

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“EXPRESIÓN REGULABLE DEL TRANSGÉN BDNF-flag EN NEURONAS  
DOPAMINÉRGICAS DEL CEREBRO DE RATA MEDIANTE UN SISTEMA DE  
NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES”

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

PRESENTA

M. en C. Martha Ligia Arango Rodríguez

TUTOR

Dr. Daniel Martínez-Fong

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

CINVESTAV

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Elvira Galarraga

Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dr. Luís Felipe Jiménez

Facultad de Ciencias UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la tutoría del Dr. Daniel Martínez-Fong, profesor titular del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Se contó con la asesoría de la Dra. María Elvira Galarraga, profesora titular del Instituto de Fisiología de la UNAM y del Dr. Luís Felipe Jiménez, profesor titular de la Facultad de Ciencias, quienes integraron mi comité tutorial.

*Cuando bebas agua recuerda la fuente....*

A los míos con todo mi amor... Rodrigo, Ligia y Rafael

Mi gratitud será eterna hacia El Dr. Daniel Martínez-Fong

Y para todos aquellos que me acogieron e hicieron que durante estos 5 años no me sintiera como extranjera: Carmen, Mary, Lulú, Rosy, Erika, Nancy, Benjamín, José, Nachito, Hector, Carlitos, Fernando, Daniel, Armando,...Mis gracias infinitas



Lista de abreviaturas	7
Lista de figuras y tablas	9
Resumen	10
1. Antecedentes	12
1.1. Sistemas para la transferencia de genes	12
1.1.1. Vectores génicos virales	12
1.1.2. Vectores génicos sintéticos	13
1.1.2.1. Poliplexes	13
1.1.2.1.1. Poliplexes basados en la poli-L-Lisina	14
1.2. Limitaciones en la transferencia génica por los poliplexes	15
1.2.1. Impedimentos externos	15
1.2.1.1. Condensación del DNA por policationes	15
1.2.1.1. Acople químico de ligandos	18
1.2.2. Barreras intracelulares para los poliplexes	19
1.2.2.1. Endocitosis mediada por receptor	20
1.2.2.2. Estrategias para la liberación del DNA del endosoma	22
1.2.2.2.1. Adición de agentes lisosomotrópicos	22
1.2.2.2.2. Adición de glicerol	22
1.2.2.2.3. Incorporación de virus	23
1.2.2.2.4. Péptidos que rompen la membrana	24
1.2.2.3. El citoplasma	24
1.2.2.4. Translocación nuclear	25
1.2.2.4.1. Estrategia para el direccionamiento nuclear del pDNA	26
1.2.2.5. Desensamblaje del complejo	28
1.3. Neurotensina: Molécula ligando del NT-poliplex	28
1.4. Antagonistas específicos para los receptores NTRs	30
1.5. Relación de la NT con el sistema dopaminérgico	31
1.6. Expresión regulable de genes mediante el sistema de tetraciclina	33
1.6.1. Ventajas de los sistemas Tet	35
2. Plateamiento del problema	36
3. Objetivo general	37
4. Objetivos específicos	37
5. Materiales y Métodos	38
5.1. Síntesis del NT-vector:[ <sup>125</sup> I]-NT- [ <sup>3</sup> H]-PF-SPDP-PLL	38

5.1.1. Formación del conjugado PLL-SPDP-SH	38
5.1.2. Formación del conjugado [ <sup>125</sup> I]-NT-SPDP	40
5.1.3. Formación del conjugado [ <sup>3</sup> H]-PF-SPDP	40
5.1.4. Formación del NT-vector a partir de los conjugados previos	41
5.2. Síntesis del vector sin ligando (PF-PLL-SPDP)	41
5.3. Plásmidos	42
5.4. Formación del conjugado pDNA-PK	45
5.5. Formación del NT-poliplex	45
5.6. Geles de retardo y de retención electroforética	45
5.7. Efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex	46
5.8. Análisis del NT-poliplex por microscopía electrónica	46
5.9. Expresión in vitro de genes reporteros transfectados por el NT-poliplex	47
5.10. Ensayo de viabilidad celular	48
5.11. Sistema regulable	48
5.12. Formación del NT-poliplex auto-ensamblado	50
5.12.1. Auto-ensamblaje del NT-poliplex	50
5.12.2. Internalización del NT-poliplex auto-ensamblado	51
5.12.3. Expresión génica por el NT-poliplex auto-ensamblado	51
5.13. Animales	52
5.14. Transferencia de genes a neuronas dopaminérgicas in vivo	52
5.15. Inmunofluorescencia indirecta	53
5.16. Análisis estadístico	54
6. Resultados	54
6.1. Determinación de la proporción de los componentes del NT-poliplex	54
6.1.1. Proporción de los componentes del NT-vector	54
6.1.2. Análisis electroforético del NT-poliplex	57
6.1.3. Análisis de microscopía electrónica en la formación del NT-poliplex	58
6.1.4. Efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex	59
6.1.5. Determinación de la relación molar óptima del NT-poliplex	60
6.1.6. Efecto del NT-poliplex en la viabilidad celular	62
6.2. Regulación de la expresión del transgén	63
6.2.1. Regulación por elementos transcripcionales endógenos	63
6.2.2. Regulación por construcciones transcripcionales quiméricas	66

6.3. Auto-ensamblaje del NT-poliplex	69
6.3.1. <i>Relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado</i>	69
6.3.2. <i>Análisis electroforético de la interacción de los componentes del NT- poliplex auto-ensamblado</i>	69
6.3.3. <i>Cambios físicos del pDNA en la formación del NT- poliplex auto-ensamblado</i>	70
6.3.4. <i>Eficiencia de la transfección del NT- poliplex auto-ensamblado</i>	73
7. Discusión	73
7.1. <i>Propiedades biofísicas del NT- poliplex</i>	74
7.2. <i>Regulación de la expresión del transgén</i>	78
7.3. <i>Auto-ensamblaje del NT- poliplex</i>	81
8. Conclusiones	84
8.1. <i>Propiedades biofísicas del NT- poliplex</i>	84
8.2. <i>Regulación de la expresión del transgén</i>	84
8.3. <i>Auto-ensamblaje del NT- poliplex</i>	85
Referencias	86

## **Resumen**

Nuestro grupo desarrolló el poliplex de neurotensina con la finalidad de transferir genes terapéuticos a través de la ruta de internalización del receptor a neurotensina (NT). Las ventajas del poliplex son su alta especificidad y eficiencia, así como la expresión prolongada del transgén. Estas propiedades nos permitieron desarrollar una estrategia terapéutica para la aplicación *in vivo* para el tratamiento de un modelo murino de la Enfermedad de Parkinson (Gonzalez-Barrios et al., 2006b). No obstante a esto, la expresión génica fue des-regulada y se desconocían las propiedades biofísicas del poliplex así como su posible toxicidad. Por esta razón, los objetivos de esta tesis fueron: 1) Determinar la adecuada proporción de los componentes del vector de neurotensina que al interaccionar con el DNA plasmídico formen partículas solubles, con tamaño y formas precisas para ser internalizadas de manera eficiente e inocua. 2) Regular la expresión del transgén por elementos transcripcionales específicos de tejido y por construcciones transcripcionales quiméricas. 3) Diseñar la estrategia para el auto-ensamblaje del vector génico de neurotensina.

