proteínas con dominio de histidina por Western Blot (WB) .....	67
4.4.3 Determinación y comparación del efecto neuroprotector de los distintos vectores .....	68
4.4.4 Comparación del efecto inmunogénico de los distintos vectores de terapia génica .....	69
5. Discusión .....	71
5.1 Desarrollo de distintos sistemas de vectores para transducción celular.....	71
5.2 Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transducción celular <i>in vitro</i> .....	71
5.3 Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transducción del SNC <i>in vivo</i> en un modelo de trauma encéfalo-craneano.....	74
6. Conclusiones.....	80
7. Comunicaciones científicas.....	81
8. Agradecimientos.....	82
9. Bibliografía .....	83

# 1. Introducción:

## 1.1 Terapia Génica

La introducción de genes al organismo, así como la regulación de la expresión de genes endógenos, ha emergido en la última década como una poderosa estrategia para el tratamiento o corrección de muchas patologías. La terapia génica se basa en la manipulación de la expresión de genes en las células somáticas, o de determinada población de células somáticas, ofreciendo una amplia gama de posibles tratamientos a enfermedades por adición o sobre-expresión de genes, alteración o corrección de genes defectuosos, y bloqueo de la expresión de determinados genes<sup>1; 2</sup>. Dependiendo del vector, el ADN terapéutico puede integrarse al ADN cromosómico de la célula huésped, o bien existir como vector episomal<sup>2; 3</sup>.

De las aproximaciones mencionadas anteriormente, la adición de genes es la más comúnmente aplicada en estudios clínicos y preclínicos; es utilizada para proveer un beneficio terapéutico o para administrar una proteína carente o no funcional debido a una mutación genética.

La estrategia menos frecuente es la corrección/alteración génica, la cual ha atraído mucha atención en los últimos años debido a los avances tecnológicos alcanzados. En este contexto, se ha visto que las tecnologías de recombinación del ADN en conjunto con nucleasas de dedos de zinc son utilizadas para alterar secuencias genómicas, con el fin de corregir o crear una mutación, por ejemplo una mutación en el receptor CCR5 puede hacer a las células resistentes a la infección por el virus del HIV<sup>4</sup>.

El silenciamiento génico es la herramienta más nueva en la modulación de la expresión de genes. Este se basa en la acción de moléculas de ARN de interferencia (ARNi). Los ARNi son moléculas cortas de ARN, de unos 20 a 25 nucleótidos, que se generan por fragmentación de precursores más largos. Por un lado, los siARN (del inglés *small interference ARN*) pueden ser inducidos por la administración de ARNs de doble cadena (ARNds) que posean complementariedad completa con el ARNm blanco. Al unirse con el mensajero complementario, catalizan su corte en dos mitades que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen de interés. Por otra parte, los miARNs (micro ARN) son ARNs pequeños similares pero con complementariedad imperfecta. En base al grado de complementariedad, estos o bien inhibirán o disminuirán la velocidad de traducción de los

genes blanco, o bien inducirán su degradación por una vía independiente del clivaje, con lo cual su acción puede ser revertida <sup>2</sup>.

Desórdenes genéticos o crónicos, así como inflamaciones agudas y procesos infecciosos pueden tratarse mediante aproximaciones de terapia génica. En este sentido, ensayos clínicos de terapia génica han mostrado éxito en pacientes con leucemia, hemofilia, inmunodeficiencia severa y ceguera causada por retinitis pigmentosa, entre otras patologías. Existen alrededor de 1800 de ensayos clínicos para tratar diferentes patologías <sup>5</sup>. Entre ellos podemos encontrar 36 ensayos en fase I, I/II y II utilizando diferentes vectores de terapia génica para tratar desórdenes del sistema nervioso central (SNC), como pacientes con enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o Alzheimer <sup>5-9</sup>. Sin embargo existen barreras importantes en la evolución de esta terapia como tratamiento seguro, entre ellas la falta de un método confiable para la introducción del material genético a una población de células blanco, que reduzca el riesgo de desarrollar efectos secundarios indeseados como toxicidad o inflamación <sup>10;11</sup>. Es por este motivo que la terapia génica continúa siendo un área muy activa de investigación. Asimismo, la terapia génica ha constituido una importante herramienta para la investigación y ha contribuido a la dilucidación de muchos de los mecanismos que desencadenan procesos fisiológicos y patológicos.

## 1.2 Desarrollo de Vectores

Una de las preguntas cruciales y más complejas es cómo estos ácidos nucleicos terapéuticos pueden ser introducidos a una población de células específicas *in vivo* de manera segura y eficiente. Ya que las moléculas de ADN o ARN son muy inestables y no poseen la capacidad de introducirse a células específicas por si mismas, necesitan ser transportadas por vehículos que las estabilicen y les confieran propiedades de unión a receptores de membrana <sup>12</sup>. Dado la diversidad de situaciones patológicas o experimentales, la selección del tipo de vector ideal es clave debiendo evaluarse sus características particulares como se comenta a continuación.

El éxito de un vector radica primariamente en su capacidad de ser incorporado al tejido de interés para promover la expresión de niveles terapéuticos del transgén, siendo administrado al organismo de manera sistémica o localizada. La distribución del vector luego de la administración está influenciada por muchos parámetros, incluyendo el suministro vascular y



las barreras endoteliales a un órgano particular, el tamaño del vector, las interacciones entre el ligando del vector y el receptor de la célula huésped, las interacciones con componentes tisulares o sanguíneos, y la posible fagocitosis por parte del sistema macrofágico distribuido por todo el organismo <sup>2</sup>.

Para algunos vectores, las moléculas exógenas de ADN pueden existir como un episoma, que se perderá durante las sucesivas divisiones celulares. Sin embargo, los vectores episomales pueden persistir de por vida en roedores y por muchos años en animales más grandes si fueron transferidos a tejidos relativamente quiescentes como cerebro, hígado, músculo o corazón. Dentro de este tipo de vectores se encuentran los vectores adeno-asociados recombinantes (AAVr) <sup>13</sup>, los baculovirus <sup>14</sup> y los lentivirus no integrativos <sup>3;15</sup>. Los vectores que se integran en los cromosomas de las células huésped son mejores candidatos cuando el blanco son tejidos con un mayor recambio celular (como por ejemplo las células hematopoyéticas), aunque poseen la desventaja de la posible activación o interrupción de los genes vecinos por mutagénesis insercional <sup>16</sup>.

La duración de la expresión del transgén debe coincidir con el período de tiempo requerido para tratar la patología específica. En muchos casos, las enfermedades genéticas producidas por la falta de una proteína particular requieren de una expresión estable del transgén de por vida. Sin embargo, para el tratamiento de enfermedades agudas o desórdenes adquiridos como trauma, infecciones o cáncer, se requieren períodos limitados de expresión ya que la expresión estable de una proteína terapéutica puede ser nociva. Asimismo, se ha visto que niveles excesivos de expresión de un transgén pueden resultar contraproducentes, por ejemplo el efecto de la sobre-expresión de factores tróficos como el GDNF (del inglés *glial cell-derived neurotrophic factor*) o BDNF (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) mediada por el vector AAVr se torna tóxica cuando altos niveles de expresión son mantenidos por tiempos prolongados <sup>17;18</sup>.

Otro punto clave a tener en cuenta en la selección del vector ideal para una situación concreta es que algunos vectores no transducen células postmitóticas como neuronas o fibras musculares, lo cual representa una desventaja si lo que se busca es introducir genes en dichas células, pero sirve de ventaja a la hora de tratar células transformadas <sup>19</sup>.

La activación de la respuesta inmune del huésped representa una de las mayores barreras para el éxito de la terapia génica, la cual puede ser dirigida contra el producto del transgén o contra partículas del vector <sup>11</sup>. Posiblemente, el mayor obstáculo radique en la incapacidad para

predecir tanto la respuesta inmune innata como la dependiente de antígeno en los seres humanos, algunas de las cuales actualmente no pueden ser reproducidas en modelos animales <sup>2</sup>. Si bien la inmunogenicidad representa en la mayoría de los casos un efecto secundario indeseado, ésta es una propiedad muy importante para el tratamiento de tumores, ya que contribuye con su eliminación.

El riesgo de seguridad biológica, tanto para el paciente como para el operario, es otro punto importante a tener en cuenta en el desarrollo de vectores de terapia génica. En las últimas décadas se ha explorado el desarrollo de un vector capaz de transferir ácidos nucleicos a distintos blancos celulares de manera más efectiva y disminuyendo los riesgos biológicos. Sin embargo hasta el momento no contamos con “el vector ideal” , capaz de adecuarse a todas las necesidades o aplicaciones, ya que éstas pueden ser muy diferentes y a veces contradictorias <sup>19; 20</sup>.

Esto conduce a la necesidad de desarrollar diversos tipos de vectores para abordar distintas situaciones terapéuticas o experimentales, y en particular desarrollar vectores maleables y versátiles, capaces de ser utilizados en distintas aplicaciones <sup>19</sup>.

Tradicionalmente, los sistemas de transferencia de ADN a las células se han dividido entre vectores virales y no virales.

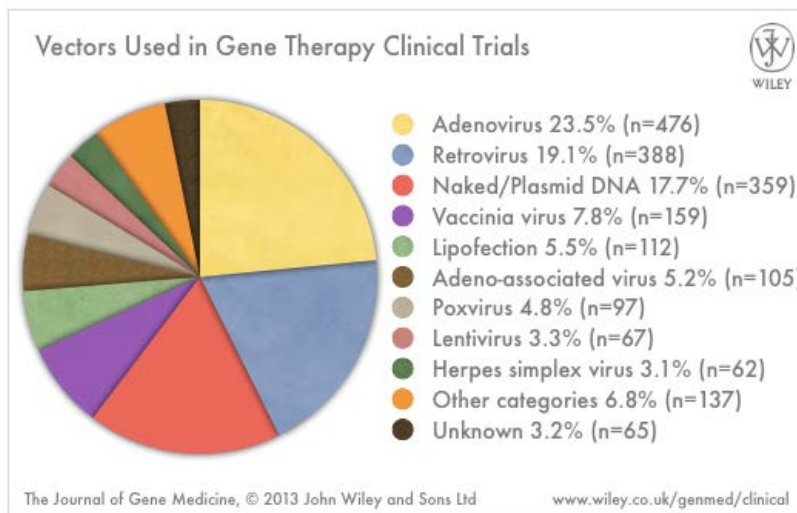
### 1.3 Vectores virales

Los vectores virales son los más efectivos debido a que han sido evolutivamente seleccionados para este propósito. Éstos han desarrollado mecanismos para sobrevivir en el ambiente extracelular, adherirse a las células, atravesar membranas, utilizar los sistemas celulares de transporte e incorporar sus genes en el compartimiento celular indicado, ya sea citosol o núcleo <sup>21</sup>.

Un virus puede ser considerado como una cápsula lipoproteica que contiene ADN o ARN, capaz de entregar su material genético al núcleo de la célula infectada. Desde este punto de vista, el éxito evolutivo de los virus puede ser aprovechado para la entrega de drogas a poblaciones celulares de interés. El concepto de convertir un virus en un vehículo o un vector de entrega de

genes ha sido extensamente investigado desde hace más de tres décadas. Los vectores virales son utilizados de rutina como herramientas para el estudio de la función genética, así como para el desarrollo pre-clínico de terapias basadas en genes para una variedad de enfermedades <sup>8</sup>, habiéndose aprobado un único vector viral para su comercialización y utilización en la clínica en julio de 2012. Este consiste en un vector derivado del virus adeno-asociado (AAV) cuyo nombre comercial es Glybera<sup>®</sup>, y se utiliza para el tratamiento de la deficiencia de la lipoproteína lipasa (LPLD) <sup>22; 23</sup>.

En este contexto, muchas especies de virus pertenecientes a distintas familias (esencialmente Adenovirus, Parvovirus, Poxvirus y Retrovirus) han sido modificadas para su utilización como vectores para la transferencia génica, y muchos han sido aprobados en ensayos clínicos en los últimos 20 años (Fig. 1.1). Asimismo, existen 19 ensayos clínicos en proceso de finalización o completados, que utilizan vectores adeno-asociados o vectores lentivirales para tratar enfermedades del SNC <sup>8</sup>.



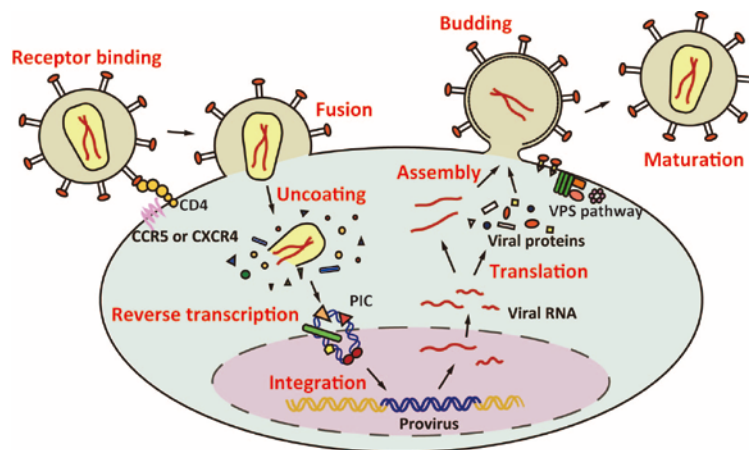
**Figura 1.1:**Tipos de vectores de terapia génica utilizados en ensayos clínicos (Tomado de Ginn 2012, <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Sin embargo, la administración de esos transportadores virales posee ciertos riesgos biológicos como la generación de procesos oncogénicos por mutagénesis insercional o procesos inflamatorios por inmunogenicidad <sup>1; 12; 20; 21</sup>; habiéndose documentado dos casos de muerte de pacientes sometidos a ensayos clínicos con AAV <sup>10; 24; 25</sup> así como el desarrollo de procesos oncogénicos de pacientes de SCID-X1 luego de ser tratados con retrovirus <sup>16; 26</sup>.



proteínas de la matriz (MA) forman una capa por fuera de la cápside que interactúa con la envoltura, una bicapa lipídica derivada de la membrana de la célula huésped que envuelve a la partícula viral<sup>31; 32</sup>. Anclada a esta bicapa se encuentran las glicoproteínas de la envoltura viral (Env), responsables del reconocimiento específico de receptores en la célula huésped que inician el proceso infeccioso. Las proteínas de la envoltura viral están formadas por dos subunidades; la subunidad transmembrana (TM), que sirve de anclaje a la membrana lipídica, y la superficial (SU) la cual se une a los receptores celulares

Luego de la transducción de las células blanco, los LVs transfieren su ARN genómico con el fin de generar una partícula proviral de ADN lineal de doble cadena, la cual se integra al genoma celular (Fig. 1.3). Estos son capaces de entregar cantidades significativas de ADN en el núcleo de la célula huésped y poseen como ventaja frente a otros vectores virales su capacidad de transducir células no replicativas<sup>30</sup>.



**Figura 1.3: Representación esquemática de la replicación del retrovirus HIV-1.** El virus entra a las células huésped mediante la unión a los receptores en la superficie celular. El virus se replica en el citoplasma y el núcleo de la célula huésped. La retrotranscripción y la síntesis de ADN viral produce un complejo de nucleoproteínas llamado PIC, el cual media la integración del genoma viral en el genoma celular. Los componentes de las proteínas virales, los componentes son ensamblados para producir los nuevos viriones. (Tomado de Suzuki et al., 2011). Los LVs han evolucionado en los últimos años, siendo una y popular el uso como vehículos moleculares especializados para la introducción de transgenes en una amplia variedad de células replicativas y quiescentes, con un gran tropismo celular adquirido por la pseudotipificación con otras proteínas de superficie<sup>30; 33-35</sup>.

Existen muchos tipos de LVs, pero los más comúnmente utilizados son los derivados del Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV1), dada su elevada eficiencia de transferencia génica y su habilidad para mediar una expresión de transgen estable y duradera<sup>11; 30; 36; 37</sup>.

El uso del virus HIV como origen de este sistema de vectores es muy controversial debido a la naturaleza patogénica del virus en su estado salvaje. Es por este motivo que se deben tomar grandes precauciones a la hora de generar partículas lentivirales. Con este fin se utiliza un sistema deficiente en replicación y se eliminan los genes necesarios para la autopropagación.

Además de lo anterior, se excluyen del empaquetamiento los genes infectivos asociados con posibles patologías como el factor de infectividad del virión (*vif*), la proteína viral r (*vpr*), la proteína viral u (*vpu*), *tat* y *nef* <sup>11; 20; 38</sup>.

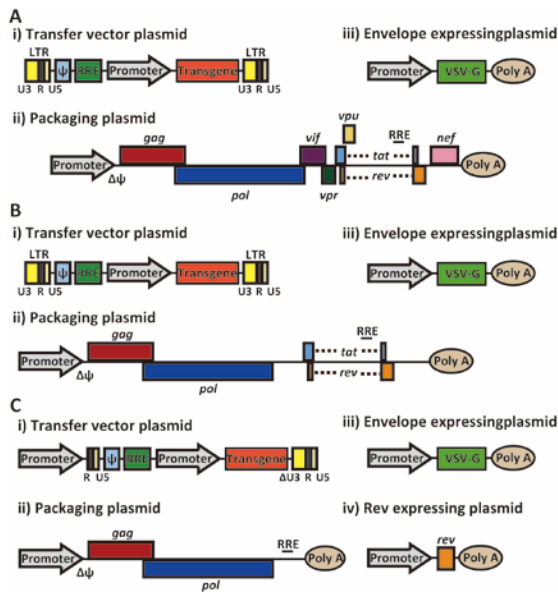
Las proteínas Tat (del inglés "*Trans-Activator of Transcription*") y Rev (del inglés "*Regulator of expression of Virion proteins*") regulan los niveles de la expresión génica del HIV a nivel transcripcional y postranscripcional respectivamente. Debido a la débil actividad transcripcional basal de los LTRs (del inglés "*long terminal repeats*") del HIV, la expresión del provirus inicialmente resulta en cantidades pequeñas de transcritos codificantes para Tat, Rev y Nef. Tat aumenta drásticamente la transcripción del HIV por unirse a un elemento de respuesta a la transactivación (TAR) en el ARN naciente, reclutando un complejo de kinasa-ciclina que estimula la elongación transcripcional mediada por el complejo de la polimerasa II. Una vez que Rev alcanza una concentración umbral, promueve la acumulación citoplasmática de transcritos virales que dan lugar a las proteínas virales tardías. Rev acompaña este efecto sirviendo de conector entre un motivo del ARN (RRE, elemento de respuesta a Rev) encontrado en la región que codifica para la envoltura del transcripto de HIV, y componentes de la maquinaria celular de exportación del núcleo. Los genes estructurales se expresan únicamente en presencia de Tat y Rev, cuando se producen partículas virales nuevas.

Tres generaciones de LVs basados en HIV-1 han sido establecidas, basándose en los niveles de bioseguridad de la producción viral <sup>39</sup>.

En una **primera generación** de vectores derivados de HIV, las partículas virales eran generadas por la expresión de las proteínas del core, enzimas y factores accesorios del virus HIV-1 junto con una proteína de envoltura perteneciente a un virus diferente (casi siempre la proteína G del virus de estomatitis vesicular VSV-G) en un plásmido separado (sistema de dos plásmidos) (Figura 1.4 A).

En una **segunda generación** del sistema de lentivectores (Figura 1.4 B), el componente de empaquetamiento fue reducido a los genes *gag*, *pol*, *tat*, y *rev* del HIV-1. En ambos casos, el propio vector lleva las secuencias en *cis* necesarias para la transcripción, encapsidación, transcripción reversa e integración del genoma viral. En el diseño de este sistema, las partículas virales son producidas por la co-transfección de tres plásmidos en las células productoras, y los niveles significantes de transcripción ocurren únicamente en presencia de Tat y Rev <sup>38</sup>.

Los LVs de **tercera generación (3G)** (Fig. 1.4 C) fueron desarrollados por el grupo de Naldini y colaboradores <sup>38</sup> para disminuir los riesgos biológicos que conlleva el uso de los vectores derivados del HIV. Ellos demostraron que la función en trans de la proteína Tat no era necesaria, si parte del LTR corriente arriba en el vector de transferencia era reemplazado por promotores constitutivamente activos.



**Figura 1.4: Esquema representativo de las construcciones lentivirales derivadas de HIV-1.** Las partículas lentivirales de primera generación (A) son producidas por tres plásmidos separados que codifican para el genoma del vector HIV-1 excepto para los genes *env*, y la proteína Env (VSV-G). Para reducir el riesgo potencial de la generación de virus competentes en replicación se remueven o se mutan todos los genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) en los plásmidos de empaquetamiento, en una segunda generación de vectores lentivirales (B). En la tercera generación de vectores lentivirales, la unidad activadora/promotora es eliminada de la región 3'LTR (ΔU3) en los plásmidos de transferencia. Asimismo, la región U3 del 5'LTR es reemplazada por el promotor del CMV, habilitando la producción de vectores lentivirales independientes de Tat. LTR (*long terminal repeats*); ψ, señal de empaquetamiento; RRE; elemento de respuesta a Rev. Tomada de Suzuki *et al.* 2011.

La expresión de *rev* en trans permite la producción de títulos elevados de vectores derivados de HIV a partir de una construcción que contiene únicamente *gag* y *pol*. Para asegurar la producción de partículas lentivirales defectivas en replicación, su genoma es dividido en cuatro plásmidos independientes que separan a los componentes necesarios para el empaquetamiento de los LVs (*gag-pol*, *env*, *rev* y el casete del vector), lo cual minimiza la posibilidad de ocurrencia de eventos espontáneos de recombinación homóloga y hace que la expresión de las funciones de empaquetamiento ocurra únicamente en el marco de las células productoras. El sistema de transferencia de genes de tercera generación resultante conserva solo tres de los nueve genes del HIV-1 y se basa en la co-transfección de cuatro unidades transcripcionales separadas para la producción de partículas virales, lo cual ofrece ventajas significativas de bioseguridad frente a las versiones anteriores, ya que hace posible la generación de partículas deficientes en replicación, sin alterar su habilidad de transducción celular <sup>11; 33; 38-40</sup>.

El uso de lentivectores de tercera generación se extiende a la clínica así como a la investigación básica y permite el análisis de sobre-expresión o inhibición de la expresión de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos vectores son capaces de mediar una expresión estable a largo plazo *in vivo* en diversos órganos y tejidos incluyendo SNC<sup>33; 35; 37</sup>, hígado<sup>11</sup>, bazo y médula ósea<sup>20</sup>. Aplicaciones comunes para los vectores lentivirales incluyen la restauración de genes funcionales en estudios de terapia génica, el silenciamiento de genes mediante la introducción de siRNA<sup>2; 41</sup> y la generación de animales transgénicos<sup>30</sup> entre otros. Una variante de estos vectores son los LVs no integrativos<sup>15</sup> los cuales poseen mutaciones en la secuencia que codifica para la integrasa, haciéndolos defectivos en la integración al genoma de la célula huésped. Estos mostraron tener una gran capacidad de transducción tanto *in vitro* como *in vivo*, igualando los niveles de expresión alcanzados por su contraparte integrativa y evitando la posible ocurrencia de procesos oncogénicos<sup>3; 15</sup>.

### 1.3.2 Lentivectores y SNC

La transducción eficiente de neuronas *in vivo* fue demostrada por Naldini *et al.* en 1996, en una primera publicación en donde se describía un sistema de vectores basado en el virus de inmunodeficiencia humana de tipo I (HIV-1)<sup>35</sup>. A partir de este descubrimiento, múltiples reportes han descrito el uso de vectores lentivirales como medio de transferencia de ADN al SNC con propósitos tanto terapéuticos como experimentales.

Estos vectores son considerados herramientas muy atractivas para la transferencia de material genético al SNC debido a muchas de sus características funcionales y estructurales. Son bien tolerados por el individuo luego de una inyección intracerebral y proveen de una expresión del transgén sustancial y estable, por períodos de tiempo extendidos debido a la inserción preferencial en sitios activos del genoma<sup>30; 35; 42</sup>; son capaces de transducir las células postmitóticas del cerebro<sup>33; 35; 43</sup>; poseen una baja tasa de ocurrencia de eventos de recombinación homóloga y generación de virus replicativos; existe la posibilidad de expandir el alcance de células huésped mediante la pseudotipación de las partículas virales con una gran variedad de proteínas de envoltura<sup>44</sup>, por ejemplo cuando son pseudotipados con la proteína G del virus de stomatitis vesicular (VSV-G) son capaces de transducir una amplia gama de células incluyendo neuronas adultas y células gliales del sistema nervioso central<sup>30; 33; 37; 45; 46</sup>; poseen una gran capacidad de acomodación genética con la posibilidad de incorporar casetes



de expresión muy complejos en su genoma (secuencias entre 10 y 12 kb)<sup>30; 35; 42</sup>. Los LVs han demostrado ser capaces de transducir la mayoría de los tipos celulares del SNC *in vivo*, incluyendo neuronas, astrocitos, células madre neuronales, oligodendrocitos y células de gliomas<sup>33; 35; 42; 43</sup>.

Dichos vectores han mostrado un gran potencial neuroprotector para el tratamiento de diversas neuropatologías espinales, como por ejemplo rescatando motoneuronas en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) de ratón, mediante el silenciamiento de genes involucrados en la misma por sobre-expresión de ARNsh<sup>47; 48</sup>. Asimismo, la sobre-expresión del receptor del ácido retinoico  $\beta 2$  en neuronas corticales induce una elevada regeneración y recuperación funcional en un modelo de lesión espinal en rata<sup>49</sup>. La Neuroprotección mediada por vectores lentivirales puede ser alcanzada por inyección directa en la médula espinal<sup>47</sup> así como por inyección intramuscular de lentivirus pseudotipados con la proteína G del virus de la rabia, la cual es específica para motoneuronas espinales debido al transporte retrógrado a partir de sus células blanco<sup>48</sup>. Por otro lado, éstos son capaces de mediar la expresión génica en células de la sustancia blanca normal o desmielinizante (microglía, astrogía, oligodendrocitos y progenitores de oligodendrocitos) sin generar grandes procesos inflamatorios<sup>28; 50</sup>.

Parte de las limitaciones del uso de LVs en ensayos clínicos es la falta de metodologías capaces de producir títulos elevados de partículas virales, a pesar del avance en el desarrollo de células productoras<sup>20; 34</sup>. Es por este motivo que se han desarrollado diferentes protocolos con el fin de aumentar los títulos obtenidos en la producción de partículas virales<sup>34; 51; 52</sup>. Ellis y colaboradores observaron que la adición de cafeína al medio de producción de los LVs es capaz de aumentar el título lentiviral de 3 a 8 veces en comparación con el control. Las condiciones para la obtención de títulos óptimos se basan en la adición al medio de 2-4 mM de cafeína, transcurridas 17 horas de la transfección de las células productoras, y durante las primeras 48 horas de producción. Esto aumenta el número de partículas virales intactas, así como la eficiencia de empaquetamiento de las partículas virales, estableciendo una manera simple y económica de aumentar el título viral de manera eficiente. Se estima que este aumento se deba al efecto inhibitorio que posee la cafeína frente a ciertas proteínas de señalización vinculadas a las vías de reparación del ADN de doble hebra, como por ejemplo la DNA-PKcs (subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN)<sup>34</sup>.

## 1.4 Vectores no virales

Los vectores virales, aún siendo muy eficientes como vehículos de transferencia génica, pueden presentar algunas limitaciones, entre las cuales cabe destacar la toxicidad e inmunogenicidad, así como la posible mutagénesis insercional <sup>11; 16; 26</sup>. Teniendo en cuenta esto, los vectores no virales ofrecen una alternativa atractiva por la simplicidad de su uso, su fácil producción a gran escala y la disminución de respuestas inmunológicas específicas intensas.

Es por este motivo que en las últimas décadas se han desarrollado vectores no virales mediante la combinación de ciertas propiedades necesarias para la transducción celular. Los sistemas no virales de transferencia de material genético consisten en la generación de complejos de ADN con moléculas cargadas positivamente (como polímeros, péptidos, lípidos o combinaciones de estos). Dichos complejos son de tamaño pequeño (entre 40 y 150 nm) y poseen usualmente una carga neta positiva, lo cual les permite su adsorción a la superficie celular y su posterior internalización.