Utilizando [<sup>125</sup>I]-neurotensina y [<sup>3</sup>H]-péptido fusogénico HA2 determinamos que el vector eficiente debe tener al menos 1 molécula de neurotensina, 4 moléculas de péptido fusogénico y 2 moléculas de polilisina. La microscopía electrónica mostró que el vector condensa al DNA plasmídico en nanopartículas denominadas toroides, cuya densidad está determinada por la relación molar entre el vector y el pDNA y se asocia con la mayor eficiencia de transfección denominándola relación molar óptima, a esta relación, las nanopartículas resultantes no afectan la viabilidad celular y además pueden transfectar simultáneamente dos plásmidos diferentes en la misma célula. La acidez extrema (< pH 5) afecta el patrón de corrimiento electroforético de las nanopartículas, sugiriendo que se afecta su estabilidad. El control del transgén neurotrófico BDNF-flag por el promotor hDAT restringió su expresión a las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de rata. Nuestros estudios *in vitro* sugieren que el sistema inducible de regulación génica Tet-On pudiera controlar los niveles de expresión del transgén *in vivo*. La estrategia que diseñamos para lograr el auto-ensamblaje de las nanopartículas de neurotensina consistió en sintetizar a la neurotensina en secuencia lineal con 30 residuos de lisina (Lisina<sub>30</sub>-NT) y el péptido fusogénico HA2 en secuencia con 20 residuos de lisina (PF-Lisina<sub>20</sub>). Demostramos que el sistema auto-ensamblado produce, como el vector original expresión específica y eficiente del transgén. La caracterización biofísica del sistema de nanopartículas de neurotensina permitió conocer

la interacción óptima de sus componentes y la relación con el sistema biológico para transferir genes de manera eficiente, segura, específica y regulada. La bioseguridad de las nanopartículas de neurotensina alienta su aplicación en la terapia génica humana.

## **1. Antecedentes**

### **1.1. Sistemas para la transferencia de genes**

Los sistemas de transferencia génica se han clasificado en dos categorías: los vectores virales recombinantes y los vectores sintéticos.

Se ha determinado que el vector ideal para la terapia génica debería cumplir a cabalidad los siguientes criterios: 1) ser capaz de transferir DNA de cualquier tamaño desde rangos muy pequeños hasta mega pares de bases, 2) tener la capacidad de transfectar células quiescentes, 3) ser específico para la célula blanco deseada, 4) ser eficiente para la transferencia génica *in vivo*, 5) mantener una expresión estable del transgén, 6) no ser inmunogénico ni oncogénico, 7) tener la capacidad de integrarse en sitios inocuos del genoma dependiendo de la aplicación deseada. Aunque algunos sistemas de transferencia génica se han perfeccionado significativamente en algunos aspectos, hasta la fecha no hay ningún vector génico que cumpla con todas los criterios mencionados anteriormente (Pouton and Seymour, 1998)

#### **1.1.1. Vectores génicos virales**

Algunos virus han sido manipulados genéticamente para transformarlos en vectores génicos, eliminándoles exones que codifican las proteínas esenciales para su replicación e insertando un gen de interés. El fundamento de los vectores virales para transferir genes de forma eficiente, es hacer uso de algunas de las propiedades de los virus involucradas en su capacidad infectiva y en la integración de su material genético al genoma del hospedero para su replicación. En la actualidad, la mayoría de los estudios de transferencia de genes reportados en la literatura han empleado a los vectores virales, y un 69% de los ensayos clínicos en humanos utilizan este sistema para transferir el gen terapéutico (Pack et al., 2005). A pesar de su alta eficiencia de transducción y ser los más utilizados, destacan la alta inmunogenicidad de los adenovirus (Schagen et al., 2004), lo que a su vez dificulta la administración de dosis repetidas del vector, y la oncogenicidad de los retro y lentivirus (Brown et al., 1988), (Anson, 2004), (Fuller and Anson, 2004). Además tienen poca especificidad para reconocer la célula blanco e incapacidad para empaquetar DNA de gran tamaño (Robbins et al., 1998) Sin embargo, se está trabajando para mejorar la bioseguridad y abatir los alto costos de su manufactura (Walther and Stein, 2000).

### **1.1.2. Vectores génicos sintéticos**

En la actualidad se dispone de varios tipos de vectores sintéticos, se clasifican en tres grupos principales de acuerdo a la composición química del polímero que utiliza para unir, condensar y/o empaquetar el transgén. Los lipoplexes se basan en polímeros lipídicos, los poliplexes polímeros catiónicos, y los lipopoliplexes utilizan polímeros que tiene las característica de los dos anteriores. Todos ellos condensan al DNA o al RNA en partículas cuyo tamaño oscilan entre 50 - 100 nm (Danielsen et al., 2004), (Hud and Vilfan, 2005). La bioseguridad mayor en comparación con los vectores virales, su fácil manufacturación, producción a gran escala, capacidad de empaquetar DNA de gran tamaño (< 7.5 Kpb), hace a estos sistemas atractivos como vectores génicos. Sin embargo, la naturaleza transitoria de la expresión de los transgenes e inestabilidad *in vivo* los hace poco ideales como vectores para la terapia génica (Louise, 2006), (Demeneix et al., 2004).

#### **1.1.2.1. Poliplexes**

Los conjugados moleculares denominados poliplex son generados por la condensación de los ácidos nucleicos con un polímero catiónico, que puede ser químicamente unido a un ligando para dirigir la liberación a una célula blanco específica. El diseño de los polímeros catiónicos para liberar genes comprende gran diversidad química. Están constituidos por un motivo de unión al DNA el cual incluye aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias u otros grupos cargados positivamente como las amidinas. La estructura del polímero puede ser lineal, ramificada o dendrítica. Debido a su flexibilidad en la constitución química es posible incorporarle múltiples funciones para incrementar la liberación eficiente de genes, conservando su bio-compatibilidad, su fácil manufacturación y estabilidad. La capacidad de transportar DNA de gran tamaño, su baja toxicidad e inmunogenicidad y la protección del material genético transportado de la degradación enzimática, bloqueando el acceso de las enzimas nucleolíticas (Chiou et al., 1994), hace que los polímeros catiónicos tengan un gran potencial para la terapia génica en humanos. Actualmente se han diseñado vectores sintéticos que asemejan algunas de las características de los virus como la habilidad para empaquetar el DNA, la unión a células específicas y la liberación de su genoma en el núcleo de la célula y así poder incrementar la eficiencia de transfección *in vivo*, su mayor limitante para la aplicación clínica (Schaffer and Lauffenburger, 1998; Schaffer et al., 2000; Schaffer and Lauffenburger, 2000).

### **1.1.2.1.1. Poliplexes basados en la poli-L-lisina**

En la actualidad se ha utilizado diferentes polímeros catiónicos tales como espermidina, protamina, polihistidina y poliarginina (Tiera et al., 2006). Nos enfocaremos a revisar los antecedentes de la poli-L-lisina (PLL), ya que es uno de los componentes de nuestro NT-vector. La PLL facilita la solubilidad de algunas moléculas y se utiliza de forma rutinaria como vehículo para la liberación de medicamentos por periodos largos. Además, evita la toxicidad aguda producida por algunos fármacos antivirales como la adenina arabinosido monofosfato (ara-AMP) y no induce inmunogenicidad por dosis repetidas (Arnold, Jr., 1985), (Ekrami and Shen, 1995), (Duncan, 1992). La heterogeneidad del tamaño molecular de la PLL comercialmente disponible representa una desventaja desde el punto de vista farmacológico, porque los complejos que se obtienen con el medicamento de interés tienen variación en su biodisponibilidad, aunque se puede conseguir PLL de baja masa molecular (3 KDa) hasta masas muy grandes (>200 KDa) lo que da versatilidad a su utilización. Se ha reportado que la PLL no es inerte y puede desregular algunos procesos celulares *in vitro*; activa fosfolipasas (Shier et al., 1984), a la protein kinasa 2 asociada a los microtúbulos (Vogel and Hoppe, 1986), genera actividad lítica contra varias membranas y células, afecta la permeabilidad de la membrana celular, (KORNGUTH and Stahmann, 1961; KORNGUTH et al., 1961), lo que causa la liberación al medio extracelular de la enzima lactato deshidrogenada (LDH), lisozimas y  $Ca_2^+$ . Cuando la concentración extracelular de  $Ca_2^+$  rebasa a 0.2 mM se produce daño en la membrana plasmática (Elferink, 1991). La PLL genera citotoxicidad hacia algunas células tumorales (Arnold, Jr. et al., 1979). Es controversial si la PLL es inmunogénica, pues se ha reportado producción de anticuerpos después de la inyección de la poli D-lisina en la presencia del adyuvante de Freund's (Wagner et al., 1998b). El grupo amino epsilon de la lisina es cargado positivamente a pH fisiológico (policación), propiedad que ha sido ampliamente utilizada para unir DNA (polianión) de forma electrostática. En adición, el grupo amino epsilon es un buen blanco para la unión covalente de moléculas como proteínas y azúcares utilizando alguno de los cuatro métodos de acoplamiento. 1) Entrecruzadores bifuncionales que contienen un grupo éster reactivo, tales como el N-succinimidil-3-[2-piridilditio]propionato (SPDP), el succinimidil-4-[p-maleimidofenil]butyrato (SMPB) y N(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS). Generalmente estos componentes adhieren un grupo reactivo tiol a la molécula de PLL que será utilizado para unir la otra molécula de interés a través de un enlace disulfuro (SPDP) o tioéster (EMCS) (Cotten et



al., 1993a). 2) Acoplamiento con 1-Ethyl-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida Hidroclorada (EDC) que reacciona con el grupo carboxilo de la molécula de interés, el cual posteriormente reaccionará con el grupo amino primario de la PLL, llevando a la formación de una unión amida. 3) los isotiocianatos reaccionan con los grupos amida para formar un derivado tiourea. 4) La glicosilación reductiva que es la unión espontánea de un azúcar por su grupo carbonilo con el grupo amino de la PLL; la unión se estabiliza con bromuro de cianógeno (Martinez-Fong et al., 1994). La purificación de los conjugados se realiza generalmente mediante diálisis, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico.

## **1.2. Limitaciones en la transferencia génica por poliplexes**

El poliplex tiene que superar una serie de impedimentos tanto externos de tipo fisicoquímico desde el momento de su formación, como obstáculos celulares hasta llegar a su destino final, el núcleo de la célula blanco. Es importante conocer las limitaciones que enfrentan los vectores sintéticos en el proceso de la transferencia génica, para identificar sus limitantes y diseñar polímeros más funcionales.

### **1.2.1. Impedimentos externos**

La inadecuada condensación del DNA y la precipitación del complejo son las primeras desventajas que deben ser superadas en la formación del poliplex. Por esta razón, es fundamental identificar las propiedades fisicoquímicas del poliplex que garanticen composición funcional, adecuada condensación del DNA, estabilidad molecular y solubilidad. La caracterización biofísica del NT-poliplex fue uno de los objetivos de estudio de esta tesis.

#### **1.2.1.1. Condensación del DNA por policationes**

La condensación del DNA ha sido estudiada desde hace más de dos décadas. Actualmente ha adquirido gran interés ya que es un paso decisivo en la transferencia de genes *in vivo*. Los policationes unen y condensan al DNA en estructuras pequeñas y compactas, debido a las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos negativos situados a lo largo del esqueleto del DNA y las cargas positivas de la PLL del vector. El proceso de condensación es dirigido por fuerzas de entropía y los poliplex se forman de manera espontánea al lograrse una relación molar precisa entre el polímero catiónico y el DNA. Las partículas resultantes son estructuras de forma toroide o de bastón cuyos tamaños oscila en el rango de 50 a 100 nm de diámetro. Se ha determinado que los

toroides son generalmente de tamaño constante, con un diámetro externo de 50 nm y un diámetro interno de 15 nm; toroides de este tamaño se han observado con DNA de longitudes entre 400 a 56000 pb, (Hud and Vilfan, 2005), (Bloomfield, 1991),. Cuando los toroides y los bastones (rods) son formados bajo condiciones fisicoquímicas constantes (pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de sales en el medio), usualmente tienen la misma anchura y longitud total. Mientras que variaciones mínimas en alguna de las constantes físico-químicas producen toroides y rods de tamaño variable. Por lo tanto, se pueden lograr nanopartículas del poliplex de diferente tamaño que refleja diferente grado de condensación. Cada partícula de poliplex compromete varias moléculas de DNA con muchas cadenas poliméricas a su alrededor. La estructura del poliplex depende del orden en que se mezclan los componentes en intervalos de tiempo fijos. Precisamente, este punto es reforzado por los resultados de nuestro trabajo. Aunque grandes esfuerzos se han hecho para comprender el proceso y caracterización físico-química de la formación de los poliplexes, es necesario un modelo teórico del complejo resultante (Vilfan et al., 2006).

Diversas metodologías se utilizan para investigar la condensación del DNA por policationes. El dicroísmo circular (CD) evalúa la estructura del DNA; la microscopia electrónica de transmisión (TEM) estudia la forma y el tamaño de las nanopartículas, igual que la microscopia de fuerza atómica (AFM) pero ésta además determina la estructura tridimensional del poliplex con una alta resolución de sub-nanómetro, además permite analizar muestras secas o en condiciones semejantes a las fisiológicas; la electroforesis en geles de agarosa refleja la carga y el tamaño del complejo; la técnica de dispersión láser analiza tamaño y distribución del mismo y la carga de superficie (potencial z); las técnicas de centrifugación diferencial valoran el tamaño de la partícula y su distribución. Ninguno de estos métodos por sí solos son suficientes para caracterizar completamente los complejos DNA-PLL, la combinación de ellos ha permitido definir con más exactitud y certeza las partículas de transfección activas (Dalluge et al., 2002), (Wagner et al., 1991). Sin embargo, es importante destacar que hay una estrecha correlación entre los resultados obtenidos con diferentes métodos.