Estas alternativas “no virales” ofrecen ventajas frente al uso de vectores virales ya que poseen un menor riesgo de citotoxicidad e inmunogenicidad, así como por su fácil bioproducción, preparación y uso. Sin embargo resultan menos eficientes que sus contrapartes virales a la hora de transferir el material genético a las células blanco (Tabla 1.1) <sup>1; 19; 21; 53</sup>.

### 1.4.1 Vectores no virales y vías para la transducción celular

La primera generación de vectores no virales de terapia génica fue publicada hace más de cuatro décadas <sup>54</sup>. Este estudio demostró que la transducción de ADN exógeno en células eucariotas puede ser promovida por la condensación del ADN con proteínas básicas como protaminas o histonas.

Además de proteínas naturales, otras estructuras policatiónicas pueden ser utilizadas para la condensación del ADN como algunos péptidos sintéticos (poli-lisina) <sup>55; 56</sup>, polímeros como la polietiliminina (PEI) <sup>57</sup> o el polietilenglicol (PEG) <sup>58</sup>, así como cationes lipídicos como por ejemplo el DOTAP <sup>59</sup>. Debido a su pequeño tamaño y su carga superficial neta positiva, estos complejos son incorporados por las células de manera eficiente <sup>1; 12; 19; 21; 56</sup>.

La selectividad de estos complejos por células o tejidos específicos se puede alcanzar entre otros con el acoplamiento de factores de crecimiento, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a la superficie de los complejos de ADN<sup>60</sup>. Esto no solo ofrece selectividad celular, sino que estimula la endocitosis mediada por receptor de los complejos de ADN<sup>1</sup>. Otra manera de posicionar los vectores en una cierta área blanco, es a través del desarrollo de nanopartículas magnéticas que funcionan como transportadores de ADN, y la posterior aplicación de un campo magnético local<sup>19; 61</sup>.

Sin embargo, a pesar de la eficiente incorporación del material genético por parte de las células, la eficiencia de transducción de los vectores no virales de primera generación es muy baja en comparación con la de los vectores virales. Esto se debe a los impedimentos fisicoquímicos que encuentran los vectores antes de que el ADN entre al núcleo. Luego de la endocitosis de los complejos, gran parte de ellos va hacia la ruta lisosomal. La degradación de ADN en endolisosomas constituye una de las mayores barreras para la transferencia genética mediada por dichos vectores.

Los complejos que logran escapar del compartimiento endolisosomal hacia el citoplasma celular, se encuentran en éste con barreras metabólicas y de difusión que reducen en gran parte el número de plásmidos que llega al núcleo. El citoplasma está compuesto por una red de microfilamentos y microtúbulos, que junto con un alto contenido proteico, limitan la difusión de macromoléculas y partículas de gran tamaño. La baja movilidad y la presencia de nucleasas citoplasmáticas representa un gran obstáculo para la transferencia génica eficiente<sup>1; 62</sup>.

La envoltura nuclear es el último filtro para la entrega del material genético al núcleo celular. La translocación del ADN al núcleo celular requiere del desensamblaje de la envoltura nuclear o bien del transporte activo mediado por los complejos del poro nuclear. Estos complejos permiten el pasaje libre de moléculas pequeñas de aproximadamente 40 kDa. Las moléculas de mayor tamaño serán activamente transportadas, únicamente si poseen una secuencia peptídica que señalice para la localización nuclear (NLS)<sup>1; 62; 63</sup>. El ADN plasmídico es muy grande para entrar al núcleo por difusión pasiva, y no posee secuencias de localización nuclear, por lo que su eficiencia de ingreso al núcleo es muy baja<sup>1</sup>. Un estudio comparativo de la eficiencia de transfección de cantidades similares de ADN plasmídico inyectado en el citosol o en el núcleo celular, muestra que solo el 0.1-0.001% del ADN citosólico alcanza el núcleo de forma intacta<sup>64</sup>.

Estas son algunas de las dificultades que se deben tener en cuenta en el desafío de desarrollar

un vector no viral eficiente, que iguale o exceda su contraparte viral pero más seguro de utilizar, con tropismo celular, no inmunogénico y relativamente económico para su producción a escalas que permitan su uso en la clínica.

El diseño y la preparación de dicho vector no es fácil y requiere de la integración de múltiples características diferentes en una misma partícula. Estas moléculas deben ser estables e inertes durante el transporte en el organismo, pero capaces de localizar sus células blanco desencadenando una cascada de eventos que eventualmente conduzcan a la entrega del ADN asociado en el núcleo celular. La creación de un sistema funcional de transferencia de ADN con estas características se basa en la manipulación y ensamblaje de estructuras moleculares en una misma partícula proteica multifuncional o “virus artificial”<sup>21</sup>.

#### 1.4.2 Vectores modulares recombinantes o “Virus Artificiales”

Los vectores modulares recombinantes o virus artificiales son proteínas multifuncionales cuyo diseño se basa en la unión de módulos peptídicos funcionales, estableciendo los primeros prototipos de vectores recombinantes de terapia génica (Figura 1.5)<sup>21; 56; 65-71</sup>. La combinación de dominios funcionales en un único polipéptido es una aproximación simple que ha demostrado tener éxito en el diseño de vectores recombinantes de terapia génica, promoviendo niveles significativos de transgén in vitro<sup>66; 67; 72-75</sup> así como mediando efectos terapéuticos in vivo<sup>68; 76-79</sup>. Estas proteínas recombinantes modulares fueron diseñadas para optimizar la transferencia de ADN en células blanco específicas, asegurando la expresión de genes de interés en células de mamífero sin producir procesos oncogénicos<sup>66; 68; 76</sup>, lo cual resulta en una aproximación probablemente adecuada para su aplicación en la clínica.

En el diseño de sistemas artificiales de transferencia de ADN se toman en cuenta ciertas características de los virus, que les confieren la capacidad de ingresar a las células huésped y transportar sus genomas desde la superficie celular hacia el citoplasma o núcleo<sup>1; 56; 80</sup>. Para infectar, los virus primero deben acoplarse a moléculas de la superficie celular. Algunas de estas sirven únicamente como factores que concentran a los virus en la superficie celular, mientras que otras son receptores de membrana, capaces de mediar la endocitosis<sup>80</sup>. Las proteínas de la base pentona de muchos tipos de adenovirus poseen las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) para la unión a integrinas<sup>81</sup>. La unión a integrinas de membrana dispara la endocitosis mediada por receptor de las partículas virales.

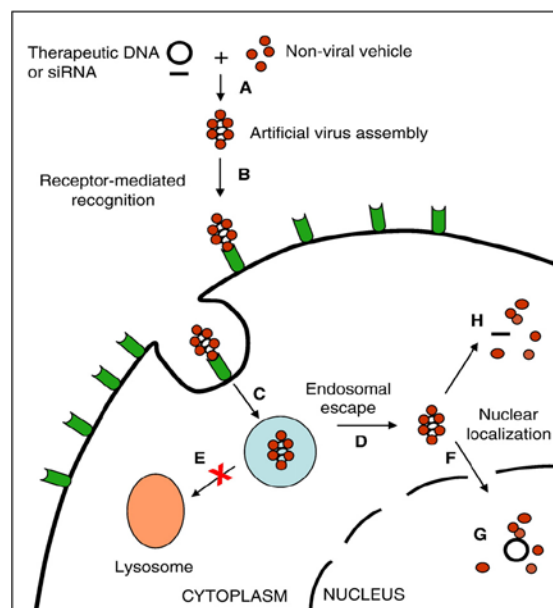
### **Estrategias de anclaje celular**

Muchos dominios de proteínas conocidas y azúcares han sido utilizados con este fin en el diseño de vectores modulares, entre ellas la galactosa<sup>82</sup>, la transferrina<sup>83</sup>, el dominio RGD de interacción con integrinas del virus de la aftosa (FMDV del inglés "*foot-and-mouth disease virus*")<sup>67; 72; 84</sup>, el factor de crecimiento nervioso NGF (del inglés "*nerve growth factor*")<sup>85; 86</sup>, la glicoproteína del virus de la rabia<sup>87</sup> y la neurotensina<sup>88</sup>. En un estudio *in vivo* realizado en el 2006<sup>89</sup>, se vio que el uso de un vector recombinante que contiene el dominio de neurotensina fue capaz de transducir con alta especificidad a un grupo de neuronas de la sustancia nigra, positivas para el receptor de dicha proteína, mientras que el resto permanecía intacto. El acoplamiento del dominio RGD de la proteína VP1 de FMDV a la enzima  $\beta$ -Gal recombinante es capaz de mediar la unión celular e internalización de dicha proteína activa en células de mamífero que contengan los receptores de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_1$ <sup>70; 71</sup>. Una de las ventajas principales de utilizar la endocitosis para ingresar a las células, es que les permiten viajar libremente dentro del citoplasma, ya que las vesículas endocíticas están diseñadas para atravesar las barreras impuestas por el citoesqueleto cortical y el citoplasma estructurado, y en el caso de las neuronas, éstas pueden determinar el transporte retrógrado hacia el soma.

### **Estrategias de escape endosomal**

Una vez dentro de las células, los virus deben lograr escapar de los endosomas, con el fin de evadir la degradación lisosomal. Es por este motivo que las partículas virales que ingresan a las células por la vía endocítica están equipados con distintas estrategias para escapar de dichos compartimientos celulares<sup>1; 80; 81</sup>. Este es un paso limitante para la transferencia del material genético mediada por receptor, ya que el vector necesita acceso al citoplasma para entrar al núcleo celular. Los péptidos ricos en histidina han sido ampliamente utilizados en el diseño de drogas por su capacidad de disrupción y escape endosomal<sup>90; 91</sup> así como por su capacidad de condensación del ADN<sup>91</sup> y por su función en la purificación de proteínas recombinantes en un solo paso mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)<sup>92</sup>. Durante el tráfico intracelular, muchas de las rutas de captación convergen en vesículas endocíticas, donde ambos, el vehículo y su carga, pueden ser enzimáticamente degradados cuando los endosomas tardíos son transformados en lisosomas<sup>93</sup>. Dentro de los endosomas, el grupo imidazol de la histidina, que posee un pK de alrededor de 6.0, se protona bajo las condiciones ácidas crecientes. Este paso recluta iones  $\text{Cl}^-$  al interior del endosoma, lo cual conlleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana endosomal, inducido por la acidificación del medio<sup>94</sup>. Esto genera un aumento de volumen y consecuente ruptura de los

endosomas, lo que resulta en la liberación de las nanopartículas al citoplasma, evitando de esta manera la degradación mediada por las enzimas lisosomales<sup>90</sup>. Está documentado que los vehículos no virales de terapia génica que poseen dominios de poli-histidinas inducen una expresión del transgén ampliamente mayor que aquellos que no lo poseen<sup>90; 95</sup>. Estos dominios permanecen neutros a pH fisiológico, lo que evita la unión inespecífica con proteínas séricas y la consecuente inactivación de la partícula<sup>94</sup>.



**Figura 1.5: Representación esquemática de los mecanismos de penetración y tráfico intracelular de los virus artificiales en la célula blanco.** El material de empaquetamiento condensa los ácidos nucleicos de manera reversible in vitro (A). El nano-complejo resultante reconoce receptores específicos en la membrana celular y es internalizado mediante endocitosis (B). Una vez localizado en los endosomas tempranos (C), el virus artificial escapa de la ruta endosomal (D) y de la consecuente degradación lisosomal (E). Finalmente, el nano-complejo penetra en el núcleo celular (F) y promueve la expresión del transgén (G). Para la entrega de ARNs, las señales de localización nuclear están ausentes y los ácidos nucleicos son liberados en el citoplasma (H). Tomado de Saccaardo *et al.* 2009.

### Estrategias de entrada al núcleo

Muchos virus pueden traspasar sus genomas activamente hacia el núcleo celular a través de los poros nucleares. Los virus utilizan señales de localización nuclear (NLS) que forman complejos con receptores solubles llamados importinas, para transferir su material genético al núcleo a través del poro nuclear<sup>96; 97</sup>.

Los niveles de expresión de transgén obtenidos luego de una inyección de ADN plasmídico al citoplasma o núcleo celular, muestran que la doble membrana nuclear y sus poros son importantes barreras para el ADN desnudo<sup>98</sup> ya que a este nivel ocurre la selección de macromoléculas que serán transportadas activamente al núcleo. Las proteínas del complejo

del poro reconocen a las importinas unidas a secuencias de localización nuclear cortas, compuestas en general por 4-8 aminoácidos cargados positivamente (generalmente son ricas en lisina, arginina y prolina)<sup>99</sup>.

La secuencia NLS del antígeno T del virus de simio SV40 fue la primera en ser identificada (PKKKRKV)<sup>100</sup> y ha sido ampliamente utilizada en el diseño de vectores proteicos modulares<sup>84; 101</sup>. Los péptidos sintéticos que contienen dicha secuencia son capaces de mediar el transporte hacia el núcleo cuando son conjugados con una proteína no nuclear, como la inmunoglobulina G (IgG) o la seroalbúmina bovina (BSA)<sup>102; 103</sup>. Asimismo, los vectores modulares que poseen este dominio son capaces de mediar el transporte de un transgén al núcleo en el SNC *in vivo*, tras su inyección intracerebral luego de una lesión excitotóxica<sup>76</sup>. Estos péptidos por otra parte, cuando se disponen en forma tetramérica, son capaces de condensar el ADN sin perder sus propiedades de localización nuclear<sup>104</sup>.

#### **Estrategias de desensamblaje del vector**

La liberación de los ácidos nucleicos una vez dentro del núcleo representa otro paso importante para la expresión eficiente de transgenes. Muchos estudios indican la posible estimulación de la liberación del ADN de los complejos por las condiciones reductoras de la célula. Por ejemplo, los polipéptidos ricos en histidina son capaces de liberar el ADN del complejo, cuando son expuestos al agente reductor dithiothreitol (DTT), lo cual sugiere un mecanismo similar en el interior celular<sup>91</sup>

#### **1.4.3 Estrategias de producción de vectores recombinantes**

Tres métodos generales se han utilizado para el desarrollo de este tipo de vectores: La producción de proteínas recombinantes por fusión directa de los dominios funcionales<sup>72</sup>; La producción de proteínas recombinantes combinando el esqueleto de una proteína con varios dominios funcionales insertados en regiones expuestas de dicho esqueleto<sup>67; 84</sup>; y la conjugación química de dominios funcionales y proteínas, por ejemplo mediante la generación de reacciones covalentes entre diferentes motivos proteicos purificados o por tecnologías basadas en la afinidad avidina-biotina<sup>105</sup>. Muchos de estos vectores pueden ser producidos de manera estable y reproducible, por lo que pueden ser utilizados en la clínica para la formulación de drogas.

La naturaleza modular de estas construcciones permiten la selección y combinación de distintas funciones de interés utilizando péptidos relevantes identificados, así como su fácil

rediseño para la optimización de sus funciones<sup>12; 72</sup>. Asimismo, su naturaleza modular permite la combinación de diferentes dominios para enfrentar los requerimientos de diferentes situaciones patológicas y experimentales<sup>19</sup>. Esta capacidad moldeable y adaptable es una de las principales ventajas de este tipo de vectores, y lo que permite su potencial utilización en un amplio espectro de patologías. El uso de un polipéptido recombinante que contiene los módulos necesarios para la transferencia del ADN, de fácil bioproducción y purificación ha sido un paso importante para el desarrollo de vectores no virales para terapia génica<sup>66; 67</sup>.

**Tabla 1.1: Vectores para la entrega de ADN.** Cuadro comparativo de las propiedades de los distintos vectores utilizados en terapia génica; virales versus no virales. Modificado de Mastrobattista *et al.* 2005

	<b>Vectores virales</b>	<b>No virales</b>
<b>Pros</b>	Eficientes en transferencia genética	No infecciosos Económicos y sencillos de producir/purificar Sin límites de acomodación de ADN
<b>Contras</b>	Potencialmente infecciosos, inmunogénicos oncogénicos. Costosos en producción y purificación	No muy eficientes en transferencia genética

#### 1.4.4 Vectores recombinantes modulares para su utilización en el SNC

Se han desarrollado una gran variedad de vectores capaces de transferir DNA al sistema nervioso, capaces algunos de una expresión sostenida en el tiempo para la corrección de la patologías crónicas, mientras que otros median una expresión transitoria, acorde al tratamiento de daños agudos.

La barrera hemato-encefálica (BHE) restringe la entrada de proteínas y drogas potenciales a los tejidos nerviosos. Como la mayoría de las drogas son incapaces de atravesar la BHE, existen pocos tratamientos disponibles para el tratamiento de la mayorías de las afecciones del SNC<sup>106</sup>. Esta es una barrera adicional a las que hemos comentado para la terapia génica. En el diseño de vectores recombinantes modulares se utilizan frecuentemente péptidos capaces de conferir al vector la habilidad para atravesar la BHE y transferir su carga al SNC<sup>106; 107</sup>, aunque se trata de una tecnología que todavía necesita perfeccionarse.

Siguiendo un orden cronológico, la búsqueda de un vector modular capaz de mediar la entrega de moléculas complejas de ADN al núcleo celular y mediar la expresión de un transgén llevó al diseño de varios tipos de vectores, los cuales fueron mejorando su eficiencia en cada versión.

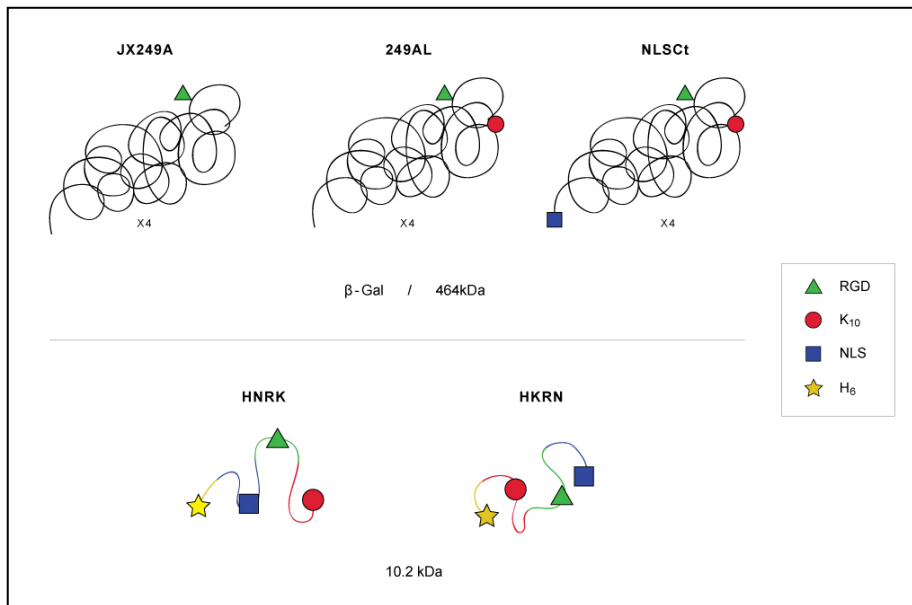
El laboratorio del Dr. Antoni Villaverde (Grupo de Microbiología Aplicada de la Universidad



Autónoma de Barcelona), pionero en esta temática, desarrolló uno de los primeros prototipos de vector recombinante, adicionando un motivo de unión a integrinas de membrana (RGD) al esqueleto de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa de *E. coli*, el JX249A (Fig. 1.6) <sup>71</sup>. Este segmento peptídico media la unión selectiva de la enzima quimérica activa con la superficie de distintas líneas celulares de mamífero, a través de los receptores de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_1$  <sup>70</sup>. El mismo promueve la internalización de la enzima al citoplasma celular, donde permanece transitoriamente activa <sup>71</sup>. Asimismo, la presencia de una secuencia NLS localizada naturalmente en la enzima bacteriana es capaz de mediar la entrada al núcleo de esta proteína <sup>100; 108</sup>. Esta construcción fue posteriormente modificada por ingeniería genética, adicionando en su cola amino terminal un motivo de unión y condensación del ADN, el péptido K<sub>10</sub> de polilisina, resultando en el vector denominado 294AL (Fig. 1.6). La adición de este motivo, mejoró de manera significativa la eficiencia de expresión del transgén en comparación con otros vectores <sup>66</sup>. Este vector es capaz de transferir el transgén al cerebro intacto y lesionado, sin generar una reacción inflamatoria aguda detectable o la activación del sistema inmune <sup>68</sup>.

El vector modular NLSCt (Fig. 1.6), desarrollado posteriormente por el grupo del Dr. Antoni Villaverde, surge de la adición del motivo NLS del antígeno T del virus SV40 en la región N-terminal del vector 249AL <sup>66</sup>. De esta forma, en el vector NLSCt, cada subunidad de la proteína tetramérica carrier  $\beta$ -Galactosidasa posee una cola de polilisinas K<sub>10</sub> con propiedades de condensación y unión al ADN, un motivo NLS y un dominio RGD con propiedades de unión e internalización celular <sup>84</sup>.

El esqueleto de la  $\beta$ -Galactosidasa provee de ventajas a la hora de planificar los sitios de agregado de dominios expuestos, para la purificación del vector y para la cuantificación de la concentración de la proteína quimérica. La presencia de dicha enzima bacteriana permite la purificación del vector mediante cromatografía de afinidad en un solo paso, así como su detección y cuantificación mediante ensayos enzimáticos simples. También es posible detectar este vehículo mediante el uso de anticuerpos anti- $\beta$ -Galactosidasa <sup>65</sup>.



Este vector ha mostrado una gran capacidad de transducción celular *in vivo* <sup>68; 77; 79; 109</sup>; la

Figura 1-65 Esquema representativo de la evolución de los vectores modulares. En el esquema se representa la mejora en el diseño de los vectores recombinantes del grupo de Villaverde a lo largo del tiempo, comenzando con vectores de gran tamaño, derivados de modificaciones al esqueleto de la  $\beta$ -Galactosidasa: JX249A con la adición de un dominio RGD del FMDV para la interacción con proteínas de membrana; 249AL, al que se le suma un dominio de poli-lisinas K<sub>10</sub> para la interacción inespecífica con el ADN; NLSct, al que se le adiciona un dominio NLS del Antígeno T del SV40 de localización nuclear. Estos dominios son adicionados a cada uno de los 4 monómeros que conforman el homotetramero de 464kDa de la  $\beta$ -Gal. Por otra parte, los vectores HNRK y HKRN fueron diseñados para mejorar la captación celular disminuyendo su tamaño (10.2kDa). Estos constan de los 3 dominios antes mencionados, y un dominio para el escape endosomal y purificación por IMAC (H), unidos entre sí por la secuencia de dos aminoácidos que representan un sitio de restricción y variando su disposición espacial.

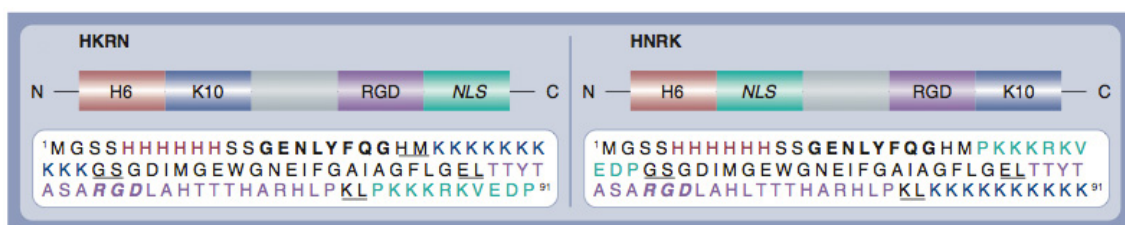
Una consideración importante a la hora de tratar muchas lesiones agudas del SNC es la corta ventana terapéutica con la que se cuenta. En este contexto, un efecto trófico o funcional directo del vector *per se* puede aumentar dicha ventana, dando tiempo a que se inicie la expresión del transgén neuroprotector. En este sentido, el vector NLSct resulta efectivo, no solo para la transducción celular *in vivo* <sup>76; 77</sup>, sino que también funciona como un importante factor neuroprotector luego de una lesión excitotóxica. El efecto neuroprotector observado luego de una lesión aguda del SNC utilizando este vector, es mediado parcialmente por la sobre-expresión del transgén, pero también de manera muy notoria por la presencia del motivo RGD <sup>76; 78</sup>. En este diseño experimental, la inyección directa del vector en el área lesionada del cerebro fue llevada a cabo 4 horas luego de provocada la lesión excitotóxica, lo cual acerca este paradigma experimental a su posible utilización clínica, dado que es muy difícil lograr el tratamiento de un paciente con una lesión aguda del SNC antes de ese tiempo. El SNC es un tejido que tolera muy mal las injurias debido a su alta dependencia del flujo sanguíneo y consumo de oxígeno, así como por su baja capacidad de regeneración. Esto determina que la ventana terapéutica para el tratamiento de lesiones agudas sea muy breve. Sin embargo, el vector NLSct para la sobre-expresión tanto de la enzima antioxidante Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD) <sup>76</sup>, como del receptor inmune CD300f <sup>77</sup>, es capaz de mediar efectos neuroprotectores.

La función neuroprotectora de los dominios RGD está asociada con efectos importantes de las células gliales, incluyendo un aumento del número de microglía/macrófagos luego de una lesión excitotóxica del cerebro postnatal, así como la dependencia glial para la neuroprotección *in vitro*. La activación o inhibición de integrinas particulares puede modular la respuesta glial e inflamatoria luego de una injuria al sistema nervioso <sup>78</sup>. Por otra parte, los péptidos RGD pueden actuar directamente en células neuronales, al inducir la expresión de neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 y el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) o sus receptores TrkB y TrkC <sup>110</sup>. Es por esto que el motivo RGD es de especial interés en el diseño de vectores modulares para el sistema nervioso.

Dado que el “esqueleto” del vector NLSct es la proteína β-Galactosidasa de E. Coli, éste posee un gran tamaño y puede resultar levemente inmunogénico. Se estima que éste vector conjugado al ADN se dispone en filamentos de 100-200 nm de largo por 20-40 nm de diámetro aunque estas medidas se basan en la similitud existente entre este vector y su versión anterior 249AL <sup>19; 67</sup>.

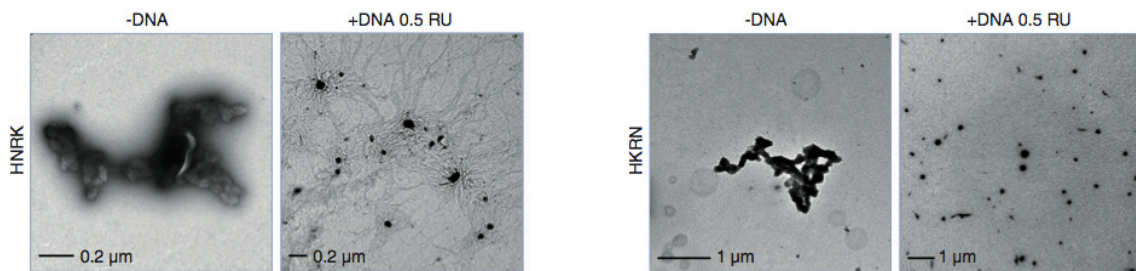
A partir de los datos acumulados en los últimos años por nuestro grupo en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Antoni Villaverde, y con el objetivo de mejorar el sistema de introducción de transgenes a las células del sistema nervioso, surge el impulso de desarrollar un péptido de menor tamaño, con una mayor eficiencia para la transferencia del material genético en las células blanco, con potencial neuroprotector y que resulte menos inmunogénico.

Con este fin, se desarrollaron dos versiones diferentes de vehículos recombinantes modulares, los nano-vectores HKRN y HNRK (Fig. 1.6, 1.7). Estos consisten en pequeños péptidos de 10.2 kDa y 91 aminoácidos, basados en combinaciones alternativas de los tres dominios funcionales antes mencionados RGD, NLS y K<sub>10</sub> y un dominio de poli-Histidinas H<sub>6</sub> adicionado para el escape endosomal y purificación por IMAC. Estos cuatro dominios se encuentran unidos por la secuencia de dos aminoácidos que representan un sitio de restricción (Fig. 1.7) y funcionan como bloques para la construcción de estos nano-vectores, los cuales logran promover niveles de expresión de transgén significativos en células en cultivo <sup>72</sup>. La región central de la proteína es biológicamente irrelevante.