La estructura del polication influye en la unión y condensación del DNA (Plum et al., 1990). Se ha demostrado que el número de motivos catiónicos tiene un marcado efecto en la interacción polímero-DNA. Varios grupos han reportado que un mínimo de 6 a 8 cargas en un polipéptido es requerido para la eficiente condensación de DNA (Schaffer et al., 2000), (Wadhwa et al., 1997). Hay controversia respecto a si la secuencia del

péptido influye en la condensación con el DNA. Wadhwa y colaboradores reportaron que la adición de un residuo de triptófano (Trp) en la PLL incrementa la unión con el DNA (Wadhwa et al., 1997). En controversia Planck y colaboradores expusieron que los residuos de Trp no ejercen mayor efecto en la unión del DNA y observó un efecto contrario, disminuía la potencia de compactación del polipéptido (Plank et al., 1998). Esta discrepancia puede ser atribuida a la estructura de los péptidos estudiados (linear vs. ramificado) (Pack et al., 2005). Adicionalmente, la separación entre las cargas eléctricas a lo largo del esqueleto del polímero influye con la unión al DNA. Es importante aclarar que la fuerte unión y el grado de condensación del DNA no se correlacionan directamente con la eficiencia de transfección, debido a que la fuerte unión del polímero con el DNA y su alta compactación pueden evitar la transcripción del transgén. Un polímero debe balancear suficiente fuerza de unión para proteger inicialmente al DNA de la degradación, pero a su vez permitir la descondensación del poliplex para la exitosa transcripción del transgén (Schaffer et al., 2000), (Wolfert et al., 1999).

Los factores que influyen en el tamaño del poliplex también determinan la solubilidad; dentro de éstos destaca la relación de cargas eléctricas entre el DNA y la PLL, el tamaño y el grado de modificación de la PLL, y las condiciones utilizadas para ensamblar el poliplex (Perales et al., 1994). Estudios de MFA han demostrado que la masa molecular de la PLL tiene un marcado efecto en el tamaño y distribución de las partículas resultantes DNA-PLL (Wagner et al., 1998b). El control inadecuado de esos parámetros en la formación del poliplex conduce generalmente a la formación de partículas agregadas y poco solubles. La concentración del DNA también es un factor que influye en la solubilidad del poliplex; se ha observado que concentraciones menores de 20 µg/mL forman complejos solubles. La baja solubilidad probablemente se relaciona a la naturaleza hidrofóbica de las partículas DNA- PLL. Cabe mencionar que el tamaño del complejo es independiente del tamaño del DNA usado (Wagner et al., 1998b). Para obtener eficientes transfecciones *in vivo* es necesario que los parámetros mencionados sean optimizados.

### **1.2.1.2. Acople químico de ligandos**

Los vectores sintéticos no tienen la capacidad de dirigirse a una célula determinada. Sin embargo, poseen una gran flexibilidad química que les permite la adición de motivos para el direccionamiento celular específico. Generalmente se ha acoplado a los

poliplexes ligandos para receptores de membrana específicos que dirigen su entrada por endocitosis mediada por receptor. El primer ligando que se utilizó fue el asialorosomucoide, el cual se conjugó a la molécula de PLL para que el poliplex fuera internalizado en los hepatocitos, a través de la endocitosis del receptor de asialoglicoproteína (Perales et al., 1997). Posteriormente se utilizó a la transferrina (Wagner et al., 1991), al factor de crecimiento epidérmico EGF (Shir et al., 2006), (Ogris and Wagner, 2002), algunas secuencias que unen a integrinas (Wittekindt et al., 2004) y anticuerpos (Wagner et al., 2005). En la actualidad es extensa la lista de ligandos que se han utilizado para el envío dirigido de genes a poblaciones celulares específicas. El NT-poliplex es uno de los conjugados más reciente que se ha sintetizado y sobre todo que ha demostrado alta eficiencia, especificidad y prolongada expresión de los transgenes *in vivo*. Las características de la NT para internalizarse a las neuronas dopaminérgicas han facilitado su utilización exitosa como molécula ligando del poliplex.

La funcionalidad del ligando en el poliplex depende de varios factores: 1) la conjugación química, 2) la longitud del espaciador entre el ligando y la PLL, 3) la afinidad del ligando por su receptor, y 4) el número de ligandos blanco que contenga el poliplex.

Una variedad de entrecruzadores químicos han sido utilizados para conjugar ligandos específicos a los polímeros catiónicos, incluyendo uniones covalentes y uniones por estreptovidina-biotina. Este último requiere mayor cuidado para garantizar que la conjugación no se rompa en el momento de la unión ligando-receptor. Los poliplex basados en polímeros catiónicos son más estables y aseguran la activación del receptor siempre y cuando el ligando quede expuesto en un número suficiente. Se ha demostrado que la internalización específica mediante un ligando y la expresión del gen está estrechamente asociada con la relación molar polímero-DNA, que es cuando las cargas de superficie del poliplex están cerca de la electro-neutralidad como lo han demostrado estudios del potencial z. Finalmente, la concentración molar óptima debe de proveer la concentración del ligando mayor que la  $K_d$  del receptor y de preferencia saturar los receptores para garantizar la activación de la maquinaria de internalización celular. En resumen, se requiere de ligandos específicos y eficientes dirigidos hacia la célula blanco y la optimización cuidadosa de los parámetros físico-químicos anteriormente analizados para que sea exitosa la transferencia génica mediada por receptor.

Los polímeros catiónicos son más flexibles como estructura esencial del poliplex puesto que permiten, además del ligando, conjugar otros motivos funcionales que le permitan superar los obstáculos celulares. Estos obstáculos son de mayor magnitud *in vivo* puesto que incluyen la respuesta inmune que afecta la estabilidad y la permanencia del poliplex en la circulación sanguínea, la exclusión del endotelio vascular que impide la localización del tejido blanco y finalmente la unión específica con el receptor en la célula de interés.

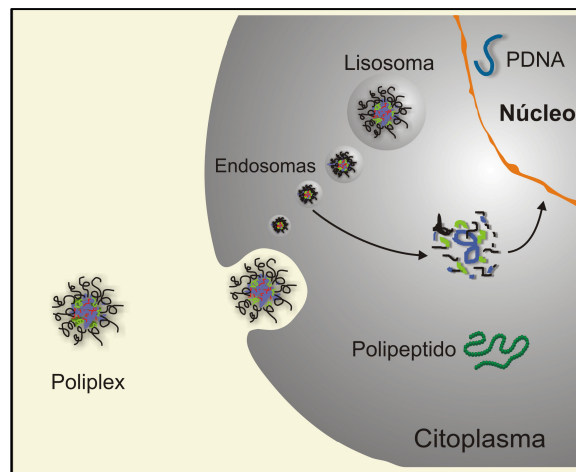
### **1.2.2. Barreras intracelulares para los poliplexes**

Posterior a su internalización los poliplexes enfrentan barreras intracelulares que afectan la eficiencia de transfección (Figura 1). Por lo tanto, el poliplex debe ser provisto de estrategias funcionales para superar cada una de los obstáculos intracelulares que va enfrentando en su trayecto hacia el núcleo celular. Aunque más del 95% de las células en cultivo internalizan el vector (>100.000 copias por célula), sólo una fracción menor al 50% expresan el transgén (Tseng et al., 1999).