En ausencia de ADN, los bloques proteicos en solución tienden a agregarse, organizándose como entidades amorfas y polidispersas, las cuales llegan a alcanzar un tamaño de hasta 1  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, en presencia de ADN, los complejos resultantes proteína-ADN se reorganizan, resultando en nanopartículas esféricas y ordenadas, de aproximadamente 80 nm de diámetro (Fig. 1.8), capaces de penetrar a las células por la interacción de su dominio RGD con las integrinas de membrana. La organización mediada por el ADN genera un patrón arquitectónico óptimo para la utilización de estos vectores como vehículos de terapia génica<sup>72</sup>

El análisis estructural de estas proteínas muestra una conformación molecular predominante de hélices alfa.



**Figura 1.8: Tamaño y morfología de las proteínas HNRK y HKRN.** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de las proteínas HNRK y HKRN en solución (-DNA) o formando complejos con ADNp (+DNA). Tomado de [Estos vectores, si bien resultan efectivos, pueden aún mejorarse tanto a nivel de eficiencia de transducción como de producción del transgén y especificidad celular. Además su capacidad de transfección \*in vivo\* no ha sido ensayada, y es de fundamental importancia para determinar los tres comportamientos clave de un vector de terapia génica: nivel de expresión del transgén, tiempo durante el cual se expresa, y efectos adversos inflamatorios/inmunogénicos.](#)

## 1.5 Lesiones agudas del SNC: Trauma Encéfalo-craneano

El trauma encéfalo-craneano (TEC) es caracterizado por una lesión en el cerebro, resultado de una fuerza externa como un violento impacto en la cabeza, la cual causa la ruptura mecánica

inmediata del tejido nervioso, y junto con eventos patogénicos retardados (secundarios), median colectivamente un proceso de neurodegeneración progresiva <sup>111; 112</sup>.

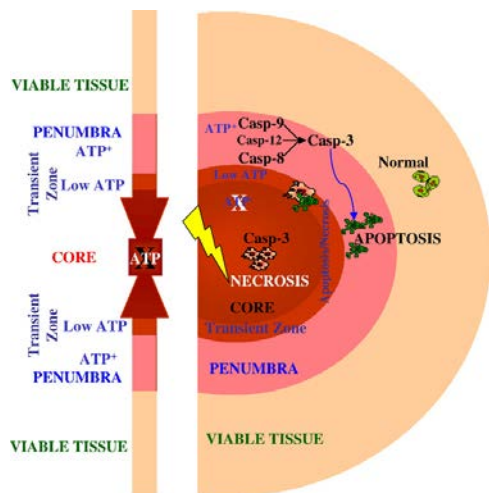
Muchos de los mecanismos desencadenados por la lesión traumática incluyen alteración de la barrera hemato-encefálica (BHE), edema cerebral, aumento de presión intracraneana, alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral, alteraciones iónicas y metabólicas, apoptosis de las células nerviosas, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros <sup>113; 114</sup>. Distintos tipos celulares se encuentran involucrados en estos procesos en el SNC incluyendo la microglía, astrogliá, células endoteliales, neuronas y células leucocitarias que son reclutadas al SNC <sup>115</sup>.

El daño primario del tejido nervioso puede ser difuso o focal. El daño causado directamente por un impacto en la cabeza es considerado focal, y resulta en una contusión cortical, daño vascular, hemorragias e isquemia <sup>116</sup>. En los daños focales, se establecen dos zonas de lesión en función espacio-temporal: una zona temprana o núcleo de la lesión y otra adyacente más tardía y periférica, llamada penumbra <sup>114</sup>.

El núcleo de la lesión consiste en células necróticas o apoptóticas muriendo rápidamente debido al trauma y/o al entorno hipóxico/isquémico. Este último generado a causa del daño en la perfusión cerebral y la oxigenación, la respuesta excitotóxica y la oclusión microvascular focal <sup>117; 118</sup>. Los cambios neuropatológicos en el núcleo de la lesión ocurren muy rápidamente, determinando una zona muy difícil de rescatar. A nivel macroscópico, el daño incluye la ruptura de los tractos de sustancia blanca, contusiones focales, hematomas extra e intracerebrales y un aumento de volumen encefálico difuso. A nivel celular, los eventos tempranos del trauma incluyen microporación de membranas, pérdida de iones y cambios conformacionales en proteínas <sup>114</sup>.

La zona de lesión secundaria o penumbra es donde el tejido nervioso se encuentra menos seriamente comprometido (Fig. 1.9). En esta zona ocurren cambios más graduales y progresivos que llevan a una muerte celular predominantemente de tipo apoptótica.

La lesión secundaria que ocurre en la zona de penumbra se desarrolla al cabo de horas a días de ocurrida la lesión, y comprende complejos mecanismos fisiopatológicos, bioquímicos y estructurales que se desencadenan luego de la injuria primaria. Esta se ve afectada por la liberación de neurotransmisores, generación de ROS, liberación de calcio, activación génica, disfunción mitocondrial y activación de la respuesta inflamatoria <sup>114</sup>.



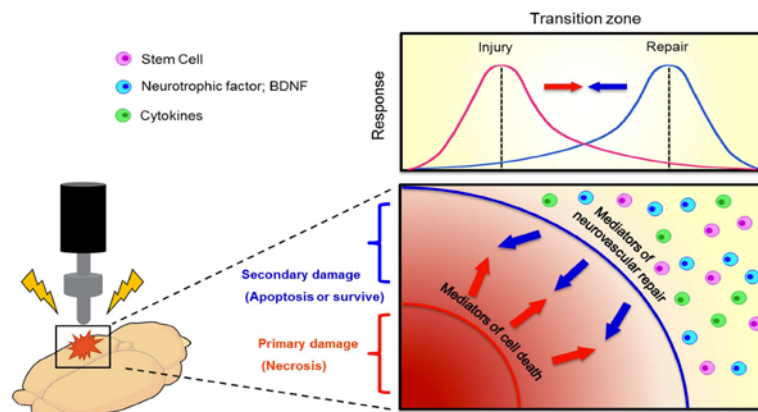
**Figura 1.9: Daño cerebral durante la isquemia.** En la figura se representan las distintas regiones que se definen luego de una lesión cerebral de tipo focal: La región central o núcleo, representa zona donde las células sufren necrosis. La región que rodea al núcleo es llamada penumbra, un sitio de muerte celular retardada (de tipo apoptótica) debido entre otras cosas a la disponibilidad de ATP. Una zona de transición entre el centro de la lesión y la penumbra se mezcla con el flujo sanguíneo cerebral no es restaurado a tiempo. Esta zona puede ser rescatada cuando se trata en una ventana temporal adecuada. La penumbra se encuentra rodeada por una región de tejido viable. (Tomado de Mehta et al, 2007)

### 1.5.1 Trauma e inflamación

La respuesta inflamatoria es un componente importante del TEC, particularmente tras lesiones hemorrágicas o contusiones. Esta respuesta se genera con el fin de preservar la integridad del

tejido, sin embargo, un desbalance en la respuesta inmune post traumática puede generar consecuencias nocivas. La respuesta inflamatoria está regulada por mediadores solubles y receptores de membrana. En términos generales, luego de una lesión inicial son inducidos secuencialmente mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, los cuales llevan a la resolución posterior del proceso reparativo tisular y de la respuesta inflamatoria en sí. Asimismo, las señales inflamatorias juegan un papel importante en la regeneración.

Distintas citoquinas son liberadas desde células microgliales, astrocitos y células polimorfonucleares, a pocas horas de producido el trauma. Esto conduce a la apertura de la BHE, muerte celular mediada por el complemento y apoptosis. Este proceso inflamatorio, si bien es necesario para limpiar los restos celulares luego de una injuria, cuando es producido en exceso puede resultar deletéreo. Las cascadas de respuestas inflamatorias inducidas tras la injuria primaria, determinan en conjunto la patogénesis de la lesión secundaria (Fig. 1.10). Es por este motivo que los procesos inflamatorios y sus mecanismos son de vital importancia para la determinación del daño histopatológico y neurológico/funcional final del individuo <sup>119</sup>.



**Figura 1.10: Evolución de la zona de penumbra luego del TEC.** El tejido nervioso que rodea la zona de impacto del TEC (penumbra) puede volverse vulnerable a la muerte celular debido a la ola expansiva de mediadores pro-inflamatorios. La penumbra comprende la zona de transición entre daño y reparación tisular (gráfico superior). Existe una ventana terapéutica para los procesos de reparación, con el fin de frenar la progresión de la lesión. Cuando las células nerviosas enfrentan un daño, sufren dos tipos de muerte celular, la primaria (necrosis) y la

El balance de la expresión de citoquinas determina el destino de las neuronas lesionadas hacia mecanismos de supervivencia o muerte celular. La sobre-expresión de factores neurotróficos y citoquinas luego de producida una lesión determina la neuroprotección de la etapa inicial, mientras que la caída en la expresión de los factores neurotróficos en conjunto con el aumento continuo de citoquinas pro-inflamatorias, el estrés oxidativo, el edema masivo y la alteración en la función de neurotransmisores endógenos, promueven la neurodegeneración característica de las etapas crónicas del TEC <sup>111</sup>. Es por este motivo que dichas moléculas son consideradas blancos terapéuticos prometedores, ya que juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inflamatoria y en los procesos degenerativos y reparadores desencadenados tras la injuria <sup>79; 120-122</sup>. El desvío del perfil de expresión de citoquinas hacia una fase pro-supervivencia (citoquinas anti-inflamatorias) podría incrementar la neuroprotección y regeneración del SNC luego de un TEC <sup>111</sup>. Asimismo, un aumento de citoquinas pro-inflamatorias derivado de la inducción de la inflamación por la administración de un vector de terapia génica puede potenciar el daño secundario, por lo cual este efecto debe ser minimizado <sup>123</sup>.

### 1.5.2 Epidemiología del trauma

El TEC continúa siendo la causa principal de muerte e invalidez de los países industrializados <sup>116; 124</sup> y un problema creciente en los países en desarrollo <sup>116; 125; 126</sup>.

Este constituye un importante problema de salud pública nuestro país ya que afecta a individuos más jóvenes que otras enfermedades, con lo cual es la principal entidad causante de años de vida productiva potencialmente perdidos, con un promedio de 28,8 años por muerte traumática <sup>127; 128</sup>.

Cabe destacar que en el 60% de los casos de muerte, ésta ocurre en el lugar del trauma y el otro 40% a nivel hospitalario; de los que llegan a hospitalizarse, alrededor de un 30% muere en las primeras 24 horas y el resto en el correr del mes post trauma <sup>129</sup>.

Las estadísticas internacionales con respecto al TEC muestran datos interesantes. Sólo en EEUU anualmente 1,5 millones de personas sufren un TEC, 50.000 de los cuales fallece en la etapa aguda y 80.000 permanece con defectos neurológicos a largo plazo <sup>130</sup>.

Los tratamientos se focalizan en la interrupción o inhibición de las cascadas de eventos de la injuria secundaria ya que la muerte celular resultante del impacto inicial en el tejido nervioso es inmediata e irreversible. Asimismo, la lesión secundaria al ser más lenta y progresiva, ofrece opciones terapéuticas y una ventana temporal que permite actuar para revertir o frenar el daño. No obstante, a la fecha no existe ningún tratamiento neuroprotector efectivo <sup>131-135</sup>.

Numerosos fármacos han sido administrados a animales de experimentación obteniendo resultados exitosos a nivel de recuperación funcional, histológica y bioquímica del tejido nervioso. Sin embargo, estos han fracasado en los ensayos clínicos <sup>114</sup>. Es por este motivo que en la actualidad han cobrado relevancia las terapias que buscan modular la respuesta secundaria, mediante la modificación de la expresión génica de las células del SNC.

### 1.5.3 Modelos animales

El uso de modelos animales es esencial para el estudio de los procesos de lesión secundaria y para el desarrollo de nuevas terapias. Un gran número de modelos murinos han sido desarrollados para reproducir los aspectos del TEC vistos en la clínica <sup>116; 136; 137</sup>. El modelo clásico más utilizado con este fin fue la contusión inducida por la caída de una pesa (del inglés “weight-drop injury”), sin embargo actualmente se aceptan los modelos de lesión cerebral por percusión de fluido (FPI) y el trauma inducido por contusión cortical controlada (CCI) <sup>116; 136</sup> por ser más reproducibles y estables.



**Figura 1.11: Modelo de lesión traumática (CCI) mediante el uso del equipo “Impactor cortical”.** Instrumento utilizado para generar la lesión traumática en el modelo de contusión cortical controlada (CCI). El uso de este sistema permite controlar las variables de velocidad, profundidad y duración del impacto, transformándolo en un modelo fiable y reproducible.



Las ventajas del modelo CCI frente a los otros modelos mencionados es que éste permite la manipulación y homogenización de variables como la duración, velocidad y profundidad del impacto, mediante la utilización de un equipo llamado “impactor cortical” (Fig 1.11). Este equipo nos permite generar un golpe mediante un mecanismo de pistón con variables controladas por un software. El modelo de CCI reproduce los efectos neuropatológicos de las lesiones traumáticas focales observadas en humanos como la producción de edema, cambios en la microvasculatura cerebral, daño neuronal y daño axonal, así como déficit comportamentales significativos <sup>136; 138; 139</sup> .

## 2. Hipótesis y Objetivo general:

En este contexto hipotetizamos *i)* que los nano-vectores HNRK y HKRN con su diseño modular son capaces de mejorar la función de la versión anterior, el vector NLScT *ii)* que los nano-vectores resultan más eficientes que los LVs para tratar lesiones neurotraumáticas debido a la corta ventana temporal y al patrón de expresión tardía de éstos últimos.

Es por ello que mi trabajo de maestría posee como objetivo el desarrollo y comparación de distintas estrategias de terapia génica para el tratamiento de lesiones agudas del SNC. De esta manera pretendemos contribuir al diseño y desarrollo de vehículos más efectivos para la entrega de material genético.

Nos propusimos producir lentivectores de tercera generación y los vectores modulares recombinantes NLScT, HNRK y HNRK para su uso en terapia génica, así como comparar su eficiencia de transducción, su potencial neuroprotector y sus posibles efectos pro-inflamatorios/inmunogénicos o neurotóxicos en un modelo de trauma cerebral inducido por contusión cortical controlada.

### Objetivos específicos:

1-Desarrollo de distintos sistemas de vectores para transducción celular

2-Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transducción celular *In vitro*.

3-Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transfección/transducción del SNC *In vivo*, en un modelo de trauma encéfalo-craneano.

### 3. Metodología:

#### 3.1 Producción y purificación de lentivectores de tercera generación:

#### Producción y purificación a mediana escala de plásmido libre de endotoxinas para la producción de vectores lentivirales

Los tres plásmidos estructurales: Plásmido que contiene los genes que codifican para las proteínas estructurales (*gag*) y enzimas retrotranscriptasa e integrasa (*pol*) (pMDLg/pRRE)(a), plásmido que codifica para las proteínas de envoltura de las partículas virales (en este caso pseudotipado con la proteína G del virus de estomatitis vesicular) (pMD2.VSV-G) (b) y plásmido que codifica la proteína Rev, esencial para la expresión de las principales proteínas virales (pRSV-REV) (c), fueron adquiridos en Addgene; el plásmido de transferencia que posee en su secuencia el gen de GFP como reportero (shLENTImax-GFP, p273)<sup>3</sup>, fue facilitado por el Dr. Rafael Yáñez del Centre for Biomedical Science, Royal Holloway-University of London.

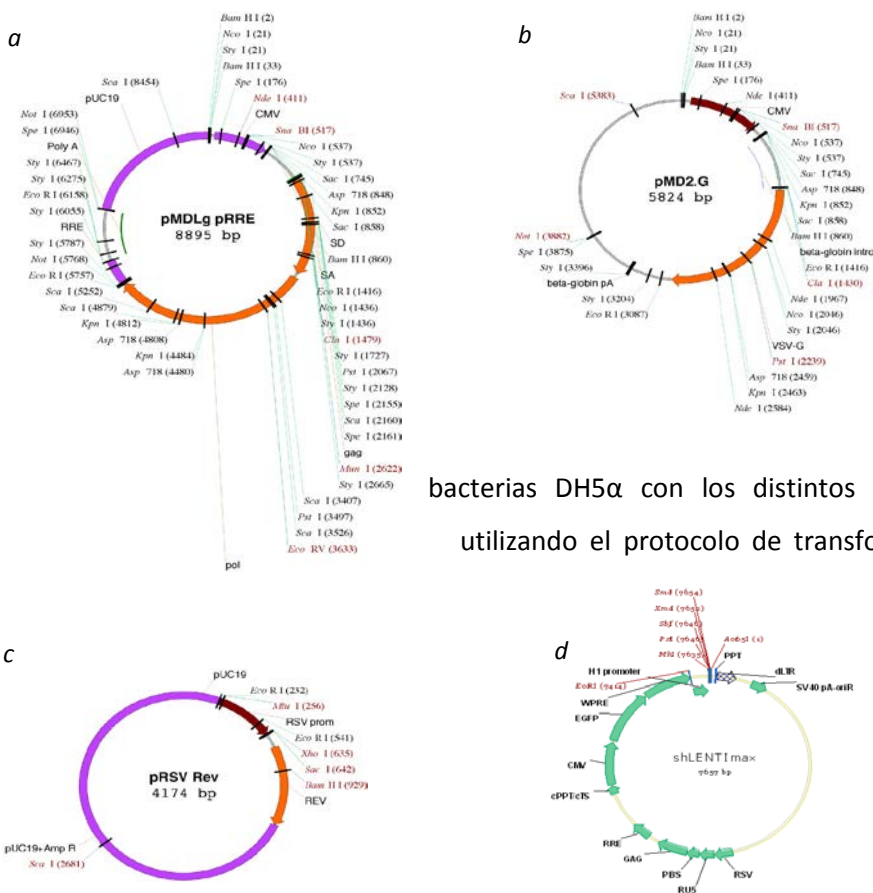


Figura 3.1: Sistema de 4 plásmidos para la producción de partículas lentivirales de tercera generación. Los plásmidos de empaquetamiento y de respuesta a purificación del ADN (a) y (b); Plásmido de plasmidico se realizó con la proteína VSV-G. c) a partir de un código de Rev y d) Plásmido de purificación libre de endotoxinas de Quiagen (EndoFree

Plasmid Maxi Kit cat #12362) con el fin de evitar posibles procesos inflamatorios en las células

transducidas y aumentar la eficiencia de transducción celular.

### **Puesta a punto de la producción y purificación de LVs 3G**

La producción de LVs fue llevada a cabo en células HEK293T (ATCC, # CRL-11268T). Estas fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, High Glucose, Glutamax<sup>™</sup> Invitrogen #61965-026) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS Gibco<sup>®</sup> #10106), penicilina a 100IU/ml y estreptomicina a 100 mg/ml e incubadas a 37<sup>º</sup> con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para optimizar la concentración de plásmido a utilizar se escalaron las condiciones de un protocolo proporcionado por el Dr. Rafael Yáñez, de una placa de petri de 15 cm de diámetro (17671 mm<sup>2</sup>) a una placa de 24 pocillos (200 mm<sup>2</sup>).

Se analizaron los efectos de la variación del protocolo original en la producción de partículas virales, tras la adición al medio de producción de cafeína 4 mM, colesterol 0.01 mM o DNasa 1 mg/ml; o tras la duplicación de la concentración de ADNp durante el protocolo de transfección. En el día 1 se sembraron 170.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos por duplicado para cada una de las condiciones. En el caso de las partículas producidas con la adición de colesterol, éste fue añadido al medio en el día de la siembra.

En el día 2 se procedió a la co-transfección de los cuatro plásmidos virales por el método de fosfato de calcio, en donde se mezclaron 0.141 µg de plásmido pMDLg/pRRE, 0.070 µg plásmido pRSV-REV, 0.079 µg de plásmido pMD2.VSV-G y 0.283 µg de plásmido de transferencia (p273) y se llevó a un volumen de 1.27µl con buffer TE. A esta mezcla se le agregaron 11.5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> estéril y 1.41 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5M. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió la mezcla por goteo a 14.1 µl de buffer HBS 2X, agitándolo a máxima velocidad y se mantuvo en reposo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se le agregó la mezcla a las células, y se mantuvieron en reposo a 37<sup>º</sup>C hasta el día 3. Buscando optimizar las condiciones de producción se creó una segunda variante de este protocolo, duplicando la concentración de plásmidos y reactivos durante la transfección, a la que llamaremos ADN 2X.

En el día 3, 17 horas post transfección (hpt), se cambió el medio a las células transfectadas por medio DMEM fresco (suplementado con cafeína o DNasa según el caso). Tanto el colesterol como la cafeína se encuentran en la bibliografía como amplificadores de la producción de LVs<sup>34;</sup>  
52.

Los días 4 y 5 se levantó el sobrenadante de las células productoras, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos y se filtró con un filtro de 0.22 µm para clarificar el medio de restos celulares. Una vez clarificado, se guardó a -80<sup>º</sup>C hasta ser usado.

## **Producción de LVs 3G a mediana escala**

Se realizó una producción a mediana escala con el fin de analizar la capacidad de transducción celular de los vectores purificados según los distintos protocolos. Para ello se utilizaron placas de petri p60, cuya superficie es de 2827 mm<sup>2</sup>. En el día 1 se sembraron 1.6 millones de células HEK293T en 10 ml de medio completo.

En el día 2 se cambió el medio a 8 ml y se transfectaron las células utilizando 4.16 µg de plásmido pMDLg/pRRE, 2.3 µg de plásmido pMD2.VSV-G, 2.08 µg de plásmido pRSV-REV y 8.3 µg de plásmido de transferencia (shLENTImax p273), llevados a un volumen de 37.5 µl con Buffer TE. Se adicionó 337.5 µl de agua bidestilada estéril y 41.6 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5M se agitó la mezcla y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó la mezcla por goteo a 416 µl de buffer HBS 2X, agitando a máxima velocidad. Se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente y se agregó a las células.

En el día 3, 17 horas post transfección se cambió el medio a 6ml de DMEM-10%FBS o 6 ml de DMEM-10%FBS+cafeína 4 mM según el caso.

Durante los días 4 y 5 se procedió a la recolección del sobrenadante y purificación de las partículas virales.

La purificación se llevó a cabo centrifugando el medio a 2000 g durante 10 minutos a TA y filtrando el sobrenadante a través de un filtro de 0.22 µm. Luego se realizó una centrifugación a 50.000 g en la ultracentrífuga Thermo Scientific Sorvall Discovery M120, utilizando el rotor S52ST 0164 durante 2 horas a 4°C. Se recuperó el pellet con DMEM sin suplementar (30µl de DMEM cada 4ml de sobrenadante), se le adicionó al volumen final 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 U/ml de DNAsa y se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C. luego se alicuotaron los vectores y guardaron a -80°C hasta ser titulados.

## **Titulación de los stocks lentivirales por citometría de flujo**

La titulación de los LVs producidos bajo los distintos protocolos se llevó a cabo en células HeLa mantenidas en DMEM suplementado con un 10% FBS, penicilina a 100 IU/ml y estreptomina a 100 mg/ml e incubadas a 37° con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para esto se sembraron en el día 1, 25.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, con 500 µl de medio de cultivo. Veinticuatro horas más tarde se cambió el medio a las células por 250 µl de medio fresco, adicionado con 16 µg/ml de polybrene + 250 µl del sobrenadante clarificado o 250µl de diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> del stock viral en DMEM-10%FBS. El

polybrene es un polímero catiónico utilizado para aumentar la eficiencia de infección de algunos virus en distintos tipos celulares en cultivo <sup>140</sup>.

Setenta y dos horas más tarde se observaron las células transducidas bajo el microscopio de epifluorescencia y se procesaron posteriormente para su análisis por citometría de flujo, según el siguiente protocolo: Se lavaron las células con DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, #14190-094), y se incubaron con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich #t3924) durante 5 minutos a 37° (la acción de la tripsina se bloquea con la adición de FBS). Luego de levantarlas, se las centrifugó durante 5 minutos a 1000rpm y fueron fijadas con PFA 1% para su análisis por citometría de flujo. Los análisis de expresión de la proteína GFP se realizaron utilizando el instrumento FACSCalibur y el software CellQuest (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

El título se calculó utilizando la dilución que contenga 1-10% de células marcadas, mediante esta fórmula:

$$\text{Unidades de transducción por ml de stock (Tu)/ml} = \% \text{ de células GFP+} \times [\text{número de células sembradas}/100] \times 1/\text{factor de dilución}$$

### **Producción de lentivectores 3G a gran escala**

Una vez optimizado el protocolo se llevó a cabo la producción a gran escala. En el día 1 se sembraron 10 millones de células en placas de 15 cm, con 25 ml de medio de cultivo, para que al momento de la transfección se encuentren entre un 80-90% de confluencia. En el día 2, 30 minutos previos a la transfección, se cambió el medio de las células por 20ml de medio fresco. La transfección se realizó mediante el método de fosfato de calcio detallado anteriormente. Se utilizaron 25µg de plásmido pMDLg/pRRE, 12.5µg pRSV-REV, 14 µg de plásmido pMD2.VSV-G y 50µg de plásmido de transferencia (p273), llevados a un volumen de 225 µl con buffer TE y a 2.250 µl con agua bidestilada.

Al cabo de 17 horas se cambió el medio de cultivo a las células por 17 ml de medio fresco suplementado con cafeína 4 mM, y durante los 2 días sucesivos se procedió a la recolección del sobrenadante para la purificación de las partículas virales.

La purificación y titulación se llevaron a cabo según el protocolo especificado previamente en el texto.

### **3.2 Transducción celular in vitro con lentivectores 3G:**

### **Transducción de un cultivo de astrocitos aberrantes (ABAs)**

Se trató un cultivo confluyente de células ABA con 20  $\mu$ l de un stock de LVs-GFP a  $1 \times 10^6$  Tu/ml (20000 Tu para un pocillo de 200  $\text{mm}^2$ ), 72 horas más tarde se analizó la expresión del transgén GFP por microscopía de epifluorescencia. Las células fueron expandidas en los sucesivos pasajes con el fin de aumentar la población celular. Estas fueron analizadas 2 meses luego de la transducción mediante FACS, según el protocolo especificado previamente.

### **Transducción de células HEK293T**

Se estudió la capacidad de transducción celular *in vitro* de los stocks de partículas lentivirales a dos tiempos, utilizando diferentes MOI (del inglés Multiplicity Of Infection que representa el número de partículas infectivas por célula transducida, y se calcula a partir del título viral y el número de células sembradas para transducir ( $\text{MOI} = 1$  partícula viral o 1 Tu por célula). Se utilizó el mismo protocolo de transducción celular especificado para los vectores modulares. Es decir, en el día 1 se sembraron 90000 células HEK293T por pocillo, en una placa de 24 pocillos. En el día 2 se procedió a transducir las células partiendo de un stock concentrado de LVs-GFP de  $3 \times 10^7$  Tu/ml. Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener una  $\text{MOI} = 0.1$ ;  $\text{MOI} = 1$  y  $\text{MOI} = 4.4$ . En el día 3 y 5 se observaron las células al microscopio de epifluorescencia y se procesaron para su análisis por citometría de flujo.

## **3.3 Puesta a punto de la producción y purificación del vector recombinante NLSCt**

Debido a que las columnas comerciales para la purificación del vector recombinante NLSCt fueron discontinuadas, era necesario poner a punto la producción y purificación del mismo en diferentes condiciones. Esto se realizó con la colaboración de la Dra. Cecilia Giacomini de la Facultad de Química, UDELAR.

Para ello se creció un Precultivo de BL21 pLys-NLSCt en medio LB (Lysogeny Broth) suplementado con 100  $\mu$ l/ml de ampicilina, y se mantuvo toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se reinoculó un cultivo de 500 ml de LB/Ampicilina con 10 ml de precultivo (1/50). Cuando el cultivo alcanzó una D.O = 0.4-0.6 se indujo la expresión de la proteína con 1mM

IPTG, durante 3-4 hs a 37°C, para luego cosechar el cultivo centrifugando a 5000 g durante 20 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 10 ml de buffer TM pH 7.5 y se almacenó a -80°C.

Se lisaron las células por sonicación durante 6 rondas de 2 minutos, pausando 1 minuto entre cada una, con una frecuencia on-off de 1 segundo y a una amplitud del 40%, en presencia de un cóctel de proteasas libre de EDTA. La fracción soluble fue separada por centrifugación a 15.000 g por 30 minutos a 4°C y filtrada por 0.22 µm. Se midió la actividad del extracto inicial incubando 50 µl de muestra con 1ml ONPG 4 mg/ml en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 con 0.01 M de MgCl<sub>2</sub>.

Una vez demostrada la presencia de actividad enzimática, se empaquetó la columna con 7ml p-aminobenzyl 1-Thio-beta-D-galactopiranosido inmovilizado sobre agarosa al 4% (sigma, N° A0414) obteniendo un volumen final escurrido de 6ml. Esta es una matriz análoga a la galactosa, que une a la β-Galactosidasa pero no la hidroliza. Se lavó y equilibró la matriz de la columna con 150ml de buffer TM 1X, pH 7.5.

Se cargó la muestra en la columna y se midió la actividad de la enzima β-Galactosidasa de cada una de las fracciones recogidas (fracción no unida, FNU) mediante la observación del viraje de color (100 µl de buffer fosfato + 5 µl de FNU + 20 µl ONPG 4 mg/ml, frenando la reacción a los 5 minutos con 50 µl de Carbonato de Sodio 1 M) con el fin de evitar la pérdida de proteína activa.

Se lavó la columna con 60 ml de buffer TM y se eluyó la proteína con buffer tetraborato suplementado en el momento con β-Mercapto-etanol (10 ml tetraborato + 20 µl de β-Mercapto-etanol). Las fracciones de elución activas se determinaron por la actividad de la β-Galactosidasa. Luego realizó una cromatografía de exclusión molecular (gelfiltración) para remover las sales de la mezcla y obtener la proteína pura en buffer fosfato. Esto se realiza con el fin de poder utilizarla tanto en cultivo celular como *in vivo*. Esta cromatografía se basa en la separación de moléculas según su tamaño. Como el vector NLSct es una proteína homotetramérica basada en el esqueleto de la β-Galactosidasa, su peso molecular es de alrededor de 464 KDa, con lo cual utilizamos una columna PD10 sephadex G-25, con un rango de exclusión de 1000 a 5000 Da., dicha columna se equilibró con 10 ml de buffer fosfato 0.05M pH 7.5 + MgCl<sub>2</sub> 0.01M, se cargó con 2.5ml de muestra y se eluyó con 3.5 ml de buffer fosfato. Obtuvimos así la proteína pura en buffer fosfato, 1.4 veces más diluida que la obtenida de la cromatografía de afinidad inicial.

Se extrajeron muestras de las distintas etapas de purificación del vector NLSct para analizarlas mediante una electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida al 12%.

Se cuantificó la concentración de proteína por el método de BCA según el protocolo descripto por Smith *et al.*<sup>141</sup>. Se alicuotó y almacenó el vector a -80°C hasta su posterior uso.



### **Soluciones utilizadas:**

Buffer fosfato 0.05 M pH7.5 : 0.38 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 2.38 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Buffer TM 10X: 4.4 g Tris + 4 g  $\text{MgCl}_2$  + 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$

El  $\text{MgCl}_2$  cuesta diluir, es mejor agregarlo a la solución de Tris 1X pH 7.5

(Buffer TM 1X= 100 ml Tris 10X + 2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Buffer tetraborato: 3.81 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

se suplementa en el momento con 200  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercapto-etanol

Diluir el borato de sodio en 80 ml de agua y ajustar el pH a 10 con NaOH

Buffer Carbonato de Sodio: 5.29 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$

## 3.4 Producción, purificación y análisis de los nano-vectores recombinantes

### HNRK y HKRN

#### **Producción y purificación de los nano-vectores recombinantes**

La producción de ambas proteínas quiméricas se llevó a cabo creciendo pre cultivos de BL21 (DE3 pLYS) de E.Coli conteniendo los correspondientes plásmidos para la expresión de HKRN y HNRK (facilitado por el grupo de Antoni Villaverde del laboratorio de Microbiología aplicada de la Universidad Autónoma de Barcelona) en medio LB adicionado con 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Kanamicina, durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se reinocularon cultivos de 500 ml de LB-kanamicina a una razón de 1/50. Cuando el cultivo alcanzó una D.O de entre 0.4-0.6, se indujo la expresión de las proteínas adicionando 1 mM de IPTG, y dejando crecer durante 4 horas a 37°C en agitación. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 5.000 g durante 20 minutos, se lavaron con PBS y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los pellets se resuspendieron en 20 ml de Buffer de Lisis (L) (Tabla 3.1) y se lisaron las células por sonicación durante 4 rondas de 10 minutos, pausando 5 minutos entre cada una, con una frecuencia on-off de 0.5 segundos y a una amplitud del 40%, en presencia de un cóctel de proteasas libre de EDTA. La fracción soluble fue separada por centrifugación a 15.000 g por 45 minutos a 4°C y filtrada por 0.22  $\mu\text{m}$ .

Las proteínas fueron purificadas mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel en un solo paso (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare Life Science), mediante el sistema ÄKTATM FPLC (GE Healthcare). Luego de cargar la columna con 5 volúmenes de  $\text{NiCl}_2$  y lavarla con abundante agua destilada, fue equilibrada con 10 volúmenes de buffer de

lavado (A). Luego se cargó la muestra en la columna con un flujo de 0.5 ml/minuto y se lavó con 5 volúmenes de columna de Buffer A. La proteína purificada se eluyó utilizando un gradiente de 20 volúmenes de columna hasta llegar a 100% de Buffer de Elución (B). Las fracciones positivas en el cromatograma fueron colectadas y desaladas a través de una columna de gelfiltración HiTrap Desalting Sephadex G-25 (GE Healthcare) con el fin de cambiar el buffer de solución a HEPES buffer salino (HBS). Se extrajeron muestras de cada etapa de la purificación para analizar por electroforesis.

Las proteínas luego se concentraron utilizando un sistema de filtrado por centrifugación, Amicon Ultra-15 centrifugal filter Unit (Merck Millipore), con un cut off de 5000 Dalton, por lo que los vectores, de 10.2 kDa quedaron retenidos en la membrana. Finalmente éstas fueron cuantificadas por el método BCA y almacenadas a -80°C o liofilizadas hasta su posterior uso.

Para la regeneración de las proteínas liofilizadas se resuspendieron en agua bidestilada y se centrifugan a 15.000 rpm, 4°C durante 15 minutos.

**Tabla 3.1: Composición de los distintos buffers para la purificación de los vectores recombinantes** \*(La purificación de HNRKS no se utilizó cloruro de guanidinio).

	Buffer de lisis (L)	Buffer de lavado (A)	Buffer de elución (B)
Tris	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM
Imidazol	0 mM	10 mM	1 M
GuHCl	6 M	6 M	6 M

### **Detección de proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poli-acrilamida al 12% (SDS-PAGE)**

Las muestras obtenidas en las distintas etapas de purificación de los vectores recombinantes fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% reveladas con azul de Coomassie o mediante una tinción específica del dominio de histidinas “InVision His-Tag In Gel Stain” (GE Healthcare life technologies) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este es un método rápido, sensible y altamente específico para visualizar proteínas marcadas con cola de histidina directamente en un transiluminador por exposición a UV.

### 3.5 Análisis comparativo de la eficiencia de transducción celular de los distintos vectores de terapia génica *in vitro*

#### **Optimización de la razón proteína/ADN para la transducción celular**

Se utilizaron para este fin células HEK293T mantenidas en DMEM suplementado con 10% de FBS e incubadas a 37°C. En el día 1 se sembraron 90000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 horas se transfectaron las células con distintas cantidades de vector recombinante, manteniendo constante la concentración de ADN en 2 µg, buscando fijar la relación óptima de proteína/ADN (r) para su utilización en cultivo. Las variables de capacidad de retención de ADN del vector recombinante fueron determinadas basándonos en los resultados de geles de retardo obtenidos por Domingo-Espin *et al.* en el 2011<sup>72</sup>. Se analizó la eficiencia de transducción de 1, 2 o 3 unidades de retardo (RU: 1 RU esta definida como la razón mínima de proteína/ADN que impide completamente la migración del ADN en un gel de agarosa) y fijando como máximo de proteína a sembrar un total de 15 µg/pocillo. Esto resultó en el análisis de la eficiencia de transducción de los vectores en las relaciones: 2.5; 5 y 7.5 HNRK/ADN (m/m) y 1.5; 3 y 4.5 HKRN/ADN (m/m).

Previo a la formación de los complejos HNRK o HKRN-ADN, se incubaron por separado el vector y el plásmido ShLENTImax p273 en 100 µl de OPTIMEM. Al cabo de 5 minutos, los complejos fueron generados mezclando el ADN y la proteína quimérica (15 veces con tip amarilla de p200) a las relaciones específicas de proteína/DNA ya mencionados a temperatura ambiente durante 20 minutos (para la transducción con NLSct, la mezcla proteína/ADN r= 33.3 se incubó durante 1 hora para la formación de los complejos, previo al agregado a las células por protocolo establecido previamente<sup>84</sup>). Transcurrido ese tiempo, se adicionaron los 200 µl de la mezcla a las células y se las dejó incubando por 4 horas, luego de las cuales se cambió el medio por DMEM-10% FBS. La transducción se monitoreó por microscopía de epifluorescencia y se confirmó por FACS a las 24 horas post transducción. Como control se utilizaron células transducidas con lipofectamina 2000 (Invitrogen, 1 µl lipofectamina + 2 µg p273/pocillo en una placa de 24 pocillos), células sin transducir y células con 2µg de ADN solo.

#### **Efecto trófico de los nano-vectores recombinantes**

Para evaluar el efecto trófico de los vectores recombinantes se utilizaron células de la línea PC12, un modelo de neuronas. Estas células son mantenidas en DMEM suplementado con 10%

FBS y 5% de suero de caballo (HS).

En el día 1 se sembraron 60.000 células PC12 por pocillo, en una placa de 24 pocillos con un 1% de FBS. En el día 2, previo al comienzo del ensayo, se lavaron los restos de FBS del medio celular y se trataron las células para los diferentes análisis con distintas concentraciones de vector recombinante HNRK o HKRN (100 o 1000 ng/ml), con 10%FBS o con 100 ng/ml de NGF recombinante según el caso. Setenta y dos horas más tarde se observaron y fotografiaron las células en el microscopio óptico y se cuantificó la supervivencia celular mediante la reducción del agente MTT.

### **Efecto de la cloroquina y escape endosomal**

Se analizó la capacidad de los vectores en complejo con el ADN de escapar de la vía lítica endosomal. Para este fin se utilizaron células HEK293T según el protocolo de transducción detallado previamente, adicionando 200  $\mu$ M de cloroquina (C6628, Sigma Aldrich) al medio celular<sup>45</sup>. La cloroquina es un agente tamponante conocido como disruptor de membrana endosomal. Este actúa por incremento del pH del ambiente endosomal facilitando así el escape del complejo proteína/ADN al citosol de la célula transducida y evitando su degradación lisosomal<sup>45; 142; 143</sup>.

### **Efecto del volumen de formación de complejos**

Para el análisis de la efectividad de transducción celular de los complejos formados en 30  $\mu$ l se siguió el protocolo de transducción detallado previamente en células HEK293T incubando 2  $\mu$ g ADN con el volumen de OPTIMEM calculado para que en 30  $\mu$ l finales haya una relación 5 para HNRK y 4.5 para HKRN. Transcurridos 20 minutos de incubación, esta mezcla fue incorporada a las células en 170  $\mu$ l de OPTIMEM. Cuatro horas post transfección se cambió el medio por DMEM-10% FBS. La transducción se monitoreó por microscopía de epifluorescencia y se confirmó por citometría de flujo a las 24 horas post transducción. Como control se utilizaron células transducidas con lipofectamina 2000 (Invitrogen, 4  $\mu$ g lipofectamina + 1  $\mu$ g DNA/pocillo en una placa de 24 pocillos), células sin transducir y células con ADNp solo.

### **Efecto de la presencia de suero en la transducción celular**

Para evaluar el efecto de la presencia de suero en las células a la hora de la transducción, se siguió el protocolo original de transducción de los vectores recombinantes, adicionando a cada pocillo un 10% de FBS al momento de agregar la mezcla de complejos vector/ADN.

### 3.6 Análisis comparativo de la eficiencia de transfección/transducción de los distintos vectores *in vivo*

Los estudios experimentales *in vivo* fueron avalados por la comisión de ética de la UDELAR y llevados a cabo según las directivas de la Federación de las Asociaciones de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA) y la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). El protocolo experimental fue aprobado por la comisión de Ética de Facultad de Medicina (Protocolo Exp. Nº 071140-000813-12)

Las lesiones traumáticas y la sobre-expresión de los genes de interés se llevaron a cabo en ratas macho adultas de la cepa Wistar de entre 280-300g provistas por la unidad de reactivos y biomodelos de experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, UDELAR. Los animales se mantuvieron en cajas individuales a temperatura adecuada (22-26°C), con agua y comida *ad libitum* y con un ciclo luz oscuridad 12:12 horas.

#### **Modelo de Trauma encéfalo-craneano (TEC)**

Se utilizó el agente anestésico inhalatorio isoflurano (Abbott, Abbott Park, IL, USA) y O<sub>2</sub>, el cual es el más comúnmente utilizado en los modelos animales de TEC <sup>144</sup>. Las ratas fueron anestesiadas por vía respiratoria con un 3.5% de isoflurano, y mantenidas durante el procedimiento en 2.5-3%. Posteriormente se colocó en posición prona, fijándose al sistema quirúrgico estereotáxico y se procedió al abordaje de la región cefálica mediante una incisión mediana amplia de modo de abordar el cráneo. Utilizando un pequeño taladro dental con fresa de diamante se realizó una craniectomía lateral derecha de 6 mm de diámetro en forma circular, manteniendo intacta la duramadre. La topografía exacta del centro de la craniectomía es 2.5 a 3 mm posterior y 2.5 a 3 mm lateral al bregma. A nivel cerebral, esta zona corresponde al área motora y somato-sensorial primaria.

Para generar lesiones traumáticas cerebrales unilaterales controladas (Cortical PinPoint Precision Instruments, Fig. 1.11).

Este equipo nos permite generar lesiones traumáticas cerebrales unilaterales controladas (Cortical PinPoint Precision Instruments, Fig. 1.11).

Este equipo nos genera así un modelo fiable y reproducible. Consiste en un pistón que impacta en el cerebro

con determinadas condiciones prefijadas por el operador. En nuestro modelo se utilizó un pistón de 3 mm, fijado a una velocidad, profundidad y tiempo de impacto de 1.5 m/seg, 4 mm y 120 msec respectivamente. Luego de provocada la lesión encefálica, se suturó la piel que cubre el sitio de la lesión y el animal permaneció en reposo a 37°C durante unos minutos, controlando hasta que despertó de la anestesia.

### **Grupos experimentales y tratamiento post-traumático**

Cuatro horas después de realizado el trauma y bajo el mismo nivel de anestesia, se realizaron 3 inyecciones intracerebrales directamente en el límite del tejido lesionado.

Los animales fueron distribuidos de manera randomizada en los diferentes grupos y subgrupos de acuerdo con el tratamiento recibido y el tiempo de sobrevivencia como indica la tabla 2. Los diferentes grupos según el tratamiento fueron:

- 1) Grupo control PBS, al cual se le inyectó PBS como control de vectores no virales.
- 2) Grupo control DMEM/MgCl<sub>2</sub>, las cuales fueron inyectadas con DMEM- MgCl<sub>2</sub> 10 mM como control de vectores lentivirales.
- 3) Grupo Lentivirus-GFP, al cual se las trató con lentivectores de expresión para la proteína GFP.
- 4) Grupo NLSCt-GFP, el cual fue tratado con el vector transportador NLSCt (0.8 µg/µl) acompañado con un plásmido de expresión de proteína fluorescente verde (p273 0.024 µg/µl) en 6µl de PBS. Este fue utilizado en su relación óptima r=33.3, luego de una hora de incubación a temperatura ambiente.
- 5) Grupo HNRK-GFP, al cual se le trató con vector transportador HNRK (1.2 µg/µl) formando complejos con el plásmido de expresión de proteína fluorescente verde (ShLENTImax p273 0.25 µg/µl) en 6µl de PBS. Este fue utilizado en su relación óptima (r= 5) e inyectando el primer animal luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. El cóctel de transfección se mantuvo a 4°C entre las sucesivas inyecciones hasta finalizado el último animal, por lo que los complejos fueron inyectados tras diferentes tiempos de incubación.

Las inyecciones se realizaron a través del uso de un nanoinyector (Quintessential Stereotaxic Nanoinjector, Stoelting CO. Wood Dale, IL, USA) que es capaz de inyectar pequeños volúmenes de solución en regiones específicas fijadas. Se inyectó a los animales a una velocidad de 0.4 µL/min durante 5 minutos utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl la cual se posiciona en los límites de la lesión primaria. Se fijó el centro de la lesión a 3 mm lateral a bregma, y a partir de ese punto se movió el inyector 2 mm anterior, 2 mm posterior y 2 mm lateral, inyectando en estas tres posiciones en la corteza, a -2 mm de profundidad. La aguja permaneció en su sitio 5

minutos luego de finalizada cada inyección con el fin de estimular la difusión intraparenquimatosa en el cerebro de los animales. Una vez transcurrido este tiempo, se suturó la herida y el animal fue devuelto a sus condiciones de cuidado del bioterio. La expresión del gen reportero GFP fue analizada en los distintos grupos a 2 tiempos diferentes, 1 día y 14 días post lesión (dpl) (ver Tabla 2):

### **Evaluación Funcional: Test de la cinta adhesiva (Sticky tape test)**

Dado que el tipo de lesión provocado afecta las áreas somato-sensorial y motora primaria, utilizamos el test de la cinta adhesiva, el cual permite evaluar la función sensitiva superficial y motriz en los grupos a largo plazo. Los animales fueron sometidos a 4 pruebas funcionales en los días 3, 7, 10 y 14 post lesión.

Este test consiste en colocar un trozo pequeño de cinta adhesiva (0.5cm) en la extremidad anterior del animal y medir el tiempo que demora en removérselo. La afección se da en el lado izquierdo del animal (contralateral al impacto) por lo que la medida del miembro derecho sirve de control interno del test. El tiempo máximo de evaluación se fijó en 180 segundos. Se realizaron 3 medidas por extremidad y se graficó el promedio de las 3 .

### **Obtención de muestras para ELISA y Western blot**

Para la detección y cuantificación de proteínas por ELISA y WB, los animales fueron anestesiados con pentobarbital y sacrificados por dislocación cervical. El hemisferio ipsilateral fue inmediatamente removido y disecado, obteniendo un fragmento de 7x8x9mm que comprende la zona de lesión. Este es rápidamente congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su homogenización. La disgregación del tejido se realiza mediante un homogeneizador en frío, utilizando un buffer Tris-50mM/EDTA-1mM que contiene un cóctel de proteasas (Roche, Mannheim, Germany) e inhibidores de fosfatasa (ortovanadato de sodio 10 mM). La mezcla homogenizada se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos en frío y el sobrenadante es alicuotado y guardado a -80°C hasta su uso <sup>79</sup>.

### **Detección y cuantificación de proteínas GFP e IL1 $\beta$ por ELISA**

La expresión de las proteínas GFP e IL1 $\beta$  en los hemisferios dañados ipsilaterales fue evaluada por ELISA mediante los kits comerciales “GFP ELISA Kit” (Abcam Plc. #ab117992) y “Rat IL-1 $\beta$  ELISA kit” (Invitrogen Corporation, cat. #KRC0011), según el protocolo indicado por el

fabricante. Se determinó la cantidad de proteína a sembrar en las placas de cada kit analizando 2 diluciones de los estándares y de las muestras problema (1/2 y 1/10) y midiendo la absorbancia a 450nm. Se utilizó una dilución 1/10 de la muestra para evaluar la expresión de I11 y la muestra entera para GFP. La concentración de proteína total de cada muestra fue obtenida mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) <sup>141</sup>.

**Tabla 3.2: Grupos experimentales de animales tratados con los diferentes vectores de terapia génica y procesamiento de los cerebros post-mortem.** Las técnicas de inmunohistoquímica contra GFP están siendo llevadas a cabo para distinguir los tipos celulares transfectados/transducidos pero no entran en el marco de esta tesis por una cuestión de tiempo.

Grupo	Técnica	Tiempo de sobrevida	
		24HPL	14DPL
PBS	Histología	–	2
	ELISA	4	10
DMEM MgCl <sub>2</sub>	Histología	1	–
	ELISA	3	5
LVs-GFP	Histología	3	3
	ELISA	4	4
NLScT-GFP	Histología	1	3
	ELISA	5	4
HNRK-GFP	Histología	3	1
	ELISA	4	12

### Detección de proteínas por Western Blot (WB)

Se realizaron WBs con anticuerpos específicos anti-Histidina, con el fin de determinar la presencia del dominio H<sub>6</sub> de HNRK en los homogenizados de cerebro de animales tratados con este vector durante 24 hs. Para ello se corrieron las muestras en un SDS-PAGE al 12% y se realizó un WB con un anticuerpo anti-His de GE Healthcare (#274710-01) a una dilución 1:3000. Se sembraron 25 µl de muestra, dado que se inyectaron 7.2 µg de HNRK en cada cerebro tratado y obtuvimos un total de 600 µl de homogenizado. Es por esto que asumimos que HNRK en esa cantidad de muestra se debería encontrar en el rango de los 300ng (12 ng/µl). Se utilizó anticuerpo secundario anti-Mouse-HRP (AB6789) a una dilución de 1:2500 y se reveló utilizando el sustrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) que permite detectar pequeñas cantidades de proteína en el rango picomolar.



## **Análisis estadísticos**

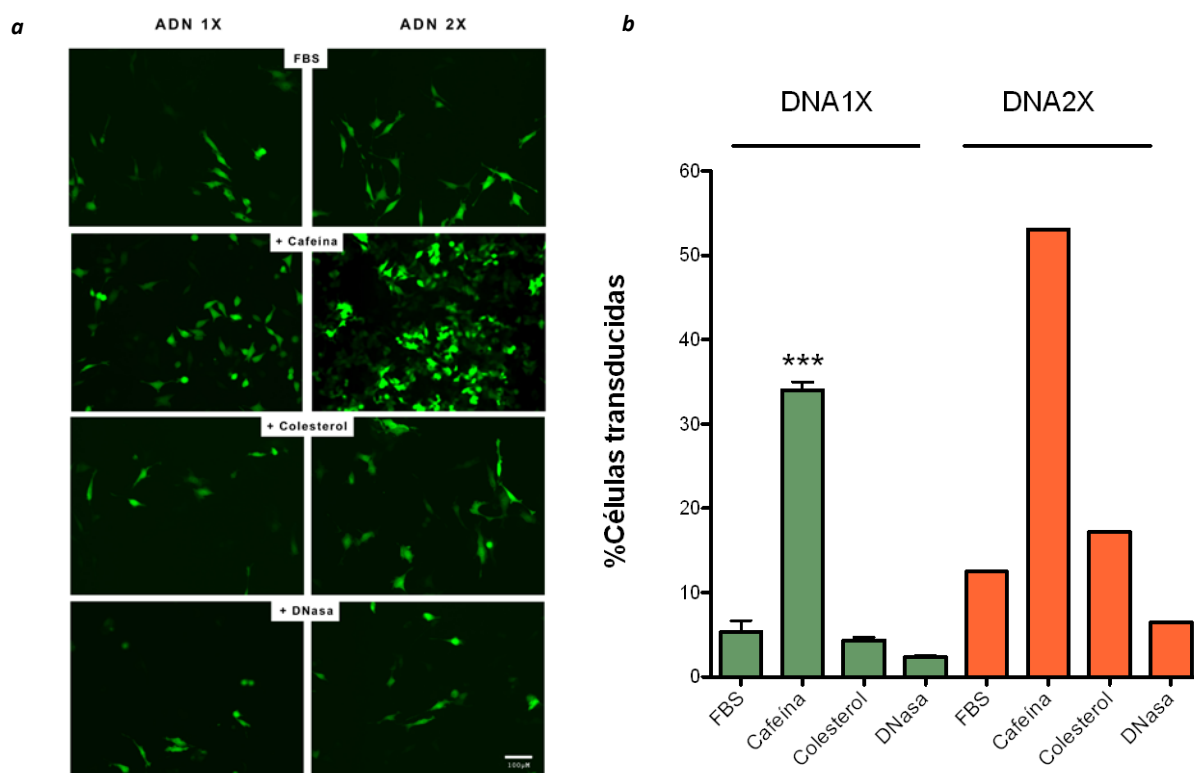
Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test de Student para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre dos grupos experimentales, luego de determinar la distribución normal de las muestras y la variancia. Para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la comparación de más de dos grupos experimentales se utilizó el test de ANOVA de un factor seguido del test de Bonferroni para múltiples comparaciones. Para el análisis estadístico del comportamiento de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de dos factores y medidas repetidas.

## 4. Resultados:

Optimización del protocolo de producción y purificación de las partículas lentivirales de tercera generación.

### Producción de LVs a pequeña escala

Se analizaron las variaciones en la cantidad de partículas lentivirales obtenidas mediante diferentes metodologías de producción (Fig. 4.1). Para ello se utilizó un protocolo proporcionado por el Dr. Rafael-Yañez (Royal Holloway-University of London, UK) al cual llamamos protocolo original o FBS, y se estudiaron los efectos de la duplicación de la concentración de los 4 plásmidos lentivirales durante la transfección de las células productoras HEK293T (ADN 1X o 2X) y de la adición de diferentes compuestos al medio de producción: cafeína, colesterol o DNasa. A los 3dpt (días post transducción) se examinó la capacidad de transducción celular de los sobrenadantes clarificados (centrifugados y filtrados) de células productoras de LVs por microscopía de epifluorescencia (Fig. 4.1 *a*) o por FACS (Fig. 4.1 *b*).



**Figura 4.1: Producción de partículas lentivirales a pequeña escala.** Análisis comparativo de la producción de partículas lentivirales y su capacidad de transducción celular según el protocolo utilizado: método tradicional (FBS); suplementando con colesterol 0,01mM; con cafeína 4mM o DNasa a 1mg/ml y utilizando diferentes concentraciones de ADNp durante la transfección de las células productoras (1X o 2X). Se incubaron las células HeLa con los sobrenadantes clarificados de las partículas lentivirales y al cabo de 72 horas se estudió la expresión del transgén reportero GFP por microscopía de epifluorescencia (*a*) y FACS (*b*). La barra de escala corresponde a 100µm.

Como se puede observar en la figura, la adición de cafeína al medio de producción aumenta significativamente la producción de partículas lentivirales con respecto al protocolo original FBS y al resto de los tratamientos.