Los obstáculos intracelulares son diferentes dependiendo del tipo de mecanismo de internalización que utilice el poliplex, el cual es seleccionado por su tamaño y su composición. Morfológicamente se han caracterizado cuatro vías de internalización por pinocitosis: 1) macropinocitosis, 2) endocitosis mediada por clatrina, 3) endocitosis mediada por caveolas, y 4) endocitosis independiente de caveola/clatrina (Khalil et al., 2006). Ellas difieren en la composición de las cubiertas, en el tamaño de las vesículas y el destino de la partícula internalizada. Complejos mayores de 500 nm entran a la célula por macropinocitosis y partículas más grandes por la vía fagocítica (Khalil et al., 2006). La fagocitosis se restringe a células especializadas, mientras que la pinocitosis ocurre en todas las células (Conner and Schmid, 2003).

Los poliplex que no poseen ligandos se unen de forma electrostática a la superficie de la célula y son internalizados vía pinocitosis adsorptiva, que es iniciada por la unión de moléculas a sitios de unión genéricos como lectinas o por interacción con las cargas de la membrana celular (Khalil et al., 2006). Los poliplex menores de 200 nm con moléculas ligando son frecuentemente internalizados por endocitosis mediada por receptor, proceso dependiente de clatrina (Varga et al., 2000). No se ha descrito hasta el momento que los poliplexes utilicen la endocitosis mediada por caveolas o la endocitosis independiente de caveola/clatrina.

Los poliplexes internalizados por endocitosis mediada por receptor enfrentan de inmediato la acidez gradual del interior del endosoma y al evolucionar éstos a lisosomas, enfrentan la acción catalítica de endonucleasas y proteasas. Por lo tanto, el poliplex debe escapar oportunamente de estos compartimientos al citoplasma para que el transgén sea transportado hacia el núcleo. En el interior del núcleo, el transgén debe estar desacoplado de la PLL y en su forma laxa, para que la maquinaria transcripcional lo identifique y lo transcriba. Además, de estas barreras físicas, el DNA puede ser sujeto a la degradación metabólica y a la inactivación transcripcional, comprometiéndose aun más la eficiencia de transfección (Lechardeur and Lukacs, 2002).



**Figura 1.** Barreras intracelulares para los vectores no virales. Los poliplexes internalizados por endocitosis mediada por receptor enfrentan de inmediato la acidez gradual del interior del endosoma y al evolucionar éstos a lisosomas, enfrentan la acción catalítica de endonucleasas y proteasas. Una vez liberado el poliplex del compartimiento endosomal debe moverse a través del citoplasma para llegar al núcleo; sin embargo, partículas y organelas citoplasmáticas dificultan su movimiento. El poliplex debe escapar oportunamente de estos compartimientos al citoplasma para que el transgén sea transportado hacia el núcleo. En el interior del núcleo, el transgén debe estar desacoplado de la PLL y en su forma laxa, para que la maquinaria transcripcional lo identifique y lo transcriba.

### **1.2.2.1. Endocitosis mediada por receptor**

En la endocitosis mediada por receptor, ciertos ligandos al unirse a receptores en la superficie celular inducen su reclutamiento, lo que conlleva a la formación de bahías de la membrana celular. La eficiencia en la endocitosis por receptor depende de su afinidad, la avidéz por su ligando y la concentración del complejo ligando-receptor en las bahías cubiertas de clatrina.

Posterior a la invaginación de la membrana plasmática ocurre el recubrimiento de esas bahías por clatrina, cuyo ensamblaje requiere la participación de las proteínas adaptadoras. El rango de tamaño de las bahías cubiertas de clatrina es entre 100-150 nm de diámetro. Esta capacidad de los endosomas se tomó en cuenta en este trabajo para medir el diámetro del NT-poliplex mediante TEM. El dominio terminal de la clatrina interactúa con una variedad de proteínas que incluyen a la subunidad  $\beta$ -adaptinas del complejo adaptador de la proteína AP-2, la  $\beta$ -arrestina que actúa como un complejo adaptador para los GPCRs, y el amfifisin que al parecer actúa en el reclutamiento de la dinamina GTPasa (Sever et al., 2000). Esta enzima cataliza la formación y la fusión de las bahías cubiertas de clatrina para generar los endosomas tempranos (Sever et al., 2000; Sever, 2002). Auxilina es requerida para la constricción de las bahías cubiertas de clatrina (Sever et al., 2006).

La despolimerización de la clatrina da como resultando la primera vesícula llamada endosoma temprano, que posteriormente se fusiona con otro endosoma formando el endosoma tardío y éste finalmente termina fusionándose con el lisosoma, según una teoría. También se ha propuesto que el endosoma temprano madura a endosoma tardío y a lisosoma al irse acidificando. El tráfico vesicular de la endocitosis mediada por clatrina, es controlado por la acción de pequeñas GTPasa. Se ha propuesto que la mayoría de los poliplexes tienen un tráfico hasta el endosoma tardío donde se enfrentan a condiciones ácidas extremas (pH 5-6) debido a la actividad de las bombas protón ATPasa. La acidez es una de las condiciones que degrada a los poliplexes. Por el contrario, los virus han desarrollado estrategias para escapar de la acidez oportunamente. De aquí que al NT-poliplex se le incorporó una señal de escape endosomal, el péptido fusogénico HA2 de la hemaglutinina y así evitar su degradación en el endosoma tardío (Navarro-Quiroga et al., 2002). Si el poliplex no escapara del endosoma tardío, finalmente sería conducido hasta el lisosoma donde el pH es menor que 4.5 y se encuentran además varias enzimas degradativas. Existen evidencias de que una proporción significativa de DNA es atrapado en estas vesículas y es degradado (Mukherjee et al., 1997). Solamente el DNA que escapa pasa al citoplasma ocasionalmente pudiera alcanzar el núcleo celular (Figura 1). Es evidente que estos eventos afecten la eficiencia de transfección de los poliplexes.

Dentro de la vesícula endosomal, el material puede tomar diferentes destinos. 1) En los endosomas tempranos el material internalizado puede ser rápidamente reciclado a la superficie celular y salir de la célula por exocitosis al espacio extracelular, 2) el material

puede salir del endosoma al citosol y 3) el material se puede mover entre las vesículas endosomales al lisosoma, donde será degradado por enzimas proteolíticas y nucleolíticas, como se mencionó anteriormente.

### **1.2.2.2. Estrategias para la liberación del DNA del endosoma**

El escape del complejo de los endosomas es esencial para lograr una eficiente transfección; por ello, varias estrategias se han desarrollado para superar esta barrera.