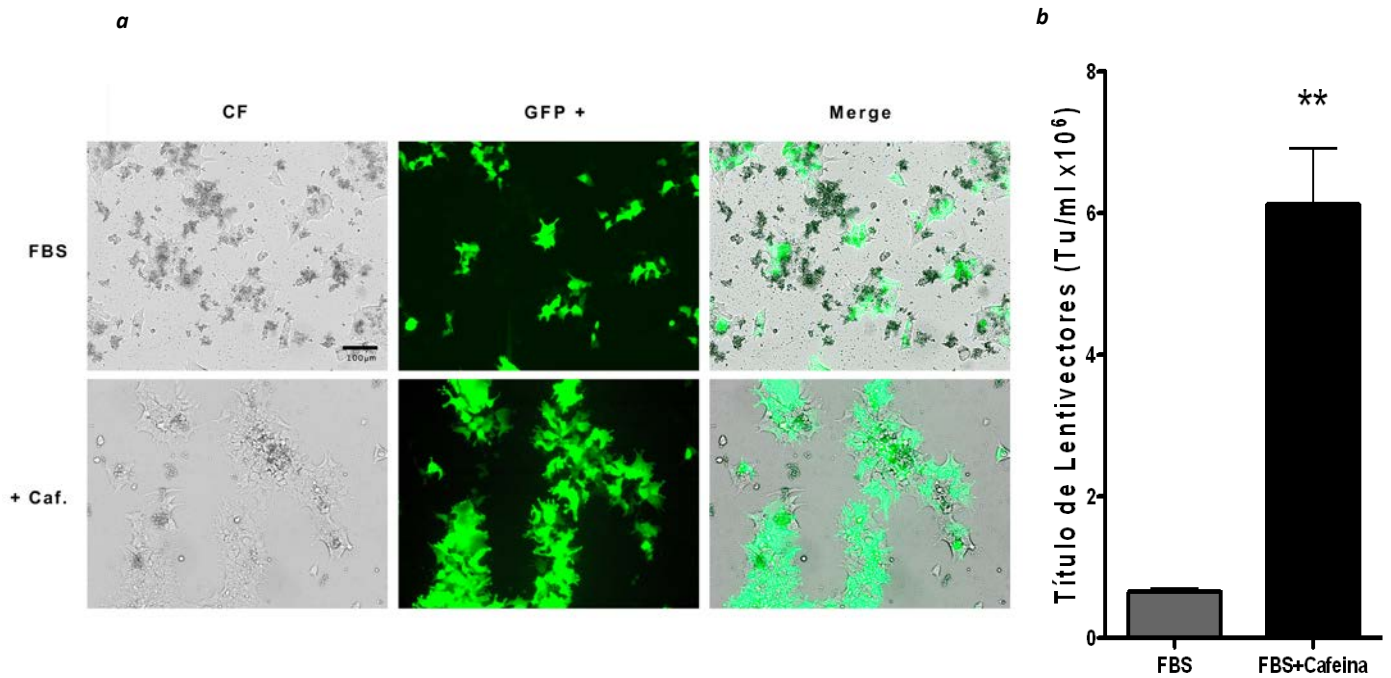
Por otra parte, los resultados sugieren que duplicando la concentración de ADNp (ADN 2X) durante la transfección de las células productoras HEK293T con fosfato de calcio, se incrementa notoriamente la producción de partículas lentivirales en todos los casos en comparación con la concentración de ADNp del protocolo original (ADN 1X). Se puede observar un incremento de casi el doble en la capacidad de transducción en todos los casos, con especial interés para el protocolo FBS y el adicionado con cafeína, los cuales resultaron ser los más efectivos.

A partir de los resultados de la incubación de las células HeLa con los sobrenadantes de las células HEK293T productoras de LVs no nos fue posible cuantificar el título viral, ya que para calcular las unidades de transformación por mililitro se debe utilizar una dilución que produzca un máximo del 10% de células transducidas en el total de la población. Un porcentaje mayor podría significar la existencia de infecciones múltiples en una misma célula, por lo que estaríamos subestimando el título.

### **Producción de LVs a mediana escala**

En base a estos resultados se continuó con la puesta a punto del protocolo, aumentando la escala de producción con el fin de obtener stocks concentrados de partículas LVs. Se transfectaron células HEK productoras con el doble de concentración de ADN plasmídico, con o sin adición de cafeína al medio de producción (Fig.4.2 a), se concentraron los sobrenadantes conteniendo los LVs (2 y 3 días post transfección) por ultracentrifugación y se evaluó la capacidad de transducción en células HeLa. Se cuantificó la producción de las partículas LVs transduciendo estas células con diluciones seriadas de los stocks purificados de LVs (1/100, 1/1000 y 1/10000) (Fig. 4.2 b).

Como podemos apreciar en la sección *a* de la figura 4.2, la transfección de las células HEK293T con el método de fosfato de calcio afecta la morfología de estas células, adquiriendo una apariencia retraída y pudiéndose observar agregados amorfos sobre las mismas. La adición de cafeína al medio de producción mostró no solo una mayor intensidad de fluorescencia y porcentaje de células GFP+ con respecto al total, sino que dichas células parecían estar en mejor estado, en comparación con las tratadas con FBS solo.



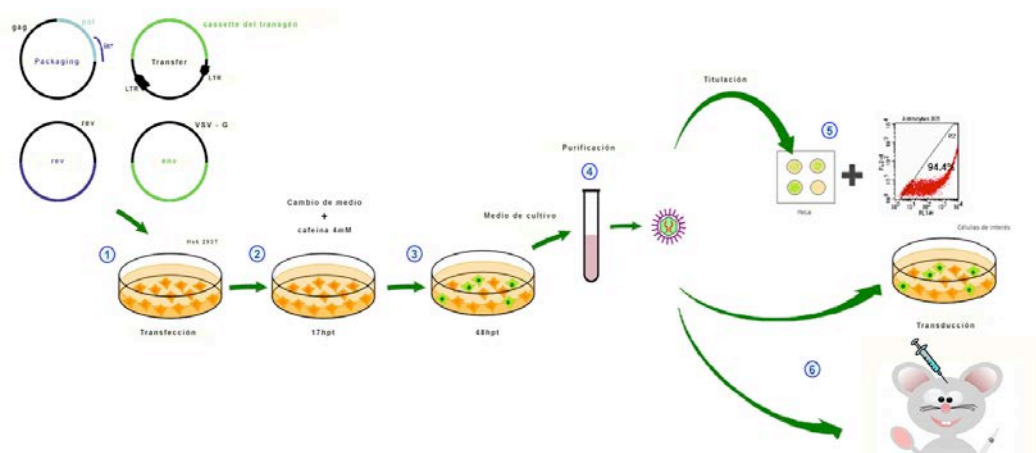
Por otra parte, partiendo de una producción a mediana escala fuimos capaces de obtener

**Figura 4.2** Título de las partículas lentivirales producidas a mediana escala. Se analizó la eficiencia en la producción de LVs transfecando células HEK293T con fosfato de calcio y analizando por microscopía de epifluorescencia 48 horas post transfección (a). Se analizó la capacidad de transducción de los LVs en células HeLa (b). Para titular en b se analizó la expresión mediante diluciones seriadas los stocks concentrados de LVs producidos en ambas condiciones (protocolo original (FBS) o adicionado con cafeína (+Cafeína)). La expresión de GFP se analizó por FACS. El título obtenido mediante el método original (FBS) fue de  $7 \times 10^5$  Tu/ml. Los niveles de producción de partículas virales pudieron ser incrementados 10 veces mediante la incubación de las células productoras con Cafeína. CF=contraste de fases, GFP+= células que expresan GFP. La barra de escala corresponde a 100 µm.

resultando en un título de  $7 \times 10^5$  Tu/ml para FBS y de  $7 \times 10^6$  Tu/ml para los stocks concentrados, producidos con adición de cafeína. Para la titulación en ambas condiciones se utilizó la dilución  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  (siempre < a 10% de células transducidas).

A partir de estos ensayos logramos optimizar la producción de lentivectores, transfecando las células productoras con el doble de ADNp y adicionando 4 mM de cafeína al medio de producción.

En la figura 4.3 se muestra una representación esquemática del protocolo puesto a punto para la producción de partículas lentivirales. Una vez optimizadas las condiciones, se puso en marcha la producción a gran escala para su utilización como vector *in vivo*.



## Producción de LVs a gran escala

Se produjeron y purificaron grandes cantidades de partículas lentivirales y se titularon mediante la transducción de células HeLa con diluciones seriadas de los stocks (Fig. 4.4).

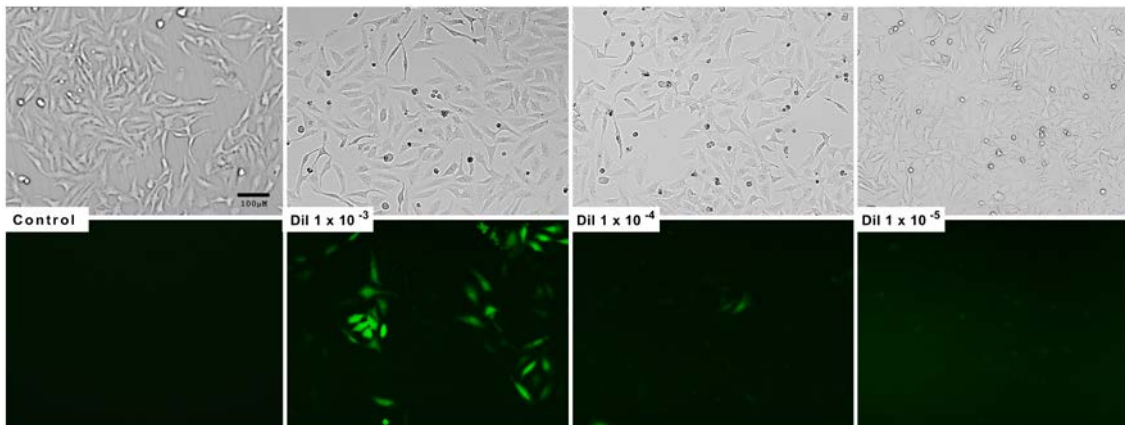
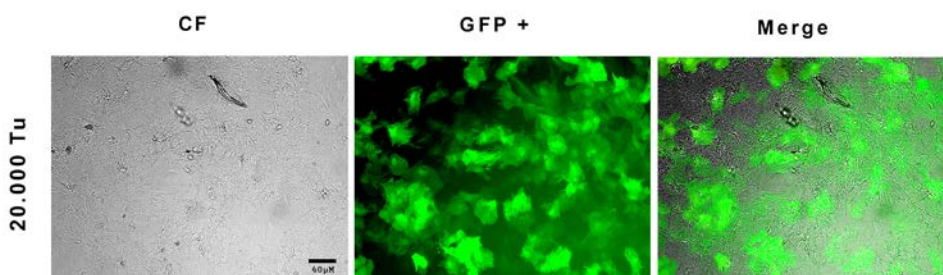


Figura 4.4. Titulación de la titulación más alta que en las diluciones  $10^{-5}$  al  $10^{-3}$  un promedio de 1.24% seriadas los stocks concentrados de LVs y se transdujeron células HeLa. Se evaluó la expresión de GFP de las células transducidas de las células resultaron positivas para la expresión de GFP lo cual corresponde a un título de  $3.2 \times 10^7$  TU/ml. Se evaluó de esta forma el nivel de producción y el nivel de eficiencia en la concentración de estos vectores para  $3.2 \times 10^7$  TU/ml (Título calculado según la fórmula especificada en la sección materiales y métodos). Este título se encuentra dentro de los rangos óptimos para su utilización *in vivo* <sup>3</sup>.

## Transducción de líneas celulares *in vitro*

Con el fin de evaluar la capacidad de transducción de los LVs *in vitro* en otros modelos celulares, se analizó la transducción de cultivos de astrocitos aberrantes (ABAs) y células HEK293T obteniendo en ambos casos una alta eficiencia de transducción (Fig. 4.5 y Fig. 4.13 c, d).

## Trasducción de células ABA



**Figura 4.5: Trasducción de cultivos de líneas celulares.** Se trató un cultivo confluyente de **células de la línea ABA** en una placa de 200mm<sup>3</sup> con 20000Tu de partículas virales producidas en nuestro laboratorio. Imágenes de microscopía de epifluorescencia. La barra corresponde a 40µm.

El análisis por microscopía de epifluorescencia de las células ABA a las 72 horas de tratadas con 20000Tu de LVs-GFP mostró elevada expresión de transgén (estimado en aproximadamente un 75%, Fig. 4.5). Las células fueron expandidas en los sucesivos pasajes con el fin de aumentar la población celular. Dos meses más tarde, se analizó el cultivo por FACS, alcanzando un 53.4% de células positivas para la expresión del transgén GFP (datos no mostrados). Esto nos da la pauta de que los lentivectores producidos en nuestro laboratorio podrían funcionar *in vivo* para la transducción del SNC.

Asimismo, se trataron células HEK293T con LVs MOI 0.1, MOI1 y MOI4.4 en forma comparativa con los vectores no virales (datos mostrados más adelante). Las partículas virales producidas en nuestro laboratorio mostraron una gran capacidad de transducción en esta línea celular. A partir de las 24hpt ya fuimos capaces de observar una expresión elevada de GFP, pudiéndose observar diferencias marcadas entre las diferentes MOI (Fig. 4. 13 *c, d*).

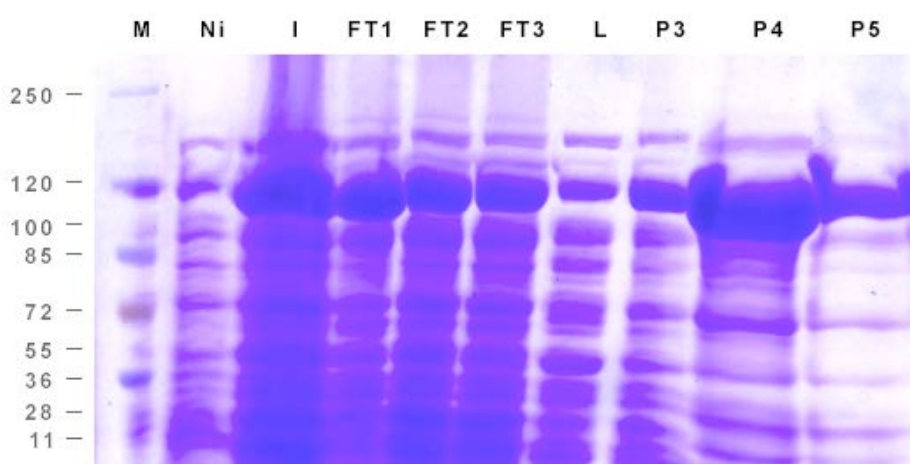
Optimización del protocolo de producción y purificación de los vectores modulares recombinantes.

### Purificación del vector NLScT

El vector NLScT fue expresado y purificado con la ayuda de la Dra. Cecilia Giacomini del laboratorio de Bioquímica, Facultad de Química, UDELAR. Esto se debió a que las columnas comerciales que se utilizaban con este fin fueron discontinuadas, haciendo vital la búsqueda de una estrategia nueva de purificación.

Para la purificación se utilizó un sustrato de p-aminobenzyl 1-Thio-beta-D-galactopiranosido inmovilizado sobre agarosa al 4% (sigma, Nº A0414). Esta matriz une a la  $\beta$ -Galactosidasa de forma específica pero no la hidroliza. Se lavó y equilibró la matriz de la columna se cargó la muestra en la columna y se midió la actividad  $\beta$ -Gal de la fracción no unida y lavados mediante la observación de la reacción colorimétrica de la  $\beta$ -Gal con el sustrato ONPG (datos no mostrados) con el fin de evidenciar la posible pérdida de proteína activa en las sucesivas etapas de purificación. Pudimos determinar tras esta reacción que una columna de 6 ml soporta la adsorción de aproximadamente 10 ml de muestra sin saturarse, ya que no presenciamos viraje de color en ninguno de las fracciones recogidas que indicara la presencia de la enzima activa. La proteína activa se eluyó con buffer tetraborato suplementado en el momento con  $\beta$ -Mercapto-etanol (10 ml tetraborato + 20  $\mu$ l de  $\beta$ -Mercapto-etanol)

La figura 4.7 muestra una electroforesis desnaturante en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de las fracciones colectadas durante las primeras etapas de purificación del vector NLSct, previo a la remoción de sales. El vector se corresponde con la banda de 116KDa que se puede observar en los distintos carriles. La señal es más fuerte en la fracción 4 del pico de elución (P4). Si bien se puede observar la existencia de bandas inespecíficas y la pérdida de proteína en los distintos pasos de purificación (Fig. 4.7., FT1, FT2 y L). Las fracciones activas para  $\beta$ -Gal (P3, P4 y P5) fueron desaladas y concentradas, llegándose a obtener 500 $\mu$ l de proteína pura y activa a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l a partir de 500 ml de medio de cultivo, cantidad adecuada para realizar los siguientes ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.



**Figura 4.7: Purificación del vector NLSct.** Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de muestras obtenidas en los distintos pasos de la producción y purificación de vector recombinante. Como se puede observar, existe en el carril P4 una banda muy intensa en el rango de los 120KDa, que corresponde a nuestra proteína de interés. M: marcador de peso molecular de purificación del vector recombinante NLSct y de producir grandes cantidades de P4 y P5: Pico de elución, fracciones 3 4 y 5 respectivamente.

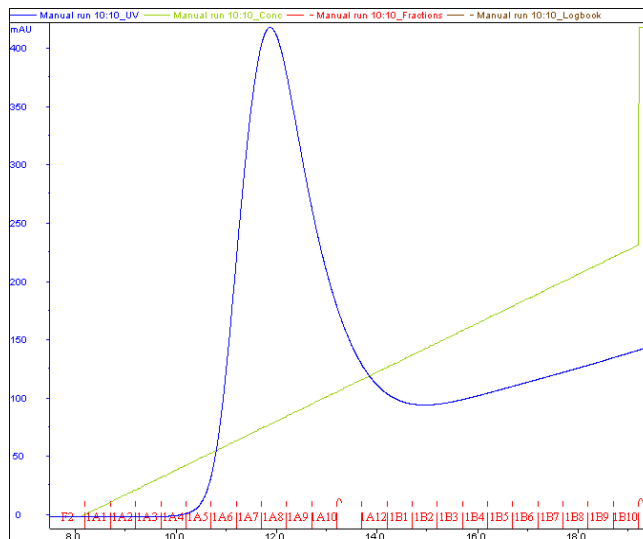


de proteína activa para su uso en terapia génica.

## Purificación de los nano-vectores HNRK y HKRN.

Luego de obtener cantidades significativas de vectores lentivirales y NLSct, el siguiente paso fue lograr producir y purificar en nuestro laboratorio los nano-vectores HNRK y HKRN activos. La figura 4.8 muestra el perfil de elución de la proteína HKRN purificada mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel en un solo paso (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare Life Science), mediante el sistema ÄKTA™ FPLC (GE Healthcare). Se puede observar en el perfil de elución (Fig. 4.8), que la proteína eluye al 12.5% de buffer B, lo que corresponde a una concentración de 62.5 mM de imidazol.

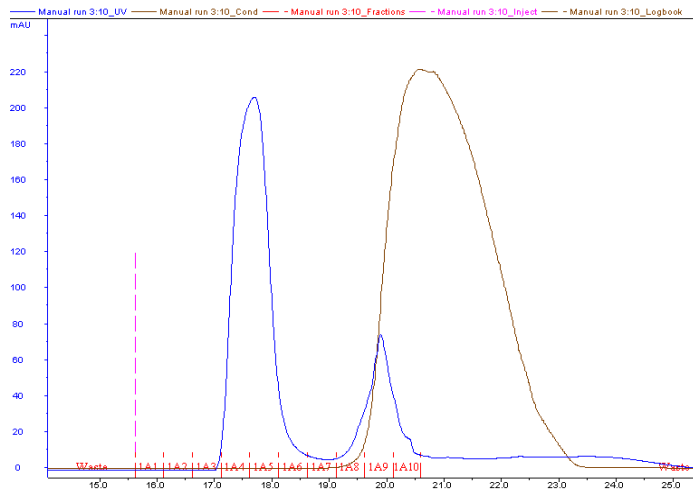
Se colectaron las fracciones correspondientes al pico de absorbancia (A6-A10) y realizó un cambio de buffer a HEPES buffer salino (HBS) mediante una columna de gelfiltración HiTrap Desalting Sephadex G-25 (GE Healthcare) (Fig. 4.9). Esto se realiza con el fin de utilizar estos vectores para los estudios tanto *in vivo* como en cultivo, ya que para utilizarlas con este fin las proteínas deben estar en solución con un buffer fisiológico que sea inocuo para las células y les proporcione estabilidad a los vectores.



**Figura 4.8: Perfil de Elución de la proteína recombinante HNRK.** Cromatograma de la elución de la proteína recombinante HNRK obtenido a través del AKTA FPLC. En el gráfico se muestra el pico de elución único medido por absorbancia de la proteína en el UV (línea azul) y el cambio de conductividad (línea verde) correspondiente al aumento de concentración de los nano-vectores recombinantes. El pico de absorción azul corresponde a la elución de la proteína en buffer B (imidazol de 62.5mM (12.5% de buffer B)).

El pico de conductividad (marrón) que se ve en la figura corresponde a la elución de las sales del buffer B. Las fracciones conteniendo a la proteína fueron colectadas y concentradas mediante un sistema de filtrado por centrifugación (Amicon ultra-15, cut-off 5000 Da), obteniéndose 1.8 mg de HNRK y 1.7 mg de HKRN a partir de 500 ml de medio de cultivo.





**Figura 4.9: Cromatograma de la gelfiltración para el cambio de buffer de la proteína HNRK.** Se realizó un cambio de Buffer B por HBS a las fracciones de elución de la IMAC utilizando una columna HiTrap Desalting. El pico azul corresponde a la proteína pura en buffer HBS, mientras que el marrón corresponde a las sales extraídas del buffer B de elución.

Las fracciones colectadas en las diferentes etapas de purificación de los nano-vectores fueron analizadas por SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie (Fig. 4.10 a) o InVision HisTag (Fig. 4.10 b).



**Figura 4.10 ; SDS-PAGE al 12% de los nano-vectores HNRK y HKRK.** a) Muestras obtenidas durante las distintas etapas de purificación de las proteínas recombinantes HNRK (HK) y HNRK (HN1 y HN2). Tinción con azul de Coomassie. El marcador de peso molecular; NI= fracción no inducida; I= fracción inducida; A.C= ante-columna; FNU= Fracción no unida; L= Lavado; E= Pico de elución. b) Tinción con azul de Coomassie (izquierda) e InVision His-tag, tinción específica del dominio de polipeptido de bacterias no inducidas. El carril (1) corresponde a la muestra de medio de bacterias inducidas con IPTG 1mM; Antecolumna (A.C), corresponde a la muestra antes de cargar la columna de IMAC; Fracción no unida 1 (FNU) corresponde a la muestra no unida que pasó por la columna; Lavados (L), corresponde a los lavados de la columna luego de cargada la muestra; Pico de elución de HNRK (E); HKRN purificada y concentrada (HK); HNRK purificada y concentrada (HN1, HN2).

Como podemos observar en la sección a de la figura, la banda que se corresponde con el peso de los vectores recombinantes (10.2kDa) está presente únicamente en los carriles E, HK y HN1 y 2 (pico de elución y vectores concentrados) y no así durante las diferentes etapas de purificación.

Como podemos observar en la sección a de la figura, la banda que se corresponde con el peso de los vectores recombinantes (10.2kDa) está presente únicamente en los carriles E, HK y HN1 y 2 (pico de elución y vectores concentrados) y no así durante las diferentes etapas de purificación.

purificación. Esto sugiere un correcto procedimiento a la hora de la producción y purificación de los vectores recombinantes.

Las bandas correspondientes a las proteínas HNRK y HKRN se hacen más intensas luego de la concentración de las mismas (HK, HN1 y HN2 con respecto a E), indicando que ambos vectores se lograron purificar y concentrar con éxito.

Por otro lado, utilizando la tinción específica del dominio de polihistidinas InVision HisTag se corroboró la presencia de HKRN en un SDS-PAGE al 12%, obteniéndose una única banda que se corresponde en peso a HKRN (Fig. 4.10 b).

**Análisis y optimización de la eficiencia de transfección *in vitro* de los nano-vectores recombinantes.**

### Optimización de la relación proteína/ADN

Luego de obtener los vectores solubles en su forma pura, estudiamos su capacidad de transfección celular *in vitro*.

Se evaluó la eficiencia de transfección de distintas concentraciones de vector conjugado con ADNp en la línea celular HEK293T (Fig. 4.12 y 4.13) utilizando como reportero el plásmido que codifica para la proteína fluorescente GFP (p273). Se analizaron 1, 2 y 3 UR (ver tabla 4.1) para

		<b>1UR</b>	<b>2UR</b>	<b>3UR</b>	
		(relación	(relación	(relación	
		prot/ADN)	prot/ADN)	prot/ADN)	
ambos					nano-vectores HNRK y
HKRN y					para una variante de
HNRK					obtenida a partir de la
fracción					soluble (sin agregado
de					guanidina) HNRKs.

Esto se realizó con el fin de establecer el vector que utilizaremos en adelante para los ensayos

*in vivo*

Tabla 4.1: Cuadro de correspondencia de unidades de retardo (UR) y relaciones proteína/ADNp. Basado en datos obtenidos por Domingo-Espín *et al.* 2011.

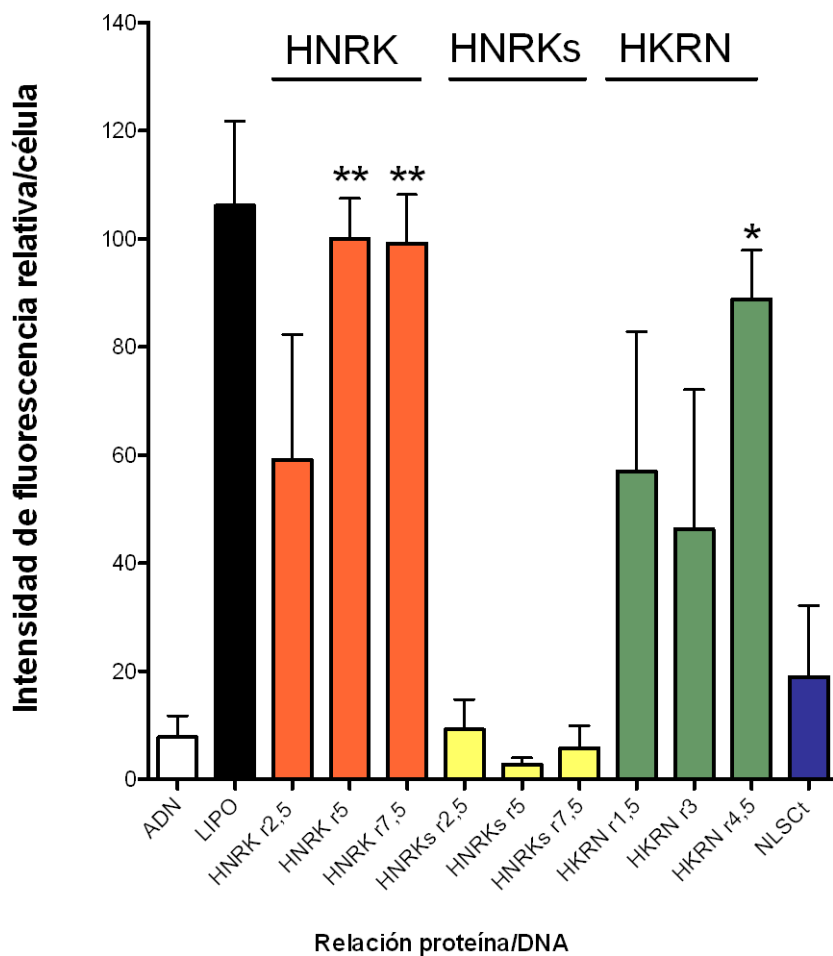
a

estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

de terapia génica, y optimizar la relación utilizarse en los

<b>HNRK</b>	2.5	5	7.5
<b>HKRN</b>	1.5	3	4.5

La figura 4.12 muestra la intensidad de fluorescencia media de las células transfectadas con los vectores modulares a diferentes relaciones proteína/ADN (Intensidad de fluorescencia media se refiere al promedio de las intensidades de GFP producidas por célula, en una población celular).



**Figura 4.12: Determinación de la relación óptima para la transfección celular de las proteínas recombinantes HKRN y HNRK.** Eficiencia de transfección de los vectores en distintas cantidades proteína/ADN, medida por la intensidad de fluorescencia media las células trasfectadas con GFP. Los valores fueron relativizados con respecto a HNRK r5 (relación proteína/ADN=5). Los distintos tratamientos que recibieron las células se especifican en el eje de las x: ADN=control ADN solo; Lipo=Transfección con Lipofectamina; HNRK=Células transfectadas con HNRK a distintas relaciones proteína/ADN; HNRKs=Células transfectadas con HNRK soluble a distintas relaciones proteína/ADN; HKRN= Células transfectadas con HKRN a distintas relaciones proteína/ADN; NLSct= Células transfectadas con NLSct a una relación proteína/ADN de 33.3 (\* resultados estadísticamente significativos con respecto a la transfección

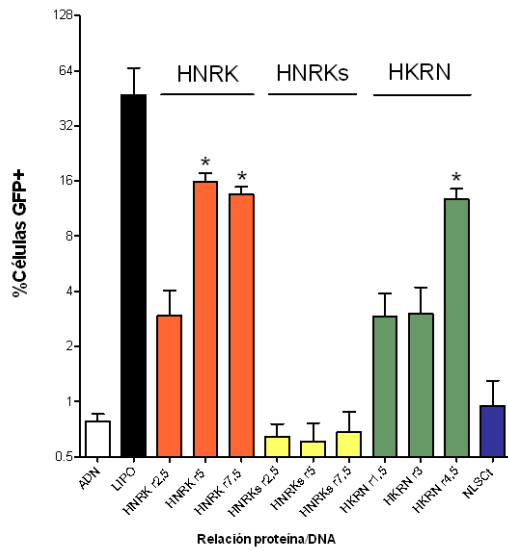
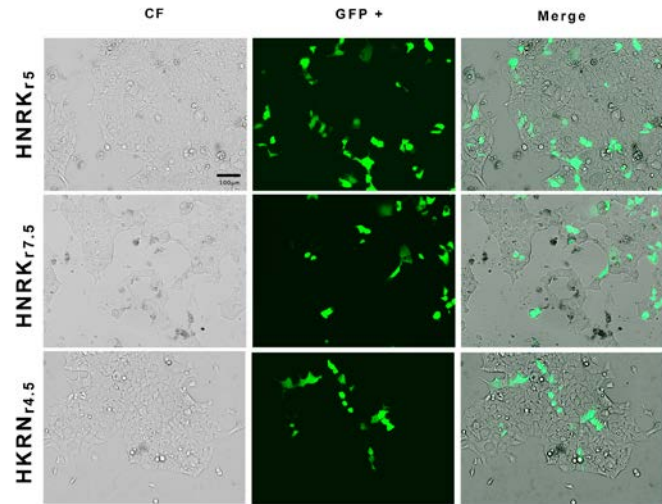
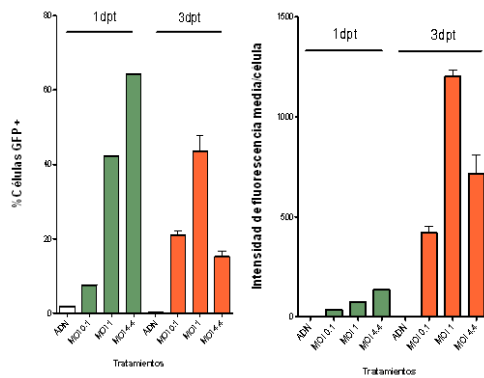
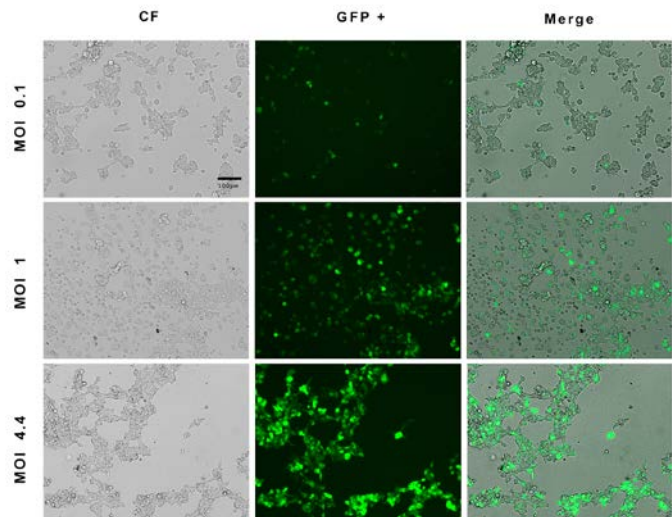
Como se observa en el gráfico, tanto HNRK como HNRK fueron capaces de mediar la expresión de GFP en células HEK293T, resultando mayor la expresión mediada por HNRK<sub>r5</sub> (2UR), y HNRK<sub>r7.5</sub> (3UR) seguida por HKRN<sub>r4.5</sub> (3UR), mientras que el vector HNRK soluble (HNRKs) no resultó efectivo para la transducción celular. La eficiencia de transducción *in vitro* de HNRK<sub>r5</sub>, HNRK<sub>r7.5</sub> y HKRN<sub>r4.5</sub>, resultó significativamente mayor que la de NLSct.

Asimismo, el porcentaje de células HEK293T transfectadas con los vectores recombinantes en diferentes relaciones proteína/ADN (Fig. 4.13 *a, b*) también resultó ser elevado para HNRK<sub>r5</sub> y HNRK<sub>r7.5</sub>, así como para HKRN<sub>r4.5</sub>. Se puede observar en el gráfico 4.13 *a*, que tanto HNRK en su relación 5 o 7.5, como HKRN en su relación 4.5, mostraron una mayor capacidad de transducción celular *in vitro* que el vector NLSct. En la microfotografía 4.13 *b* se observa mediante epifluorescencia un resultado similar al obtenido por FACS, con una mayor expresión de la proteína GFP para HNRK<sub>r5</sub>, seguido por HNRK<sub>r7.5</sub> y HKRN<sub>r4.5</sub>.

Por otra parte, en la sección *c* y *d* de la figura 4.13 se representan la eficiencia de transducción de los vectores lentivirales, medida por la expresión de GFP en células HEK293T transducidas con diferentes MOI a 1dpt o 3dpt. En las gráficas representadas en (*c*) se observa el porcentaje de células transducidas y la intensidad de fluorescencia media de la población celular. Los resultados de FACS (*c*) y microscopía de epifluorescencia (*d*) muestran que a las 24 hs ya existe expresión del transgén reportero, y que la intensidad de expresión de GFP aumenta con el tiempo. El cálculo de MOIs se realizó en base al título viral obtenido en células HeLa, una MOI= 1 representa la cantidad de vector necesaria para transducir el 100% de las células HeLa (1 partícula infectiva por célula). A partir de esto esperaríamos que al utilizar una MOI= 0.1, el 10% de las células HEK293T transducidas expresara el transgén, como se ve en los gráficos representados en *c* los resultados se comportaron como lo esperado para una MOI= 0.1.

Como se ve en la gráfica *c*, el porcentaje de células transducidas con GFP en el día 1 aumenta en relación proporcional a la MOI utilizada de manera dosis-dependiente. Sin embargo a los 3dpt observamos por epifluorescencia una disminución notoria en el número de células transducidas con una MOI=4.4, que se encontraban despegadas en agregados de aspecto apoptótico en comparación tanto con los controles sin transducir, como con MOI=1 o MOI=0.1

(datos no mostrados). Esto concuerda con los resultados arrojados por el análisis citométrico (c, 3dpt), los cuales muestran en el gráfico de FSC vs SSC (no mostrado) una población celular menos definida, con elevada muerte celular a las 72 horas del tratamiento con las partículas lentivirales a una MOI de 4.4. El porcentaje de células transducidas (% células GFP+) disminuye notoriamente en comparación con 1dpt, mientras que la intensidad de fluorescencia de la población celular aumenta, sugiriendo un efecto tóxico tras la transducción con las partículas virales a esa concentración. Comparando la eficiencia de los vectores recombinantes con la de los lentivectores para la transferencia de ADN al núcleo celular, podemos observar que en la línea HEK293T los últimos median un mayor porcentaje de transducción celular, pero que este puede resultar tóxico a concentraciones elevadas.

**a****b****c****d**

**Figura 4.13: Determinación de la relación óptima para la transfección celular de las proteínas recombinantes HKRN y HNRK y comparación con la transducción mediada por LVs . (a, b) Eficiencia de transducción de los vectores recombinantes en distintas relaciones de proteína/ADN, determinada por la cantidad de células HEK293T GFP+. Análisis por FACS a) y por microscopía de epifluorescencia b). Las relaciones óptimas para la transducción celular resultaron ser r5 para HNRK y r4.5 para HKRN. (c,d) Células de la línea HEK293T tratadas con distintas concentraciones de partículas virales (MOI 0.1, 1 y 4.4). Se analizó la expresión de GFP por FACS (como el porcentaje de células transducidas y la intensidad de fluorescencia media en la población celular) (c) 1dpt y 3dpt por y por microscopía de epifluorescencia 1dpt (d) y 3dpt (no mostrado). CF= contraste de fases; GFP+= verde. La barra de escala corresponde a 100 µm. \* Resultados estadísticamente significativos con respecto a la transfección mediada por NLSCT.**

## Interacción con receptores de membrana y efecto neurotrófico

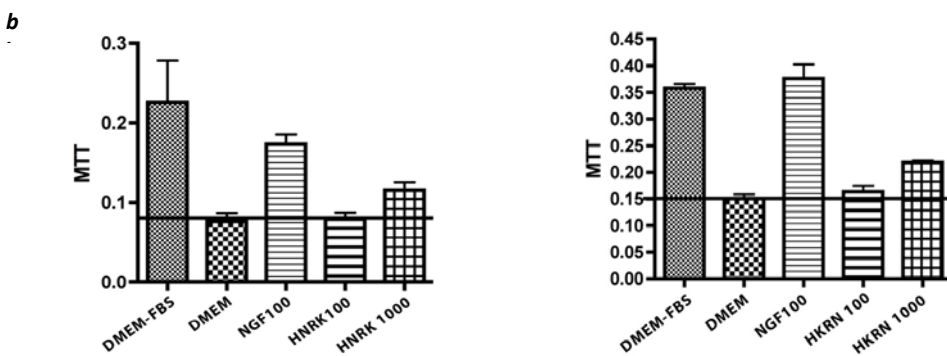
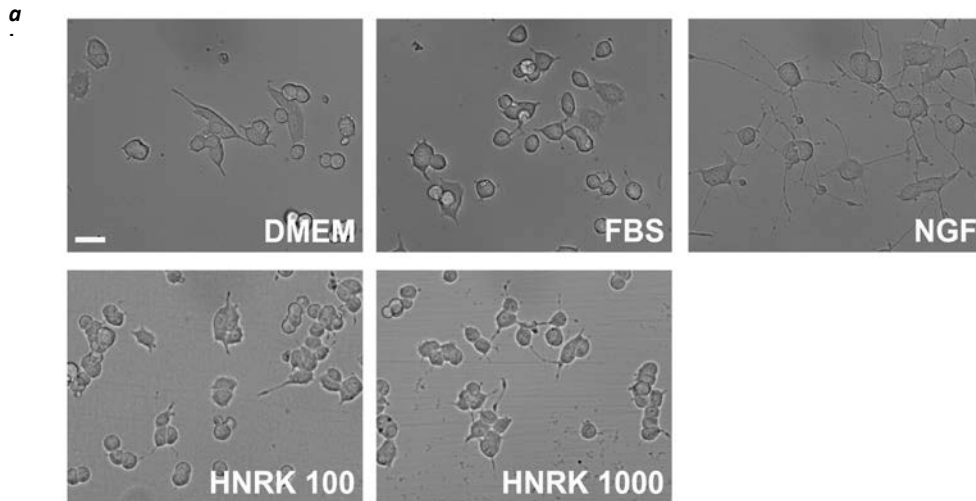
Para analizar la interacción de los vectores con los receptores de membrana celular y determinar si se observa un efecto neurotrófico del motivo RGD de los vectores como fue descrito anteriormente, se estudió el efecto de la exposición de diferentes cantidades de ambos vectores HNRK y HKRN en un modelo de neuronas representado por células de la línea PC12 (Fig. 4.14). Estas células responden a factores neurotróficos como el NGF, y en su ausencia mueren por apoptosis<sup>145</sup>. A partir de los resultados obtenidos por microscopía óptica se puede observar que la exposición con monómeros de HNRK promovió la formación y crecimiento de protoneuritas. Este hecho evidencia que el vector recombinante *per se* es capaz de afectar la morfología de las células expuestas, sugiriendo que este efecto podría estar determinado por una correcta disposición del segmento RGD en la proteína modular<sup>146</sup>. La evaluación mediante reducción de MTT de la supervivencia de las células PC12 en ausencia de suero fetal bovino y tratadas con los vectores HNRK y HKRN mostró que estos vectores no poseen efectos tóxicos, aumentando la supervivencia de las células PC12 (Fig. 4.14 b).

A partir de estos resultados optamos por la elección de **HNRK<sub>5</sub>** como candidato para los ensayos *in vivo*.

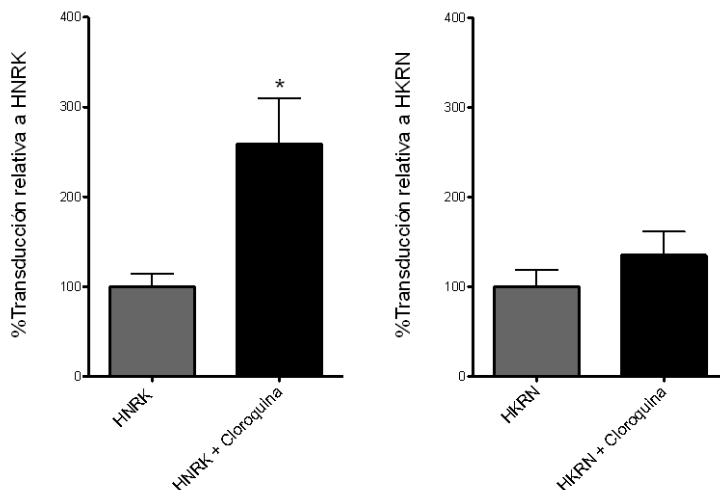
## Ruta de escape endosomal

Para examinar el efecto del dominio H<sub>10</sub>, el cual confiere a los vectores la habilidad de escapar de la ruta lítica endosomal, estudiamos el efecto de la adición de cloroquina al medio de transfección celular y la expresión de la proteína GFP en células HEK293T (Fig. 4.15). La cloroquina es un fármaco utilizado para el tratamiento de la malaria que funciona como agente lítico endosomal por aumento de pH<sup>45; 142; 143</sup>, y es el “gold standard” para determinar si un vector posee limitaciones para escapar de los endosomas.

En la presencia de cloroquina, el porcentaje de células transfectadas aumentó de manera significativa para HNRK, en un 156% mientras que para HKRN los resultados no fueron significativos.



**Figura 4.14: Interacción con receptores de membrana celular.** La incubación de células PC12 con concentraciones crecientes de HNRK (100 ng/ml y 1000 ng/ml) promovió la formación de protoneuritas en estas células (a). Los resultados de la evaluación sobrevida celular por MTT (b) mostraron que estos vectores no resultan tóxicos para las células, aumentando los niveles de sobrevida en presencia de 1000 ng/ml de HNRK o de HKRN. DMEM+FBS= Células mantenidas en DMEM en presencia de un 10% de FBS; DMEM= Células mantenidas en DMEM solo; NGF= Células incubadas con 100 ng/ml de la neurotrofina NGF; HNRK 100= Células incubadas con 100ng/ml de HNRK; HNRK 1000=Células incubadas con 1000 ng/ml de HNRK; HKRN 100= Células incubadas con 100ng/ml HKRN; HKRN 1000= Células incubadas con 1000 ng/ml de HKRN. Los resultados fueron obtenidos luego de 3 días de incubación con los distintos tratamientos. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 4.15: Eficiencia de transducción de los nano-vectores en células en condiciones similares a las que se utilizarán *in vivo* es decir, realizando los experimentos en presencia de cloroquina.** El porcentaje de células HEK293T transducidas con GFP aumentó con la adición de cloroquina en presencia de HNRK no mostrando diferencias significativas para HKRN. Datos de relación óptima, pero en un volumen menor, en 30  $\mu$ l (ya que estadísticamente significativos resultados).

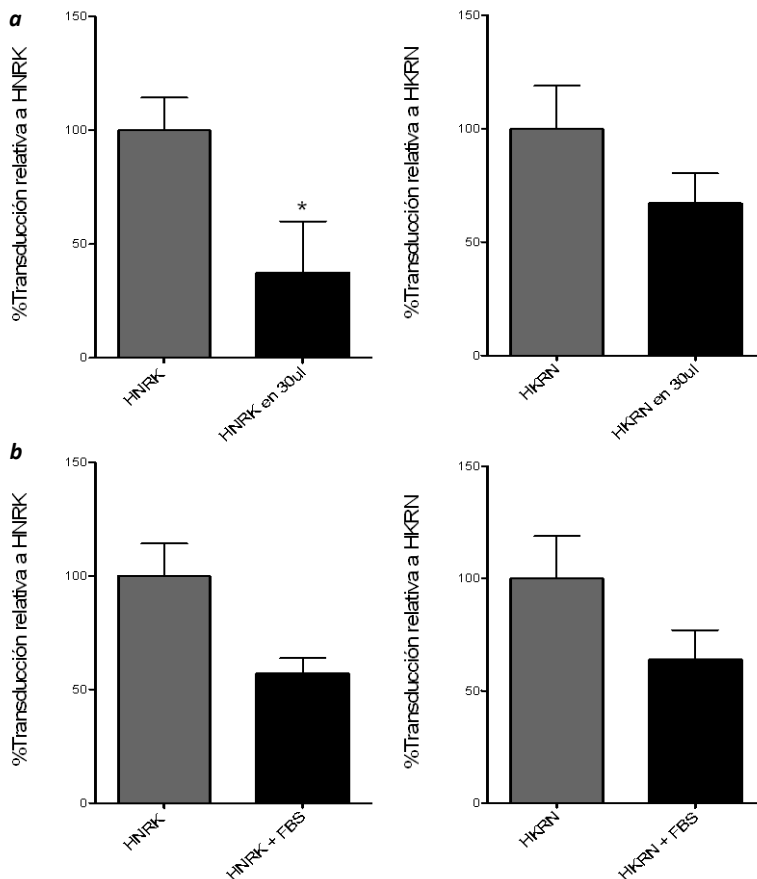


intracerebrales nos permiten inyectar soluciones de volumen acotado) (Figura 4.16 a).

Por otra parte, incubamos la mezcla en presencia de FBS al 10% con el fin de evaluar las posibles interacciones con las proteínas plasmáticas que en muchos casos evitan la transfección *in vivo* tras la administración sistémica por secuestrar los vectores<sup>19</sup> (Figura 4.16 b).

### Efecto del volumen de formación de complejos vector/ADN

Según los resultados obtenidos por citometría de flujo, el volumen de formación de los complejos proteína/ADN influyó en la capacidad de transducción de los nano-vectores (Fig. 4.16 a) disminuyendo de manera significativa un 68% cuando es mediada por HNRK. El volumen no afectó de manera significativa la transfección mediada por HKRN.



### Efecto de la presencia

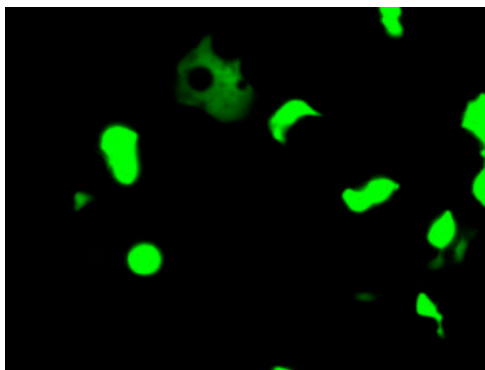
#### de suero

Figura 4.16: Eficiencia de transducción de los nano-vectores en función al volumen de formación de los complejos (a) o en presencia de suero (b). El porcentaje de células HEK293T transfectadas con GFP disminuyó significativamente para los complejos de HNRK formados en 300 µl de volumen en comparación con los formados en 200 µl. También se ve una marcada disminución de la eficiencia de transducción para HNRK en 30 µl con respecto a 200 µl. Para la transfección en presencia de 10% de FBS se puede apreciar una tendencia a la disminución de la eficiencia para ambos vectores. Datos obtenidos por FACS. (\*) resultados estadísticamente significativos.

### Efecto de la liofilización

Por otra parte, comprobamos que la

funcionalidad de los vectores no se ve afectada por su liofilización, ya que se obtuvieron los mismos niveles de expresión de transgén utilizando vectores almacenados a 80°C o liofilizados (Figura 4.17).



**Figura 4.17: Transfección celular utilizando HNRK liofilizado.** Se transfectaron células HEK293T con HNRK liofilizado en su relación 5 con pGFP. Las células lucen en buen estado y la eficiencia de transfección no bajó en comparación con HNRK sin liofilizar.

Análisis comparativo de los distintos vectores para la transducción del SNC *in vivo*, en un modelo de trauma encéfalo-craneano:

#### **Eficiencia de transducción medida por la expresión de GFP *in vivo*.**

Se evaluó comparativamente la capacidad de transfección/transducción a corto y mediano plazo de los distintos vectores (no virales y lentivirus) en el SNC *in vivo* (Tabla 3.2) en un modelo de contusión cortical controlada en rata.

Se cuantificó por ELISA la expresión de la proteína GFP en muestras procesadas de cerebros lesionados y tratados 4 horas post trauma, a corto y mediano plazo (1 día post lesión (dpl) y 14dpl respectivamente).

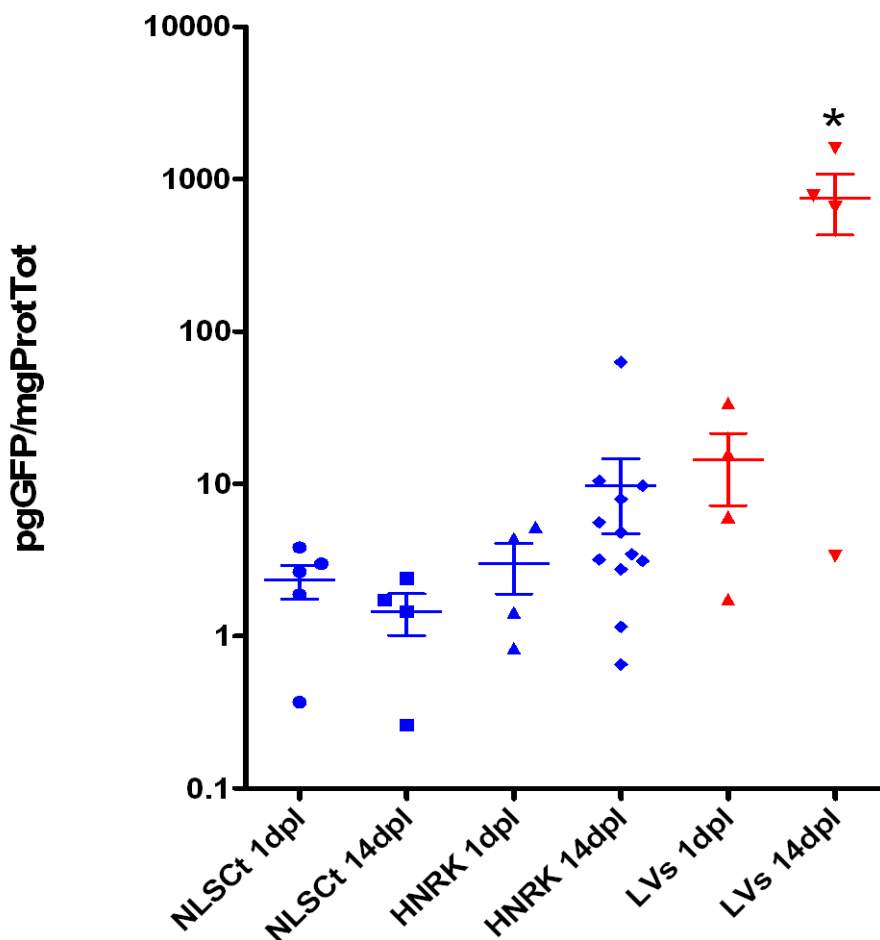


Figura 4.18: Expresión *in vivo*, a corto y mediano plazo de la proteína reportera GFP. Se estudió la expresión de GFP en las muestras de cerebro de los animales tratados con los vectores recombinantes producidos en nuestro laboratorio. Como se puede observar en la figura 4.18, los vectores recombinantes producidos en nuestro laboratorio fueron capaces de mediar la expresión de GFP *in vivo* luego de una lesión traumática, tanto a las 24 horas como a las 2 semanas post trauma. Se puede distinguir una tendencia al aumento de la expresión del transgén por parte del nano-vector HNRK con respecto a NLSCt, si bien los datos no resultan significativos. Grupos en Rojo: Lentivectores 1 y 14dpl; En azul: Vectores recombinantes 1 y 14dpl. Resultados estadísticamente significativos, expresión de GFP (pg/mg) con respecto al control.

traumática, tanto a las 24 horas como a las 2 semanas post trauma. Se puede distinguir una tendencia al aumento de la expresión del transgén por parte del nano-vector HNRK con respecto a NLSCt, si bien los datos no resultan significativos.

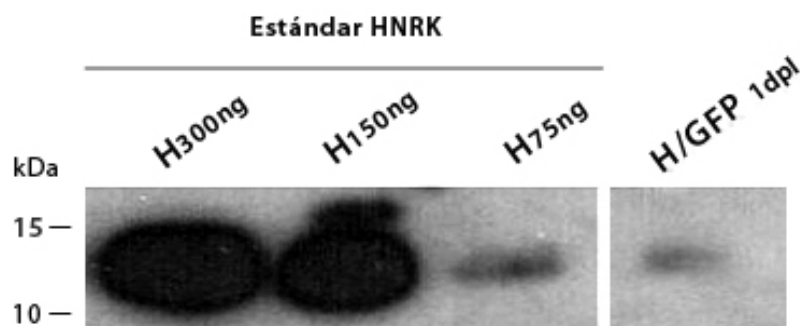
La expresión de GFP en las muestras de cerebros tratados con lentivirus a los 14dpl fue significativamente mayor que la del resto de grupos de animales, lo cual muestra que aumenta la expresión de GFP a las 14 días con respecto a los 3 días del tratamiento con LVs.

Debe destacarse la gran dispersión de los niveles de expresión de GFP entre los animales del mismo grupo.

### Detección de proteínas con dominio de histidina por Western Blot (WB)

Se realizó una inmunodetección por WB con un anticuerpo que se une específicamente a los dominios de histidina, con el fin de evaluar la posible presencia del vector HNRK en las

muestras de cerebros tratados durante 24 hs (Fig. 4.19). Asumimos que a ese tiempo los vectores permanecen en el sistema y podemos ser capaces de detectarlos en los extractos cerebrales.



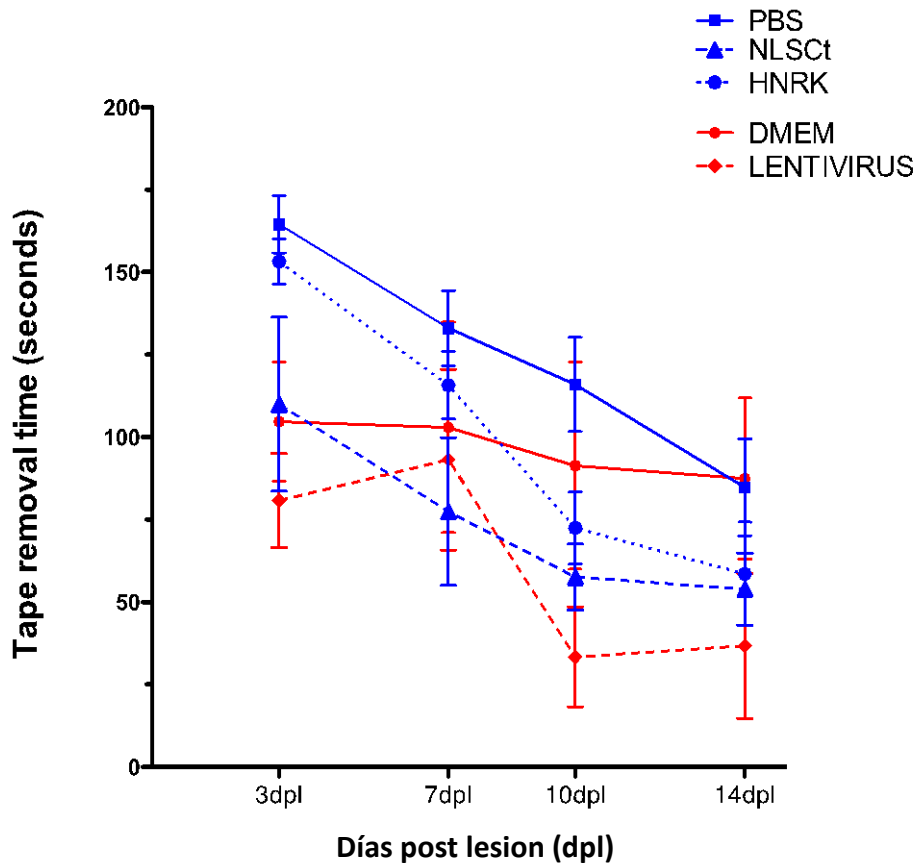
**Figura 4.19: Inmunodetección de HNRK por western blot.** Se realizó un WB utilizando un anticuerpo  $\alpha$ Histidina en extractos de cerebro de ratas de un día post lesión, inyectadas con el vector HNRK/GFP. H300ng, H150ng y H75ng= curva patrón de HNRK purificada; H/GFP 1dpl= Muestra procesada de cerebro de rata 1 día post lesión, inyectada con HNRK/GFP.