#### **1.2.2.2.1. Adición de agentes lisosomotrópicos**

La adición de una base débil como la cloroquina al medio de transfección incrementa la expresión del transgén en una variedad de líneas celulares (Erbacher et al., 1996), (Joubert et al., 2003). La cloroquina actúa mediante diferentes mecanismos de acción: 1) Ejerce un efecto de buffer en el pH de las vesículas endosomales evitando su acidificación, lo que produce la inhibición en la actividad de las enzimas lisosomales que degradan al DNA; 2) la alta concentración de bases débiles dentro de las vesículas acídicas produce hipertonicidad que desestabiliza la permeabilidad de la membrana endosomal; 3) evita la maduración de los endosomas, retardando la degradación del transgén en el lisosoma; 4) se ha sugerido que la alta concentración de cloroquina en las vesículas puede disociar el DNA de la PLL (Erbacher et al., 1997). Aunque la cloroquina aumenta la eficiencia de la transferencia de genes mediada por receptor con algunos polímeros, su uso es limitado a algunas líneas celulares debido a su citotoxicidad; además es impráctica en la liberación de genes *in vivo* por las altas dosis requeridas y su toxicidad (Zhang et al., 2003).

#### **1.2.2.2.2. Adición de glicerol**

La presencia de 1-1.5 M de glicerol en células incubadas con un complejo DNA- PLL o DNA-Tfp-Lys incrementa significativamente la transferencia de genes en diferentes líneas celulares y en cultivos primarios de fibroblastos (Zauner et al., 1996), (Zauner et al., 1997). Este aumento en la eficiencia de transfección no se atribuye a una mayor entrada del complejo en la célula, mas bien al debilitamiento de la membrana endosomal inducido por el glicerol, favoreciendo así la ruptura membranal por la PLL. Sin embargo, no todas las líneas celulares son susceptibles a esta técnica.

#### **1.2.2.2.3. Incorporación de virus**

La incorporación a los vectores sintéticos de algunas de las estrategias que tienen los virus para escapar de las vesículas internas después de ser endocitados, ha permitido la



liberación de los complejos del endosoma. Se ha reportado que la adición de adenovirus con el poliplex al medio de cultivo, incrementa significativamente los niveles de transfección hasta más de 2000 veces en líneas celulares HeLa y KB y es un efecto dependiente de la carga viral (Wagner et al., 1998b). Debido a que la estructura que interviene en la desestabilización de la membrana endosomal es la cápside del adenovirus, el genoma viral es inactivado con psoralen (Wagner et al., 1998a). Sin embargo, para que ocurra una eficiente liberación del transgén es necesario que la partícula viral y el complejo colocalicen en el endosoma, por ello se han generado estrategias que incorporan el virus directamente en el complejo del DNA mediante un puente avidina-estreptavidina o acoplado la cápside del virus a la PLL mediante un puente con un anticuerpo. Entre las desventajas de la incorporación de los adenovirus al complejo, es la pérdida de la especificidad de transfección del poliplex debido a que el complejo poliplex-vector viral pueda entrar a la célula vía el receptor del adenovirus. Esto se ha evitado mediante dos estrategias: 1) acoplado a la PLL adenovirus peroxidados, modificando así la fibra del adenovirus, proteína necesaria para la entrada del virus vía su receptor (Wagner et al., 1998b) o 2) usando anticuerpos contra la fibra del adenovirus inhibiendo la unión e internalización vía receptor del adenovirus. Ambas estrategias no interfieren con la actividad endosomolítica del virus (Kichler et al., 1998).

Otros virus que han sido utilizados exitosamente para aumentar la transferencia de genes mediada por receptor son el CELO (adenovirus de gallinas) (Cotten et al., 1993b) y los tipos HRV2 y HRV14 del rinovirus humano 2 (Wagner et al., 1998b).

La mayor desventaja de utilizar los virus para aumentar la liberación citoplasmática del complejo, es la respuesta inflamatoria de las células a la entrada del virus y la reacción inmune *in vivo*. En general los acercamientos virales son algo imprácticos debido a la dificultad de preparar el vector, además de los aspectos de bioseguridad e inmunogenicidad concernientes a los virus.

#### **1.2.2.2.4. Péptidos que rompen la membrana**

La propiedad que tienen los virus de escapar del endosoma se debe al dominio fusogénico de algunas proteínas estructurales de la cápside. Uno de los mejores ejemplos de evasión endosomal es el virus de la influenza; su capacidad de fusión y anclaje de la membrana endosomal reside en el extremo N-terminal de la subunidad HA-2 de la hemaglutinina. Esta proteína contiene un dominio de 20 aminoácidos que al

ser escindido por proteasas, forma una hélice anfipática a pH entre 5 - 6 que interactúa y desestabiliza la membrana endosomal (Wagner et al., 1998b). De esta forma el péptido derivado de la Influenza es capaz de liberar el contenido de la vesícula interna al citoplasma (Wagner et al., 1998b). La secuencia sintética del péptido fusogénico HA2 de la hemaglutinina fue modificada por la adición de 3 lisinas para unirlo al NT-poliplex, lo que aumentó de forma significativa su eficiencia de transfección sin afectar su especificidad.

Existen otros péptidos virales fusogénicos naturales o sintéticos que pueden ser adheridos al polímero proporcionando el escape endosomal. Estos péptidos son sensibles a pH ácido, donde sufren cambios estructurales que ocasionan la ruptura de la membrana endosomal, aumentando así la eficiencia de transfección en 2 a 3 ordenes de magnitud.

### **1.2.2.3. El citoplasma**

Tres clases de filamentos conforman la estructura del cito-esqueleto; filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Existe una interacción sinérgica entre ellos y la regulación se da por proteínas de unión a microtúbulos. A su vez, la presencia de una variedad de organelas subcelulares inmersas en el citosol y la alta concentración de proteínas (superiores a 100 mg/mL) causan un conglomerado molecular intenso en el citoplasma que limitan la difusión de las macromoléculas.

El cito-esqueleto interviene en el transporte de organelas y de grandes complejos moleculares, por lo que está involucrado con el transporte citoplasmático del poliplex (Kulkarni et al., 2006), como lo muestran los experimentos con la adición de colchicina (Chowdhury et al., 1996).

Una vez liberado el poliplex del compartimiento endosomal debe moverse a través del citoplasma para llegar al núcleo. Sin embargo, las organelas citoplasmáticas dificultan su movimiento. Estudios de movilidad en el citosol demuestran que la movilidad del DNA es inversamente proporcional a su tamaño molecular (Lukacs et al., 2000). Se ha determinado que DNA mayores a 3000 pb de longitud son inmóviles, por lo tanto se asume que los poliplexes de gran tamaño son inmóviles. El mecanismo del transporte citoplasmático del poliplex requiere una mejor caracterización para mejorar el diseño de los poliplex.