Se realizó una curva patrón con estándares de concentración conocida del vector HNRK puro (300ng, 150ng y 75ng) con el fin de cuantificar la concentración del vector en los extractos de cerebro. En los carriles del estándar pudimos observar una banda única a la altura de la esperada validando el ensayo. Fuimos capaces de detectar la presencia del vector HNRK en al menos uno de los 4 animales pertenecientes al grupo HNRK/GFP 1dpl.

Los niveles de proteína detectados se encuentran en el rango de los 75ng, cuantificando por la intensidad de la banda con respecto a la curva patrón de HNRK purificada. Esto sugiere que en las muestras de cerebros procesados, HNRK se encuentra a una concentración en el entorno de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aproximadamente.

### **Determinación y comparación del efecto neuroprotector de los distintos vectores**

Con el fin de determinar un posible efecto neuroprotector mediado por los vectores de terapia génica *per se*, evaluamos la función sensitiva superficial y motora de los animales traumatizados y tratados, mediante el test de la cinta adhesiva (Fig. 4.20).



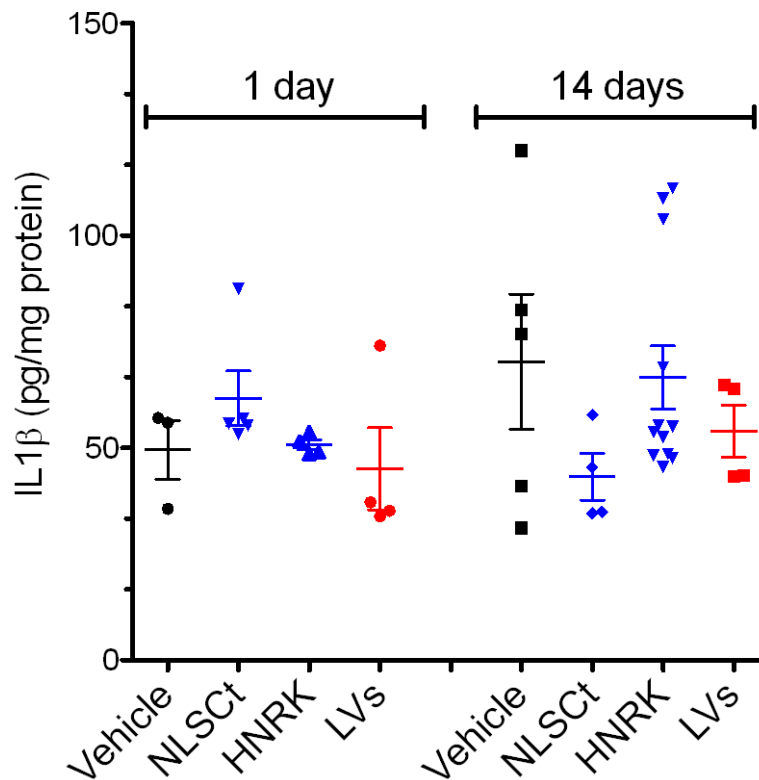
**Figura 4.20: Efecto neuroprotector mediado por los vectores de terapia génica.** Evaluación funcional de los animales traumatizados, luego del tratamiento con los distintos vectores. Los animales fueron sometidos a 4 pruebas funcionales en los días 3, 7, 10 y 14 post lesión. Lentivectores vs. control DMEM /MgCl<sub>2</sub> en rojo; Vectores recombinantes (HNRK y NLScT) vs. control PBS en azul.

Comparamos el efecto de los distintos tratamientos en la función sensitivo-motora de los animales inyectados con los distintos vectores vs. su control específico (animales inyectados con DMEM/MgCl<sub>2</sub> para los lentivectores, y con PBS para los vectores recombinantes). Con este fin, los animales fueron sometidos a 4 pruebas funcionales en los días 3, 7, 10 y 14 post lesión. Los vectores recombinantes (HNRK y NLScT) y su control se muestran en azul, mientras que los lentivectores con su control se muestran en rojo.

Podemos observar en el gráfico que la función sensitivo-motora de la pata contralateral a la lesión (pata afectada) de los animales tratados con los distintos vectores tiende a mejorar significativamente con el tiempo en todos los tratamientos incluyendo los controles PBS, mostrando una mejora espontánea. Los controles DMEM muestran una menor afectación desde el primer día de prueba y no mejoran posteriormente. Los animales tratados con los vectores modulares y los LVs muestran una tendencia a la mejora de estas funciones, aunque esta mejora resulta significativa solo en el caso de los animales tratados con NLScT o HNRK a los 10dpi. De esta forma se observa que no existen efectos tóxicos de los vectores al menos evidenciados por la función sensitivo-motora de la pata delantera afectada.

## Comparación del efecto inmunogénico de los distintos vectores de terapia génica

Se determinaron por ELISA los niveles de expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL1 $\beta$  en los homogenizados de cerebro, con el fin de determinar el posible efecto pro-inflamatorio de los vectores (Fig. 4.20).



**Figura 4.21: Efecto inmunogénico mediado por la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL1 $\beta$ .** Evaluación de los niveles de expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL1 $\beta$  en las muestras procesadas de cerebros lesionados y tratados con los diferentes vectores de terapia génica.

Como podemos observar en la figura, ninguno de los tratamientos provocó cambios significativos en la expresión de dicha citoquina con respecto al vehículo luego de 1 día o 14 días post-lesión. Cuando comparamos la expresión de IL1 $\beta$  a lo largo del tiempo, observamos que en todos los casos la media se mantuvo constante. A partir de estos resultados podemos inferir que estos vectores no resultarían pro-inflamatorios en el tratamiento de lesiones agudas del SNC.

## 5. Discusión:

### Desarrollo de distintos sistemas de vectores para transducción celular

Diversos protocolos de producción y purificación de LVs han sido reportados<sup>34; 51; 52</sup>. En esta tesis fuimos capaces de poner a punto un protocolo de producción de partículas lentivirales por primera vez en nuestro país, obteniéndose títulos elevados adecuados para su utilización in vivo, especialmente luego de la duplicación en la concentración de plásmidos lentivirales durante la transfección de células productoras y la adición de cafeína 4mM al medio de producción, como reportaron previamente Ellis *et al*<sup>34</sup>. Debe destacarse que el método de transfección mediada por fosfato de calcio utilizado para la producción de las partículas lentivirales es poco costoso, lo cual es fundamental para la producción a gran escala de este tipo de vectores. Con estos LVs fuimos capaces de transducir dos líneas celulares con alta eficiencia, entre ellas una línea astrocitaria, sugiriendo que estos puedan funcionar in vivo para la transducción del SNC.

Asimismo, logramos poner a punto un nuevo protocolo de purificación del vector recombinante NLSct, y producirlo en grandes cantidades en forma activa para su uso en terapia génica. Finalmente, obtuvimos los vectores HNRK y HKRN en su forma purificada y en grandes cantidades.

Si bien logramos aumentar de manera significativa el título de los LVs, estos continúan ofreciendo limitaciones a la hora de producirlos y purificarlos a gran escala en comparación con los vectores recombinantes modulares, cuya inocuidad en términos de bioseguridad y su fácil bioproducción los convierten en candidatos de especial interés para su uso en terapia génica.

### Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transducción celular *In vitro*

Luego de estudiar diversas condiciones de transfección y formación de complejos, hemos podido definir la relación proteína/ADN adecuada para la optimización de la transferencia de ADN al núcleo celular mediada por los nano-vectores modulares, resultando en una relación 5 para HNRK y 4.5 para HKRN. Según los resultados publicados por Domingo-Espín *et al.* en el 2011, en el artículo que describe los vectores HNRK y HKRN, el análisis de unidades de retardo

(UR) muestra que el HKRN une todo el ADN antes que el HNRK, siendo 1 UR= r 1.5 para HKRN y r 2.5 para HNRK. Sin embargo, nuestros resultados indican que la relación óptima para cada uno de los vectores es muy parecida cercana a 5, lo que se corresponde a 3 UR para HKRN y 2 UR para HNRK. Esto muestra la incongruencia entre la capacidad de unión al ADN y la capacidad de transfección del vector, resultando más efectivo el HNRK. Esta diferencia entre la capacidad de unión de ADN y la de transfección entre ambos vectores se puede explicar por la conformación terciaria que adoptan estas proteínas en solución con ADN, pudiendo resultar más expuestos unos dominios que otros, de distinta manera en ambos vectores. Es decir, si bien HKRN resultó más efectivo para condensar ADN en solución mediante su dominio K<sub>10</sub>, durante la transfección, probablemente sus dominios RGD no accedan a la interacción con los receptores de membrana celular, disminuyendo así su capacidad de transfección. La accesibilidad de los distintos dominios que los conforman es clave para que los vectores logren cumplir su función de entrega de ADN al núcleo celular. Este punto es retomado más adelante en esta discusión, cuando analizamos las funciones de los dominios RGD y H<sub>6</sub> de escape endosomal.

Por otro lado, también existe una incongruencia entre la dosis de vector que condensa completamente el ADN y la relación a la que transfecta de manera más eficiente cada vector. Es decir, si bien el HNRK condensa completamente el ADN en un gel de retardo en un r= 2.5, su eficiencia de transfección máxima se encuentra en r= 5. Esto puede deberse a que a relaciones mayores que la determinada por 1 UR, el vector posee la misma capacidad para condensar por completo el ADN, con la diferencia que existe una mayor concentración de dominios disponibles para las diferentes funciones que se deben llevar a cabo para el éxito de la transfección celular.

La comparación en los niveles de transfección entre los nano-vectores modulares recombinantes mostró que los vectores HNRK y HKRN poseen una eficiencia de transfección significativamente mayor que el vector NLSct *in vitro*. La transfección *in vitro* mediada por HNRK en su relación 5 y 7.5 y por HKRN en su relación 4.5 promovieron la expresión de cantidades de transgén significativamente mayores que el vector NLSct utilizado en su relación óptima r=33.3 (alrededor de 6 veces más concentrada), indicando que los nano-vectores poseen una mayor capacidad de transfección celular en comparación con su versión anterior NLSct. Esto está en concordancia con los resultados publicados por Domingo-Espín *et al.* en el 2011<sup>72</sup>, donde se muestra por ensayos de transfección con luciferasa que los porcentajes de células transfectadas por HKRN *in vitro* superan significativamente los alcanzados en otras publicaciones por el vector NLSct<sup>84</sup>.



No se observaron efectos tóxicos promovidos por estos vectores *in vitro*, a diferencia de los vectores LVs, que a altas concentraciones podrían resultar tóxicos. Esto se ve evidenciado tras la transducción de células HEK293T con concentraciones crecientes de partículas virales. A mayor concentración se observa un gran porcentaje de células transducidas en el día 1 post transducción, sin embargo en el día 3, el porcentaje de células que expresan GFP disminuye mientras que la intensidad de fluorescencia media aumenta, lo que indica que pocas células se encuentran expresando altas cantidades de transgén. Asimismo, éstas células observadas por contraste de fases lucían redondeadas y despegadas, en agregados de aspecto apoptótico.

En contraste con esto, los nano-vectores modulares no solo no poseen efectos tóxicos en células HEK293T ni células PC12, sino que son capaces de aumentar la supervivencia de las células PC12 en ausencia de FBS. Además, el vector HNRK posee propiedades tróficas *in vitro*, promoviendo el crecimiento y la formación de protoneuritas en células PC12 tras su exposición durante 72 horas. En adición a los resultados obtenidos en esta tesis a los 3 días de incubación con los nano-vectores, resultados publicados en un artículo en colaboración con el Dr. Antoni Villaverde<sup>146</sup> muestran que a los 7 días de incubación con HNRK en dosis repetidas, se pueden observar bajo el microscopio cambios morfológicos en las células PC12 y un incremento marcado en el crecimiento celular medido por la reducción del MTT, alcanzando niveles tróficos similares a los promovidos por la estimulación con el factor de crecimiento nervioso (NGF). Este efecto se le adjudica a la presencia del dominio RGD de interacción con integrinas de membrana. Estos resultados concuerdan con los publicados por Peluffo *et al.*<sup>76; 78</sup>, mostrando que la presencia de este dominio en el vector recombinante NLScT ejerce efectos neuroprotectores *in vivo* e *in vitro* en las células del SNC luego de un daño excitotóxico.

Una de las barreras clave para la transfección celular es el atrapamiento de los vectores en endosomas, que luego se degradarán en lisosomas no llegando nunca al citoplasma celular<sup>1</sup>. La cloroquina es un conocido agente disruptor de la membrana endosomal que se utiliza para facilitar el escape de los complejos de proteína/ADN al citosol de la célula transfectada, evitando así su degradación lisosomal. Este es ampliamente utilizado para evaluar las limitaciones de los vectores en su capacidad de escapar de la ruta lítica endosomal<sup>45; 142; 143</sup>. El tratamiento con cloroquina mejoró de manera significativa la eficiencia del vector HNRK pero no del HKRN. Esto sugiere la posibilidad de aumentar los niveles de expresión del transgén mediada por HNRK o bien realizando modificaciones en el dominio H<sub>6</sub> de escape endosomal, o utilizando dicha droga como agente amplificador en el cóctel de transfección. Asimismo, sugiere que la conformación del vector HKRN permite un mejor escape endosomal en comparación con el vector HNRK.

La inyección de sustancias al SNC posee la complicación de que se trata de un tejido con escaso espacio extracelular, con lo cual la difusión de las moléculas se ve muy disminuida y los volúmenes de inyección no puede superar los 2-5 $\mu$ l. Es por esto que ensayamos la formación de los complejos en volúmenes menores (30 $\mu$ l) para su utilización *in vivo*. Observamos que la eficiencia de transfección celular del nano-vector HNRK se ve afectada en función al volumen de formación de los complejos de proteína/ADN. Esto sugiere que si bien la relación proteína/ADN es importante para la formación de los complejos, la concentración de ambos también es un factor clave. Por otra parte, el vector HKRN no mostró cambios significativos en la eficiencia de transfección luego formación de los complejos en 30 $\mu$ l, si bien se puede apreciar una marcada tendencia a la disminución.

En base a estos resultados y en colaboración con el Dr. Antoni Villaverde se están llevando a cabo estudios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión y Dynamic Light Scattering (DLS) de los complejos, tras la variación del volumen utilizado para la formación de los mismos.

Por otra parte, la forma de almacenamiento de estos vectores también juega un papel importante en la selección del vector, ya que los lentivectores han de mantenerse a -80 $^{\circ}$ C hasta ser utilizados mientras que los vectores recombinantes pueden ser almacenados a -20 $^{\circ}$ C o ser liofilizados sin perder efectividad. Esto es importante a tener en cuenta en la formulación de drogas terapéuticas.

## Comparación de los distintos sistemas de vectores para la transducción del SNC *In vivo* en un modelo de trauma encéfalo-craneano

Si bien muchos vectores son capaces de transferir ADN o ARN a células *in vitro*, es clave la determinación de su capacidad de transferencia *in vivo*, especialmente en modelos de neuropatologías en las cuales ocurren grandes cambios moleculares y tisulares. Es de particular importancia encontrar un método que permita la sobre-expresión de genes terapéuticos para tratar células del SNC bajo estas circunstancias patológicas y más beneficioso aún si este posee efectos tróficos *per se* para las células del sistema nervioso<sup>79</sup>. Es por este motivo que analizamos la capacidad del vector HNRK de mediar la sobre-expresión del transgén en un modelo clínicamente relevante de lesión cerebral aguda. Elegimos este vector por mostrar una buena eficiencia de transfección *in vitro* en diferentes relaciones proteína/ADN cuando se compara con el vector HKRN, además del elevado potencial trófico

mostrado *in vitro* en el modelo de neuronas PC12 (Figura 4.14) <sup>146</sup>. El nano-vector recombinante HNRK fue capaz de promover la expresión del transgén *in vivo* en el SNC luego de una lesión aguda, tanto a las veinticuatro horas como, para nuestra sorpresa, a las dos semanas de ocurrida la lesión.

Los niveles de expresión mediados por nano-vector HNRK *in vivo* se encuentran en el rango de los determinados por su versión anterior, el vector NLSct, observándose una tendencia al aumento de la expresión mediada por el primero, lo cual se relaciona con lo observado *in vitro*. Según los resultados obtenidos *in vitro*, la expresión mediada por HNRK podría verse aumentada con la adición de cloroquina en el medio de transfección, colaborando en el escape de los complejos de la vía lítica endosomal y aumentando así su eficiencia de transfección de manera significativa. A partir de esto podríamos evaluar la expresión del transgén tras la administración *in vivo* de cloroquina junto a los complejos de transfección. La cloroquina es una droga que se utiliza comúnmente para el tratamiento contra la malaria <sup>147; 148</sup>, con lo cual se encuentra establecida para su administración *in vivo*.

Para estudiar la vida media del vector luego de inyectado en el cerebro, se realizó un western blot con las muestras procesadas de animales inyectados con HNRK y sacrificados a las 24 hs. Fuimos capaces de detectar la presencia del vector HNRK en al menos una de las cuatro muestras de cerebro procesadas para western blot. La cuantificación por intensidad de la banda en comparación con los estándares indica que ésta se encuentra en el homogenizado a una concentración en el rango de 1 ng/ $\mu$ l. La banda positiva fue muy tenue, por lo que podríamos inferir que en las otras muestras la proteína se encuentran por debajo de los límites de detección del ensayo. Es por ello que no podemos asegurar la ausencia del vector en el resto de los homogenizados sin antes aumentar la sensibilidad de método de detección.

Todos los animales expresaron GFP, lo cual sugiere que fueron inyectados correctamente y el vector fue capaz de entregar su carga correctamente.

Analizamos también la presencia del suero durante la transfección con los nano-vectores modulares *in vitro*. Si bien podemos apreciar una tendencia a la disminución en la eficiencia de transfección celular, ésta no resulta significativa. Este resultado posee una gran relevancia clínica para el diseño de drogas terapéuticas de administración intravenosa basadas en terapia génica. La capacidad de transfección en presencia de suero nos da la pauta de que estos vectores se podrían utilizar tras su administración sistémica de manera efectiva. En base a estos resultados actualmente se encuentran en proceso de desarrollo análisis comparativos de eficiencia de transfección en diferentes órganos tras la administración intravenosa de los nano-vectores HNRK y HKRN en ratones control o traumatizados.

Dos puntos clave en la selección de un vector para su utilización en un paradigma terapéutico o experimental son los niveles de expresión que logran inducir y el patrón temporal de la expresión del transgén, que incluye no solo la duración de la expresión en el tiempo sino también la velocidad en el inicio de la expresión del transgén terapéutico luego de su administración. Esto último es particularmente importante a tener en cuenta en el tratamiento de lesiones agudas del SNC, dado que muchos cambios ocurren en las primeras horas y la ventana terapéutica es escasa<sup>131; 132</sup>. Se ha demostrado que los LVs son muy efectivos para la transducción *in vivo* de la mayoría de las células del SNC<sup>3; 47; 48</sup>, mostrando un gran potencial neuroprotector para el tratamiento de diversas neuropatologías. Sin embargo, no existen trabajos comparando directamente nano-vectores modulares recombinantes con LVs en un mismo sistema experimental y por los mismos investigadores. Este fue uno de los objetivos más importantes de la tesis. Observamos que los lentivectores fueron capaces de promover altos niveles de expresión de transgén de manera eficiente en el SNC *in vivo* luego de una lesión aguda. La expresión de GFP se detecta a partir del día 1 post lesión, observándose un gran aumento a las 2 semanas de producido el daño. Esto se correlaciona con lo observado *in vitro*, donde la expresión del transgén es detectada a partir de las 24 horas, aumentando en tiempos posteriores. Cuando se comparan los niveles y el patrón temporal de expresión de GFP por los LVs y los vectores modulares se puede apreciar que ambos funcionan para la rápida producción de proteína transgénica, en contra de lo originalmente hipotetizado, que los LVs poseían períodos de transducción más lentos que otros vectores. Esto sugiere que ambos sistemas de vectores poseen el potencial de producir niveles biológica y terapéuticamente relevantes de proteína transgénica *in vivo*.

Por otra parte, nos encontramos realizando análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-GFP en cortes de cerebros lesionados y tratados (ver tabla 3.2) con el fin de detectar el tipo celular transducido/transfectado por cada vector.

Cabe destacar que la expresión estable de una proteína terapéutica para el tratamiento de enfermedades agudas o desórdenes adquiridos como trauma puede resultar beneficiosa o contraproducente/nociva. Se ha visto en ensayos utilizando vectores virales, que el efecto de la sobre-expresión de factores tróficos como el GDNF o BDNF mantenidos a altos niveles por tiempos prolongados se torna tóxico<sup>17; 18</sup>. Por otra parte el aprovechamiento de la ventana terapéutica para tratar lesiones traumáticas por ejemplo mediante la modificación de los niveles de expresión de distintas citoquinas en la lesión secundaria, requiere de una regulación muy fina de la expresión de las mismas, ya que éstas se encuentran en muy bajas concentraciones en condiciones normales del organismo. Como ya es sabido, pequeños desbalances en el perfil de expresión de estas citoquinas puede generar consecuencias nocivas

mediadas por un aumento de la respuesta inmune. Es por este motivo que niveles transgénicos elevados de algunas de estas citoquinas pueden exacerbar la neuropatología en lugar de reducirla.

En el caso de los LVs, la presencia de elementos regulables <sup>149</sup> podría permitir mantener los niveles de expresión transgénica en los rangos terapéuticos deseados.

Otro punto muy determinante en la selección de un vector es su perfil de toxicidad o inflamatorio/inmunogénico. Como vimos en la introducción, muchos vectores pueden resultar tóxicos o pro-inflamatorios, desmielinizantes u oncogénicos <sup>1; 10; 12; 16; 20; 21; 24-26</sup>. En esta tesis observamos que los vectores utilizados no ejercen efectos tóxicos *in vivo*, al menos evidenciables por la función sensitivo-motora de la pata delantera afectada. De hecho, tanto el vector NLSCt como el HKRN mostraron efectos protectores frente a las lesiones traumáticas corticales del SNC. El tratamiento con estos vectores resulta en un aumento significativo del desempeño funcional de los animales tratados en comparación con el control a los 10dpl. En concordancia, el vector NLSCt producido en este proyecto fue analizado *in vivo* en un modelo de trauma llevado a cabo por el Dr. Eliseo Taranto, obteniendo resultados que sugieren una neuroprotección observada en la misma prueba sensitivo-motora utilizada en esta tesis, hasta los 21dpl. Esto también concuerda con resultados publicados por Peluffo *et al.* <sup>76; 78</sup>, que muestran que el dominio RGD del vector NLSCt es capaz de promover la neuroprotección en un modelo de lesión excitotóxica del SNC.

En todos los casos, los tratamientos resultaron en una tendencia hacia el mejoramiento del desempeño funcional de los animales lesionados. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos a los 14dpl, dada la tendencia a la mejora en la función sensitivo-motora, en conjunto con los resultados obtenidos *in vitro* en células PC12 y los publicados por nuestro grupo en colaboración con el de Antoni Villaverde, <sup>72; 78</sup> podríamos concluir que el dominio RGD de los vectores modulares aquí estudiados ejerce sus efectos tróficos en las células del SNC *in vivo*. No podemos confirmar los efectos neuroprotectores del vector HNRK a largo plazo sin antes aumentar el n y los tiempos experimentales. Con el mismo fin, deberían obtenerse muestras histológicas en paralelo para evidenciar las posibles variaciones en los volúmenes de lesión de los animales tratados con los distintos vectores mediante la utilización de la técnica de Nissl.

Por otra parte los controles de medio de cultivo DMEM resultaron en una menor pérdida de la función sensitivo-motora de los animales en la primera fase de la evolución de la lesión, en comparación con los controles PBS. Esto sugiere que se podría mejorar el potencial protector

de HNRK realizando la formación de los complejos en DMEM, en correlación con los resultados obtenidos tras los ensayos *in vitro*, donde comprobamos que este medio resulta efectivo para la transfección celular.

Analizando la gran dispersión de los datos obtenidos tanto de la eficiencia de transducción de HNRK *in vivo* como de su potencial neuroprotector, decidimos llevar a cabo estudios morfológicos y funcionales (en proceso actualmente) analizando los efectos de la variación en los tiempos de incubación de los complejos vector/ADN. Esto se debe a que por determinantes del protocolo de lesiones *in vivo*, el tiempo entre la inyección del primer animal y el último con vector es de alrededor de cuatro horas. Es decir, algunos animales fueron inyectados con el vector producido por la incubación de los complejos proteína/ADN durante 20 minutos mientras que otros por tiempos de hasta 4 horas. Esto podría resultar en variaciones en la funcionalidad o disposición del vector, determinando diferentes niveles de expresión del transgén *in vivo*. Asimismo, variaciones la disposición espacial de los complejos podrían resultar en cambios en la exposición de sus dominios RGD, lo que influenciaría directamente en la función trófica o protección mediada por este dominio, determinando los diferentes niveles de protección sensitivo-motora.

Por último, como se comentó previamente, el perfil pro-inflamatorio de un vector es clave para su utilización luego de lesiones agudas del SNC, en las cuales la modulación de la inflamación es crítica para la disminución de la lesión secundaria progresiva. Las citoquinas actúan como mediadores autócrinos o parácrinos en la modulación de la respuesta inflamatoria luego de una lesión o infección<sup>111; 113</sup>. Entre ellas, la IL1 $\beta$  es una de las principales citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la respuesta post traumática<sup>150</sup>, jugando un importante rol en la apoptosis, disrupción de la barrera hemato-encefálica y edema<sup>119</sup>. Estudios realizados en animales sugieren que la presencia de estas citoquinas en la fase inicial de respuesta al trauma resulta nociva, mientras que su supresión reduce el edema y daño tisular, mejorando de esta manera el desempeño funcional<sup>119; 151</sup>. Es por este motivo que nos propusimos analizar los niveles de expresión de la IL1 $\beta$  luego del tratamiento con los distintos vectores.

Ninguno de los vectores utilizados en este estudio resultó pro-inflamatorio luego de su inyección en lesiones traumáticas de cerebro, basándonos en la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL1 $\beta$  entre los días 1 y 14 post lesión. Los niveles de expresión de esta citoquina en los distintos tratamientos se mantuvieron constantes con respecto a los animales inyectados con vehículo, con una media en el rango de los 50 pg/ml de proteína. Esto concuerda con los

resultados obtenidos por Acarín *et al*<sup>123</sup> en un modelo de excitotoxicidad en rata, donde los niveles de IL1 fueron valorados por ELISA a lo largo del tiempo. Ellos determinan una media de expresión de dicha citoquina en niveles similares a los obtenidos en este estudio, observándose un pico de expresión de IL1 $\beta$  entre las 10 y 24 horas post lesión. En este sentido podríamos decir que si bien nos podríamos estar perdiendo el pico de expresión de IL1 $\beta$ , la expresión inducida por los distintos tratamientos no se desviaría de la media normal esperada por la propia lesión. En este sentido y para confirmar la inocuidad de los vectores en términos inflamatorios, nos encontramos realizando ensayos inmunohistoquímicos en cortes de cerebros de animales lesionados/tratados (tabla 3.2), para la detección de otros marcadores pro-inflamatorios como iNOS, reclutamiento de linfocitos CD8<sup>+</sup> o lectina de tomate para evaluar la reactividad microglial en los cortes.