Otro factor que afecta la eficiencia de transfección es la inestabilidad estructural del DNA plasmídico (pDNA) en el citoplasma y su degradación enzimática (Read et al.,

2005). Estudios de microinyección de en el citoplasma han mostrado que éste desaparece del compartimiento citosólico de una manera dependiente del tiempo (Lechardeur et al., 1999). Esto sugiere la degradación del pDNA por endonucleasa citosólicas (Lechardeur et al., 1999), lo que conlleva a la baja eficiencia de transfección. Se ha considerado que las DNAsas involucradas en la degradación cromosomal también participan en la degradación del pDNA microinyectado en el citoplasma

Sin embargo, estudios de microinyección en el citoplasma de poliplexes o lipoplexes han demostrado que el pDNA en estado condensado o encapsulado resiste significativamente la degradación por nucleasas, aunque una vez en el citoplasma el poliplex o los vectores sintéticos son expuestos a factores solubles e insolubles que atrapan al transgén en el citoplasma, lo que favorecen su degradación. El transporte intracelular y el proceso de degradación que interfiere con los mecanismos de transferencia génica dependen de la fisiología y micro ambiente en cada tipo celular.

#### **1.2.2.4. Translocación nuclear**

El importe y exporte de biomoléculas entre el citoplasma y el núcleo ocurre a través del complejo del poro nuclear (NPC), el cual está localizado en la membrana nuclear. El NPC es un complejo de gran tamaño (aproximadamente 125 MDa) compuesto de 50-100 proteínas diferentes llamadas nucleoporinas (Allen et al., 2000). Se ha reportado que moléculas menores de 9 nm en diámetro o de 60 kDa pueden difundir pasivamente a través del canal central del NPC, mientras que moléculas más grandes, como proteínas y complejos de proteína-RNA, son transportadas activamente por receptores del transporte nuclear o por las importinas, (Muhlhauser et al., 2001; Otis et al., 2006). Por lo tanto, el NPC tiene la capacidad de diferenciar moléculas mayores de 10-25 nm. Diferentes factores fisiológicos inducen cambios estructurales en el NPC, modificando su permeabilidad y en consecuencia el transporte nuclear. Se ha demostrado que concentraciones citoplasmáticas de ATP pueden modular el tamaño y la forma del NPC (Bustamante et al., 2000a). La depleción del  $Ca^{2+}$  en la cisterna perinuclear inhibe tanto la difusión pasiva como el transporte mediado por señales de localización nuclear (NLS) a través del NPC, debido a la inducción de cambios conformacionales (Bustamante et al., 2000b), (Stoffler et al., 1999). La gran variedad de sustratos importados al núcleo han influido en el desarrollo de un amplio rango de vías de importe nuclear con mecanismos de regulación específicos. Entre las vías de importe mejor caracterizadas está la de la importina- $\beta$  (Jans et al., 2000), (Nakielny and Dreyfuss, 1999), vía de

transporte clásica de las partículas que tienen NLS ricas en argininas/lisinas tales como el antígeno T del SV40 (NLS<sup>T</sup>) o las nucleoplasminas. Las moléculas que son transportadas por esta vía, pueden unirse ya sea directamente a la importina- $\beta$  o a través de un importador de la proteína como la importina- $\alpha$ .

Otros sistemas de importe nuclear son: las nucleoporinas y la familia de transporte nuclear Ras (Ran GTPasa) (Lee et al., 2005).

#### **1.2.2.4.1. Estrategia para el direccionamiento nuclear del pDNA**

Diferentes experimentos establecen que la envoltura nuclear representa el último obstáculo para la transferencia de genes por métodos no virales. Se ha demostrado que la inyección de plásmidos en el núcleo de líneas celulares produce entre el 50 -100% de eficiencia de expresión del transgén, pero ninguna o escasa expresión (< 3%) cuando se inyectan el mismo número de moléculas plasmídicas en el citoplasma (Capecchi, 1980), (Dean et al., 2005). Adicionalmente, experimentos de microinyección en citoplasma de líneas celulares demuestran que el importe nuclear de plásmidos depende de su tamaño; por ejemplo, fragmentos de DNA linear de 1.5 kb o más pequeños fueron detectados en el núcleo celular (Hagstrom et al., 1997), (Ludtke et al., 1999). Estudios utilizando lipoplexes y microscopia electrónica de transmisión demuestran que 1 de 100 moléculas de pDNA presentes en el citoplasma alcanzan el núcleo celular (Labat-Moleur et al., 1996), resultados que apoya la fuerte restricción de la barrera nuclear para el importe de los lipoplexes. Otras evidencias que apoyan la restricción de la barrera nuclear surgen de comparar la eficiencia de transfección en células en mitosis con células quiescentes (Tseng et al., 1999), (Wilke et al., 1996). La eficiencia de transfección con poliplex y lipoplexes es mayor en las células mitóticas debido a que en la división celular la envoltura nuclear desaparece temporalmente, lo que favorece el ingreso del número de copias del transgén en el núcleo (Marenzi et al., 1999;Giulotto and Israel, 1984). De igual forma se ha observado que los tipos celulares difieren en su capacidad de concentrar el DNA en el núcleo. Aunque la mitosis ayuda a la translocación del pDNA al núcleo, el proceso de importación, que es ineficiente aun cuando la envoltura esté rota, sigue siendo un proceso necesario para incrementar el número de copias del transgén en el núcleo. Wolf y colaboradores demostraron por primera vez el transporte de plásmidos al núcleo de células quiescentes vía el NPC. Estudios de bloqueo con aglutinina de germen de trigo (WGA) o con anticuerpos contra los componentes del

NPC han comprobado la participación de la ruta de importinas en el ingreso de los plásmidos al núcleo y su contribución a la eficiencia de expresión del transgén.

Es bien conocido que una gran variedad de macromoléculas y proteínas de procedencia exógena como los virus o endógena como las histonas son dirigidas al núcleo por poseer NLS, también conocidas como péptidos cariofílicos (PK). Estas señales son secuencias cortas de péptidos catiónicos que son reconocidas por las importinas. Para mejorar la eficiencia de transfección de los vectores no virales, se han adherido NLS sintéticas al pDNA, facilitando así el importe del DNA al núcleo de la célula (Chan and Jans, 2002). Hasta la fecha se han reportado diferentes NLS, entre las más utilizadas se encuentran el (NLS<sup>T</sup>), M9 derivada de la ribonucleoproteína heterogénea (hnRNP)A1, la proteína Vpr derivada del HIV-1, el residuo N-terminal de la proteína de la fibra Ad3 adenoviral, la proteína VP1 del SV40. La integración de esta última NLS en el pDNA del NT-poliplex incrementó significativamente la eficiencia de transfección (Navarro-Quiroga et al., 2002).

Las NLS pueden unirse al DNA de forma covalente; en este caso, se debe evitar la unión de la NLS al cassette de expresión para no bloquear su reconocimiento por los factores de transcripción y la polimerasa. Uniones no covalentes de la NLS se realizan a través de atracción electrostática entre las cargas aniónicas del DNA con los residuos catiónicos de la NLS o por fusión de la unión covalente del motivo catiónico (poli/oligosina, histona).