## 6. Conclusiones

- Los vectores HNRK y HKRN son más eficientes que el vector NLSct para la transducción de células *in vitro*, pero podrían mejorarse modificando el dominio de escape endosomal, o co-administrando cloroquina.
- El nano-vector HNRK es apto para su utilización como vehículo de transferencia de material genético en estudios de terapia génica de SNC, promoviendo la expresión de niveles biológicamente relevantes de transgén *in vivo* luego de una lesión traumática, sin ejercer efectos tóxicos o inmunogénicos apreciables hasta los 14 días post lesión y tendiendo a mejorar la transfección mediada por NLSct.
- Este vector podría poseer el potencial de ser llevado a la clínica dada su inocuidad y su capacidad para mediar la expresión de transgén transcurrido un tiempo considerable de ocurrida una lesión traumática (4hs). El tiempo transcurrido entre la inducción de la lesión y el tratamiento posee relevancia clínica, ya que generalmente transcurren varias horas entre la hospitalización del paciente, el diagnóstico de tipo de TEC y comienzo de tratamiento.
- Este vector resulta neuroprotector o neurotrófico a corto plazo, sin embargo para confirmar este efecto a largo plazo se deben realizar estudios aumentando los tiempos experimentales.
- Los vectores lentivirales resultaron muy efectivos para la transducción *in vivo* del SNC luego de una lesión traumática, promoviendo la expresión transgenes desde el día 1 post lesión y aumentando los niveles de expresión hacia los 14 días, sin promover efectos tóxicos o pro-inflamatorios valorables por nuestros ensayos. Habría aumentar el n experimental para confirmar la tendencia a la neuroprotección mediada por la preparación lentiviral.



## 7. Comunicaciones científicas

### Artículos científicos

- Domingo-Espin, J., Petegnief, V., de Vera, N., Conchillo-Sole, O., Saccardo, P., Unzueta, U., Vazquez, E., Cedano, J., Negro, L., Daura, X., et al. (2012). RGD-based cell ligands for cell-targeted drug delivery act as potent trophic factors. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8, 1263-1266.

### Congresos Nacionales

- XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Presentación Oral en la mesa de terapia génica. “Virus Artificiales para la Transducción del Sistema Nervioso”
- Negro, L., Domingo-Espín, J., Vazquez E., Ferrer, N., Villaverde, A., Sayós, J., Barbeito, L., Peluffo, H. Piriápolis, 9/2012.
- 7<sup>as</sup> Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM) Poster “Vectores Lentivirales: Herramientas efectivas para la Transducción Celular”. Negro, L., Peluffo, H., Barbeito, L. Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de Medicina, 11/2011.
- XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Poster “Vectores Lentivirales para la Transducción Celular”. Negro, L., Peluffo, H., Barbeito, L. Piriápolis, 5/2010.
- XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Taranto, E., Alí, D., Negro, L., Biestro, A., Peluffo, H. Efectos de la terapia génica en el tratamiento de las lesiones cerebrales traumáticas. Piriápolis, 5/2010.
- 6<sup>tas</sup> Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM) Presentación de poster “Vectores Lentivirales: Herramientas efectivas para la Transducción Celular”. Negro, L., Peluffo, H., Barbeito, L. Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de Ciencias, 11/2009.

### Congresos Internacionales

- 8th FENS Forum of Neuroscience. Presentación de Poster “Study of the Immune Receptor CD300f in Acute Brain Damage: Gene Therapy for Neuroprotection”. Negro, L., Peluffo, H., Sayós, J. Barcelona, 7/2012

## 8. Agradecimientos:

Agradezco a todos los que participaron del desarrollo de esta tesis, tanto en lo académico como en lo personal.

A los miembros del jurado por sus críticas y su buena disposición.

A Hugo, que me permitió realizar este proyecto y me ayudó y alentó a llegar hasta aquí.

A Luis.

A Javier Ganz, a mis compañeras de laboratorio, en especial a mi amiga Patricia C. que me dio su apoyo en todo momento.

A los miembros de la cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, en especial a Mariela, Ernesto, Sebastián y Patricia.

A la ANII por proporcionarme apoyo económico para el desarrollo de este proyecto.

A Cecilia Giacomini de la Facultad de Química, UDELAR y a Antoni Villaverde de la UAB por permitirme realizar estancias de aprendizaje en sus laboratorios.

A los miembros del Laboratorio de Biología Celular del IPmont, en especial a Sabina, que me ayudó con los análisis citométricos.

A los chicos de la UPR, y a Gonzalo que me guió en la incursión al mundo de la bioquímica de proteínas.

A todos los miembros del Instituto que siempre me ofrecieron su ayuda cuando la necesité.

A Guido que me dio todo su apoyo, amor y paciencia, y me ayudó con el armado de esta tesis y la edición de las imágenes.

A mi familia por ser siempre incondicional.

## 9. Bibliografía:

1. Mastrobattista, E., Bravo, S.A., van der Aa, M., and Crommelin, D.J.A. (2005). Nonviral gene delivery systems: From simple transfection agents to artificial viruses. *Drug Discovery Today: Technologies* 2, 103-109.
2. Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 12, 316-328.
3. Peluffo, H., Foster, E., Ahmed, S.G., Lago, N., Hutson, T.H., Moon, L., Yip, P., Wanisch, K., Caraballo-Miralles, V., Olmos, G., et al. (2013). Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the spinal cord. *Gene therapy* 20, 645-657.
4. Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11, 636-646.
5. Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *The Journal of Gene Medicine* 15, 65-77.
6. Feng, L.R., and Maguire-Zeiss, K.A. (2010). Gene therapy in Parkinson's disease: rationale and current status. *CNS Drugs* 24, 177-192.
7. Mandel, R.J., Burger, C., and Snyder, R.O. (2008). Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production. *Exp Neurol* 209, 58-71.
8. Lim, S.T., Airavaara, M., and Harvey, B.K. (2010). Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS. *Pharmacol Res* 61, 14-26.
9. Eberling, J.L., Jagust, W.J., Christine, C.W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70, 1980-1983.
10. Lehrman, S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518.
11. Annoni, A., Goudy, K., Akbarpour, M., Naldini, L., and Roncarolo, M.G. (2013). Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy. *Transl Res* 161, 230-240.
12. Ferrer-Miralles, N., Vazquez, E., and Villaverde, A. (2008). Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. *Trends Biotechnol* 26, 267-275.
13. Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S.E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E., and Wilson, J.M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nature medicine* 3, 306-312.
14. Zeng, J., Du, J., Lin, J., Bak, X.Y., Wu, C., and Wang, S. (2009). High-efficiency transient transduction of human embryonic stem cell-derived neurons with baculoviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1585-1593.
15. Yanez-Munoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., et al. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nature medicine* 12, 348-353.

16. Howe, S.J., Mansour, M.R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempfski, H., Brugman, M.H., Pike-Overzet, K., Chatters, S.J., de Ridder, D., et al. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation* 118, 3143-3150.
17. Kells, A.P., Henry, R.A., and Connor, B. (2008). AAV-BDNF mediated attenuation of quinolinic acid-induced neuropathology and motor function impairment. *Gene therapy* 15, 966-977.
18. Touchard, E., Heiduschka, P., Berdugo, M., Kowalczyk, L., Bigey, P., Chahory, S., Gandolphe, C., Jeanny, J.C., and Behar-Cohen, F. (2012). Non-viral gene therapy for GDNF production in RCS rat: the crucial role of the plasmid dose. *Gene therapy* 19, 886-898.
19. Peluffo, H. (2011). Modular Multifunctional Protein Vectors for Gene Therapy. In *Non-Viral Gene Therapy*, X.-b. Yuan, ed. (
20. Lundstrom, K. (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 21, 117-122.
21. Mastrobattista, E., van der Aa, M.A., Hennink, W.E., and Crommelin, D.J. (2006). Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature reviews Drug discovery* 5, 115-121.
22. (2012). European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval. In. (European Medicines Agency.
23. (2012). Alipogene Tiparvovec (Glybera®) - a Gene Therapy for LPLD. In Glybera® (alipogene tiparvovec) has been approved by the European Commission for commercialization in the European Union It is the first gene therapy to receive approval in the Western world, Uniquire, ed. (
24. Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244-2245.
25. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular genetics and metabolism* 80, 148-158.
26. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., et al. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 348, 255-256.
27. Azzouz, M., Kingsman, S.M., and Mazarakis, N.D. (2004). Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders. *J Gene Med* 6, 951-962.
28. Mingozi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007). CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature medicine* 13, 419-422.
29. Yuasa, K., Yoshimura, M., Urasawa, N., Ohshima, S., Howell, J.M., Nakamura, A., Hijikata, T., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene therapy* 14, 1249-1260.
30. Pluta, K., and Kacprzak, M.M. (2009). Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 56, 531-595.

31. Rodrigues, A., Alves, P.M., and Coroadinha, A. (2011). Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. In *Viral Gene Therapy*, D.K. Xu, ed. (
32. Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY).
33. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-11388.
34. Ellis, B.L., Potts, P.R., and Porteus, M.H. (2011). Creating higher titer lentivirus with caffeine. *Hum Gene Ther* 22, 93-100.
35. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
36. Vigna, E., and Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2, 308-316.
37. Lundberg, C., Bjorklund, T., Carlsson, T., Jakobsson, J., Hantraye, P., Deglon, N., and Kirik, D. (2008). Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders. *Curr Gene Ther* 8, 461-473.
38. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
39. Suzuki, Y., and Suzuki, Y. (2011). Gene Regulatable Lentiviral Vector System.
40. Richardson, J.H., Kaye, J.F., Child, L.A., and Lever, A.M. (1995). Helper virus-free transfer of human immunodeficiency virus type 1 vectors. *J Gen Virol* 76 ( Pt 3), 691-696.
41. Boudreau, R.L., and Davidson, B.L. (2006). RNAi therapy for neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 75, 73-92.
42. Jakobsson, J., and Lundberg, C. (2006). Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 484-493.
43. Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I.M., and Gage, F.H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641-6649.
44. Wong, L.F., Azzouz, M., Walmsley, L.E., Askham, Z., Wilkes, F.J., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., and Mazarakis, N.D. (2004). Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 101-111.
45. Kim, E.S., Yang, S.W., Hong, D.K., Kim, W.T., Kim, H.G., and Lee, S.K. (2010). Cell-penetrating DNA-binding protein as a safe and efficient naked DNA delivery carrier in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 9-15.
46. Azzouz, M., Le, T., Ralph, G.S., Walmsley, L., Monani, U.R., Lee, D.C., Wilkes, F., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Burghes, A.H., et al. (2004). Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *The Journal of clinical investigation* 114, 1726-1731.
47. Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J.C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C.E., and Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of

- SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nature medicine* 11, 423-428.
48. Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., et al. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature medicine* 11, 429-433.
  49. Yip, P.K., Wong, L.F., Pattinson, D., Battaglia, A., Grist, J., Bradbury, E.J., Maden, M., McMahon, S.B., and Mazarakis, N.D. (2006). Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 15, 3107-3118.
  50. Zhao, C., Strappe, P.M., Lever, A.M., and Franklin, R.J. (2003). Lentiviral vectors for gene delivery to normal and demyelinated white matter. *Glia* 42, 59-67.
  51. Zufferey, R. (2002). Production of Lentiviral Vectors. In *Lentiviral Vectors*, D. Trono, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp 107-121.
  52. Mitta, B., Rimann, M., and Fussenegger, M. (2005). Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high-performance HIV-1-derived lentiviral particles. *Metab Eng* 7, 426-436.
  53. Salem, A.K., Searson, P.C., and Leong, K.W. (2003). Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nat Mater* 2, 668-671.
  54. Smull, C.E., and Ludwig, E.H. (1962). Enhancement of the plaque-forming capacity of poliovirus ribonucleic acid with basic proteins. *J Bacteriol* 84, 1035-1040.
  55. Vijayanathan, V., Thomas, T., and Thomas, T.J. (2002). DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry* 41, 14085-14094.
  56. Saccardo, P., Villaverde, A., and Gonzalez-Montalban, N. (2009). Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy. *Biotechnol Adv* 27, 432-438.
  57. Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 60, 149-160.
  58. Oishi, M., Nagasaki, Y., Nishiyama, N., Itaka, K., Takagi, M., Shimamoto, A., Furuichi, Y., and Kataoka, K. (2007). Enhanced growth inhibition of hepatic multicellular tumor spheroids by lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate formulated in PEGylated polyplexes. *ChemMedChem* 2, 1290-1297.
  59. Bragonzi, A., Boletta, A., Biffi, A., Muggia, A., Sersale, G., Cheng, S.H., Bordignon, C., Assael, B.M., and Conese, M. (1999). Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene therapy* 6, 1995-2004.
  60. Schatzlein, A.G. (2003). Targeting of Synthetic Gene Delivery Systems. *J Biomed Biotechnol* 2003, 149-158.
  61. Corchero, J.L., and Villaverde, A. (2009). Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol* 27, 468-476.
  62. Lechardeur, D., Verkman, A.S., and Lukacs, G.L. (2005). Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 755-767.
  63. Pante, N., and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13, 425-434.
  64. Capecchi, M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479-488.
  65. Aris, A., and Villaverde, A. (2004). Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol* 22, 371-377.

66. Aris, A., Feliu, J.X., Knight, A., Coutelle, C., and Villaverde, A. (2000). Exploiting viral cell-targeting abilities in a single polypeptide, non-infectious, recombinant vehicle for integrin-mediated DNA delivery and gene expression. *Biotechnol Bioeng* 68, 689-696.
67. Aris, A., and Villaverde, A. (2000). Molecular organization of protein-DNA complexes for cell-targeted DNA delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 455-461.
68. Peluffo, H., Aris, A., Acarin, L., Gonzalez, B., Villaverde, A., and Castellano, B. (2003). Nonviral gene delivery to the central nervous system based on a novel integrin-targeting multifunctional protein. *Hum Gene Ther* 14, 1215-1223.
69. Fominaya, J., and Wels, W. (1996). Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 271, 10560-10568.
70. Villaverde, A., Feliu, J.X., Harbottle, R.P., Benito, A., and Coutelle, C. (1996). A recombinant, arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif from foot-and-mouth disease virus binds mammalian cells through vitronectin and, to a lower extent, fibronectin receptors. *Gene* 180, 101-106.
71. Villaverde, A., Feliu, J.X., Aris, A., Harbottle, R.P., Benito, A., and Coutelle, C. (1998). A cell adhesion peptide from foot-and-mouth disease virus can direct cell targeted delivery of a functional enzyme. *Biotechnol Bioeng* 59, 294-301.
72. Domingo-Espin, J., Vazquez, E., Ganz, J., Conchillo, O., Garcia-Fruitos, E., Cedano, J., Unzueta, U., Petegnief, V., Gonzalez-Montalban, N., Planas, A.M., et al. (2011). Nanoparticulate architecture of protein-based artificial viruses is supported by protein-DNA interactions. *Nanomedicine (Lond)* 6, 1047-1061.
73. Vazquez, E., Roldan, M., Diez-Gil, C., Unzueta, U., Domingo-Espin, J., Cedano, J., Conchillo, O., Ratera, I., Veciana, J., Daura, X., et al. (2010). Protein nanodisk assembling and intracellular trafficking powered by an arginine-rich (R9) peptide. *Nanomedicine (Lond)* 5, 259-268.
74. Xavier, J., Singh, S., Dean, D.A., Rao, N.M., and Gopal, V. (2009). Designed multi-domain protein as a carrier of nucleic acids into cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 133, 154-160.
75. Vazquez, E., Cubarsi, R., Unzueta, U., Roldan, M., Domingo-Espin, J., Ferrer-Miralles, N., and Villaverde, A. (2010). Internalization and kinetics of nuclear migration of protein-only, arginine-rich nanoparticles. *Biomaterials* 31, 9333-9339.
76. Peluffo, H., Acarin, L., Aris, A., Gonzalez, P., Villaverde, A., Castellano, B., and Gonzalez, B. (2006). Neuroprotection from NMDA excitotoxic lesion by Cu/Zn superoxide dismutase gene delivery to the postnatal rat brain by a modular protein vector. *BMC Neurosci* 7, 35.
77. Peluffo, H., Ali-Ruiz, D., Ejarque-Ortiz, A., Heras-Alvarez, V., Comas-Casellas, E., Martinez-Barriocanal, A., Kamaid, A., Alvarez-Errico, D., Negro, M.L., Lago, N., et al. (2011). Overexpression of the immunoreceptor CD300f has a neuroprotective role in a model of acute brain injury. *Brain Pathol* 22, 318-328.
78. Peluffo, H., Gonzalez, P., Aris, A., Acarin, L., Saura, J., Villaverde, A., Castellano, B., and Gonzalez, B. (2007). RGD domains neuroprotect the immature brain by a glial-dependent mechanism. *Ann Neurol* 62, 251-261.
79. Gonzalez, P., Peluffo, H., Acarin, L., Villaverde, A., Gonzalez, B., and Castellano, B. (2012). Interleukin-10 overexpression does not synergize with the neuroprotective action of RGD-containing vectors after postnatal brain

- excitotoxicity but modulates the main inflammatory cell responses. *Journal of neuroscience research* 90, 143-159.
80. Smith, A.E., and Helenius, A. (2004). How viruses enter animal cells. *Science* 304, 237-242.
  81. Stewart, P.L., Dermody, T.S., and Nemerow, G.R. (2003). Structural basis of nonenveloped virus cell entry. *Adv Protein Chem* 64, 455-491.
  82. Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262, 4429-4432.
  83. Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., and Birnstiel, M.L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3410-3414.
  84. Aris, A., and Villaverde, A. (2003). Engineering nuclear localization signals in modular protein vehicles for gene therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 625-631.
  85. Ma, N., Wu, S.S., Ma, Y.X., Wang, X., Zeng, J., Tong, G., Huang, Y., and Wang, S. (2004). Nerve growth factor receptor-mediated gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 270-281.
  86. Zeng, J., Too, H.P., Ma, Y., Luo, E.S., and Wang, S. (2004). A synthetic peptide containing loop 4 of nerve growth factor for targeted gene delivery. *J Gene Med* 6, 1247-1256.
  87. Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., and Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43.
  88. Navarro-Quiroga, I., Antonio Gonzalez-Barrios, J., Barron-Moreno, F., Gonzalez-Bernal, V., Martinez-Arguelles, D.B., and Martinez-Fong, D. (2002). Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain research Molecular brain research* 105, 86-97.
  89. Arango-Rodriguez, M.L., Navarro-Quiroga, I., Gonzalez-Barrios, J.A., Martinez-Arguelles, D.B., Bannon, M.J., Kouri, J., Forgez, P., Rostene, W., Garcia-Villegas, R., Jimenez, I., et al. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1009-1020.
  90. Ferrer-Miralles, N., Corchero, J.L., Kumar, P., Cedano, J.A., Gupta, K.C., Villaverde, A., and Vazquez, E. (2011). Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine. *Microb Cell Fact* 10, 101.
  91. Read, M.L., Singh, S., Ahmed, Z., Stevenson, M., Briggs, S.S., Oupicky, D., Barrett, L.B., Spice, R., Kendall, M., Berry, M., et al. (2005). A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 33, e86.
  92. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., and Schafer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol* 463, 439-473.
  93. Vazquez, E., Ferrer-Miralles, N., and Villaverde, A. (2008). Peptide-assisted traffic engineering for nonviral gene therapy. *Drug Discov Today* 13, 1067-1074.
  94. Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J.C., and Monsigny, M. (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconj Chem* 9, 260-267.



95. Lo, S.L., and Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* 29, 2408-2414.
96. Whittaker, G.R., and Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246, 1-23.
97. Yoneda, Y. (1997). How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J Biochem* 121, 811-817.
98. Liu, G., Li, D., Pasumarthy, M.K., Kowalczyk, T.H., Gedeon, C.R., Hyatt, S.L., Payne, J.M., Miller, T.J., Brunovskis, P., Fink, T.L., et al. (2003). Nanoparticles of compacted DNA transfect postmitotic cells. *J Biol Chem* 278, 32578-32586.
99. Pouton, C.W. (1998). Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes. *Adv Drug Deliv Rev* 34, 51-64.
100. Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
101. Fritz, J.D., Herweijer, H., Zhang, G., and Wolff, J.A. (1996). Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 7, 1395-1404.
102. Yoneda, Y., Arioka, T., Imamoto-Sonobe, N., Sugawa, H., Shimonishi, Y., and Uchida, T. (1987). Synthetic peptides containing a region of SV 40 large T-antigen involved in nuclear localization direct the transport of proteins into the nucleus. *Exp Cell Res* 170, 439-452.
103. Goldfarb, D.S., Garipey, J., Schoolnik, G., and Kornberg, R.D. (1986). Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322, 641-644.
104. Ritter, W., Plank, C., Lausier, J., Rudolph, C., Zink, D., Reinhardt, D., and Rosenecker, J. (2003). A novel transfecting peptide comprising a tetrameric nuclear localization sequence. *J Mol Med (Berl)* 81, 708-717.
105. Lesch, H.P., Kaikkonen, M.U., Pikkarainen, J.T., and Yla-Herttuala, S. (2010). Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert opinion on drug delivery* 7, 551-564.
106. Demeule, M., Regina, A., Che, C., Poirier, J., Nguyen, T., Gabathuler, R., Castaigne, J.P., and Beliveau, R. (2008). Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 1064-1072.
107. Pardridge, W.M. (2007). Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 122, 345-348.
108. McInnis, R., Perkinson, R.A., Kuo, B.A., and Norton, P.A. (1995). Unexpected nuclear localization of a chimeric beta-galactosidase lacZ reporter gene product in mammalian cells. *Biochem Mol Biol Int* 36, 483-490.
109. Peluffo, H., Acarin, L., Faiz, M., Castellano, B., and Gonzalez, B. (2005). Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury. *J Neuroinflammation* 2, 12.
110. Gall, C.M., Pinkstaff, J.K., Lauterborn, J.C., Xie, Y., and Lynch, G. (2003). Integrins regulate neuronal neurotrophin gene expression through effects on voltage-sensitive calcium channels. *Neuroscience* 118, 925-940.
111. Hernandez-Ontiveros, D.G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., and Borlongan, C.V. (2013). Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol* 4, 30.
112. Gaetz, M. (2004). The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol* 115, 4-18.

113. Helmy, A., Carpenter, K.L., Menon, D.K., Pickard, J.D., and Hutchinson, P.J. (2011). The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 658-670.
  114. Maas, A.I., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7, 728-741.
  115. Mehta, S.L., Manhas, N., and Raghubir, R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 54, 34-66.
  116. Albert-Weissenberger, C., and Siren, A.L. (2010). Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med* 2, 16.
  117. Stein, S.C., Chen, X.H., Sinson, G.P., and Smith, D.H. (2002). Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J Neurosurg* 97, 1373-1377.
  118. Harhangi, B.S., Kompanje, E.J., Leebeek, F.W., and Maas, A.I. (2008). Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)* 150, 165-175; discussion 175.
  119. Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Stahel, P.F., and Kossmann, T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8, 101-105.
  120. Hamada, Y., Hayakawa, T., Hattori, H., and Mikawa, H. (1994). Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatric research* 35, 10-14.
  121. Gonzalez, F.F., and Ferriero, D.M. (2008). Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacology & therapeutics* 120, 43-53.
  122. Kremlev, S.G., Roberts, R.L., and Palmer, C. (2007). Minocycline modulates chemokine receptors but not interleukin-10 mRNA expression in hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Journal of neuroscience research* 85, 2450-2459.
  123. Acarin, L., Gonzalez, B., and Castellano, B. (2000). Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *The European journal of neuroscience* 12, 3505-3520.
  124. Maegele, M., Engel, D., Bouillon, B., Lefering, R., Fach, H., Raum, M., Buchheister, B., Schaefer, U., Klug, N., and Neugebauer, E. (2007). Incidence and outcome of traumatic brain injury in an urban area in Western Europe over 10 years. *Eur Surg Res* 39, 372-379.
  125. Mock, C., Joshipura, M., Goosen, J., Lormand, J.D., and Maier, R. (2005). Strengthening trauma systems globally: the Essential Trauma Care Project. *The Journal of trauma* 59, 1243-1246.
  126. Chiu, W.T., Huang, S.J., Tsai, S.H., Lin, J.W., Tsai, M.D., Lin, T.J., and Huang, W.C. (2007). The impact of time, legislation, and geography on the epidemiology of traumatic brain injury. *J Clin Neurosci* 14, 930-935.
- : a
- . *Rev Med Uruguay* 11, 187-207.
  128. Sanchez, G., Valsangiacomo, P., Trostchansky, J., and Machado, F. (2006). Perfil epidemiológico de traumatizados graves en un hospital de agudos. *Rev Méd Urug* 22, 179-184.
  129. Arbiza, G., and Brito, F. (2012). Siniestralidad Vial en Uruguay, informe 2012. In, U.N.d.S. Vial, ed. (Uruguay).

130. Mysiw, W.J., Bogner, J.A., Corrigan, J.D., Fugate, L.P., Clinchot, D.M., and Kadyan, V. (2006). The impact of acute care medications on rehabilitation outcome after traumatic brain injury. *Brain Inj* 20, 905-911.
131. Schouten, J.W. (2007). Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Current opinion in critical care* 13, 134-142.
132. Xiong, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2009). Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs* 14, 67-84.
133. Doppenberg, E.M., Choi, S.C., and Bullock, R. (2004). Clinical trials in traumatic brain injury: lessons for the future. *J Neurosurg Anesthesiol* 16, 87-94.
134. Maas, A.I. (2001). Neuroprotective agents in traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs* 10, 753-767.
135. Faden, A.I. (2002). Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition. *Curr Opin Neurol* 15, 707-712.
136. Whiting, M.D., Baranova, A.I., and Hamm, R.J. (2006). Cognitive Impairment following Traumatic Brain Injury. In *Animal Models of Cognitive Impairment*, L.a.J.J. Buccafusco, ed., pp 301–314.
137. Frink, M., Andruszkow, H., Zeckey, C., Krettek, C., and Hildebrand, F. (2011). Experimental trauma models: an update. *J Biomed Biotechnol* 2011, 797383.
138. Smith, D.H., Soares, H.D., Pierce, J.S., Perlman, K.G., Saatman, K.E., Meaney, D.F., Dixon, C.E., and McIntosh, T.K. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *Journal of neurotrauma* 12, 169-178.
139. Kline, A.E., and Dixon, C.E. (2001). Contemporary in vivo models of brain trauma and a comparison of injury responses. *Head Trauma: Basic, Preclinical and Clinical Directions* Miller LP, Hayes RL (Eds) New York, John Wiley and Sons, 65-84.
140. Klapper, D.G., Wilde III, C.E., and Capra, J.D. (1978). Automated amino acid sequence of small peptides utilizing Polybrene. *Analytical biochemistry* 85, 126-131.
141. Smith, P., Krohn, R.I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
142. Wang, Y., Mangipudi, S.S., Canine, B.F., and Hatefi, A. (2009). A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted gene transfer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 137, 46-53.
143. Luo, D., and Saltzman, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18, 33-37.
144. Statler, K.D., Alexander, H., Vagni, V., Dixon, C.E., Clark, R.S., Jenkins, L., and Kochanek, P.M. (2006). Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *Journal of neurotrauma* 23, 97-108.
145. Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2424-2428.
146. Domingo-Espin, J., Petegnief, V., de Vera, N., Conchillo-Sole, O., Saccardo, P., Unzueta, U., Vazquez, E., Cedano, J., Negro, L., Daura, X., et al. (2012). RGD-based cell ligands for cell-targeted drug delivery act as potent trophic factors. *Nanomedicine* 8, 1263-1266.

147. White, N.J., Watt, G., Bergqvist, Y., and Njelesani, E.K. (1987). Parenteral Chloroquine for Treating Falciparum Malaria. *Journal of Infectious Diseases* 155, 192-201.
148. Pillai, D.R., Labbé, A.-C., Vanisaveth, V., Hongvangthong, B., Pomphida, S., Inkathone, S., Zhong, K., and Kain, K.C. (2001). Plasmodium falciparum Malaria in Laos: Chloroquine Treatment Outcome and Predictive Value of Molecular Markers. *Journal of Infectious Diseases* 183, 789-795.
149. Pluta, K., Luce, M.J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., and Reiser, J. (2005). Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *The Journal of Gene Medicine* 7, 803-817.
150. Lu, K.T., Wang, Y.W., Yang, J.T., Yang, Y.L., and Chen, H.I. (2005). Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *Journal of neurotrauma* 22, 885-895.
151. Chen, S.F., Hsu, C.W., Huang, W.H., and Wang, J.Y. (2008). Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology* 155, 1279-1296.