Debido a su carga de superficie positiva es posible que los poliplex asemejen NLS; sin embargo, son ineficientes debido a que muy pocos vectores alcanzan el núcleo.

Otra estrategia realizada para mejorar el importe nuclear es modificar el pDNA para ser reconocido por factores celulares como sustratos de importe nuclear que puedan proporcionar algún direccionamiento. La modificación incluye una clonación adicional de secuencias nucleotídicas reconocidas por factores de transcripción y la adición de motivos glicosilados (Kollen et al., 1997).

#### ***1.2.2.5. Desensamblaje del complejo***

El complejo polimérico que protege al DNA de la degradación enzimática, a su vez previene la unión de las proteínas requeridas para la transcripción del transgén. Es necesario reducir la fuerza de unión entre el polímero y el DNA para favorecer su desempaquetamiento. Esto se logra reduciendo el número de cargas positivas mediante la conjugación con cadenas Poly(ethylene glycol) (PEG) o disminuyendo la masa

molecular del polímero. Falta aclarar si es necesario que el DNA se disocie del poliplex antes de entrar al núcleo o si entra el complejo al núcleo y allí se disocia. Un estudio en el que se microinyectó un poliplex (PEI) en el citoplasma y en el núcleo, demostró la expresión del gen en ambos casos, concluyendo que la disociación del DNA del complejo para este tipo de poliplex no es necesaria para lograr la expresión del transgén (Lechardeur and Lukacs, 2002).

### ***1.3. Neurotensina: Molécula ligando del NT-poliplex***

La Neurotensina (NT) es la molécula ligando encargada de dar el primer punto de especificidad a la transferencia de genes por el NT-poliplex (Martinez-Fong et al., 1999; Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000; Alvarez-Maya et al., 2001; Navarro-Quiroga et al., 2002; rango-Rodriguez et al., 2006) {Arango-Rodriguez, 2006 431 /id}. La NT es un tridecapéptido (Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), cuya actividad biológica radica en los 6 aminoácidos del extremo carboxilo (Tyler-McMahon et al., 2000). La funcionalidad del NT-poliplex confirma que el método de conjugación utilizado permite la conservación del dominio de unión al receptor (Martinez-Fong et al., 1999; Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000; Alvarez-Maya et al., 2001; Navarro-Quiroga et al., 2002; Arango-Rodriguez et al., 2006; Gonzalez-Barrios et al., 2006a).

La NT es un neuromodulador que tiene una amplia distribución en el cerebro (Uhl et al., 1977) y en tejidos periféricos, principalmente el tracto gastrointestinal de diferentes especies incluyendo la humana (Kitabgi et al., 1976), en los que ejerce diferentes efectos fisiológicos (Bissette et al., 1976), (Kitabgi et al., 1985), (Nemeroff, 1986), (Malendowicz and Nussdorfer, 1994), (Tyler-McMahon et al., 2000), (Souaze et al., 2006). Sin embargo, los niveles de la NT endógena no impiden la internalización del NT-poliplex por las neuronas dopaminérgicas del cerebro.

En 1977 se reporta por primera vez la especificidad de unión de la NT a membranas sinápticas (Kitabgi et al., 1977). Tempranamente se conoció que la NT mediaba sus efectos fisiológicos a través de la interacción con receptores específicos, localizados en la membrana plasmática de la célula blanco (Barroso et al., 2000). Estudios de autoradiografía con NT radioactiva realizados en cortes cerebrales de diferentes mamíferos han determinado diferente densidad de los receptores a NT (NTRs) en diversas regiones del SNC. Los núcleos que tienen moderada densidad de NTRs son el estriado, el hipocampo ventral, la materia gris periacueductal, el colículo superior y el núcleo dorsal

del rafé (Fassio et al., 2000). La densidad más alta de receptores está en las neuronas de la SNc y en el VTA. La alta densidad de los NTRs en estos dos núcleos mesencefálicos fue el antecedente primordial para transferir genes a neuronas dopaminérgicas a través del NT-vector en un modelo murino de ratas hemiparkinsonianas (Alvarez-Maya et al., 2001; Martínez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000; Navarro-Quiroga et al., 2002), (Arango-Rodríguez et al., 2006; Martínez-Fong et al., 1999; González-Barrios et al., 2006a).

Se han identificado tres subtipos de NTRs, denominados NTS1, NTS2, NTS3. Estos receptores han sido clonados y se conoce la secuencia peptídica (Tanaka et al., 1990). Los dos primeros receptores están acoplados a la proteína G (GPCRs), (Yamada et al., 1998). Al igual que todos los receptores de la familia de los GPCRs, NTS1 y NTS2 tienen 7 dominios trans-membranales (TM) (Pelaprat, 2006). La homología entre el NTS1 y el NTS2 es de un 64%, pero las diferencias estructurales entre ellos son marcadas (Vincent et al., 1999). El NTS3 es un receptor que no pertenece a los GPCRs, posee un solo dominio TM el cual conserva un 100% de homología en la secuencia peptídica con gp95/sortilina, proteína asociada a receptor (RAP) e involucrada en el direccionamiento del mismo (Mazella, 2001).

Estudios bioquímicos han demostrado que el NTS1 ejerce su efecto fisiológico activando diferentes vías de señalización intracelular que involucran la formación de fosfatidil inositol trifosfato IP<sub>3</sub> (Pelaprat, 2006); el cual induce la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>) de depósitos intracelulares (Chabry et al., 1994; Gailly et al., 2000) la formación de AMPc (Hermans and Maloteaux, 1998), y la activación de varias MAP cinasas (Poinot-Chazel et al., 1996). Posterior a esto el NTS1 en unión con su ligando es internalizado por el sistema endocítico (Savdie et al., 2006). Se tomó ventaja de esta propiedad de internalización del NTS1 para considerar a la NT como molécula ligando del vector génico de NT.

Varios sistemas celulares estudiados hasta la fecha coinciden en que el mecanismo de internalización de la NT se realiza por endocitosis mediada por receptor y es dependiente de clatrina (Vandenbulcke et al., 2000).

Estudios de tráfico intracelular de la NT han reportado que la internalización del complejo NT/NTS1 implica: 1) El ligando es dirigido en forma intacta a un compartimento no ácido identificado como "Trans-Golgi Network" (TGN) (Vandenbulcke et al., 2000). 2) El receptor es dirigido predominantemente al lisosoma para su degradación más que para su reciclaje (Chabry et al., 1993), (Hermans et al.,

1997), aunque recientemente el grupo de la Dra. Forgez ha mostrado la presencia intranuclear del NTS1, que al parecer se asocia con la síntesis del mismo (Toy-Miou-Leong et al., 2004). 3) No hay evidencia de que la NT se dirija junto con el NTS1 al lisosoma (Vandenbulcke et al., 2000); pero sí se ha mostrado a la NT marcada con gránulos de plata dentro del núcleo (Castel et al., 1992b), atribuyéndole un papel en la regulación de la densidad de los receptores de la superficie celular (Vandenbulcke et al., 2000), (Hermans et al., 1997). De manera relevante para la transferencia génica mediada por poliplex, el conjunto de evidencias señala que la internalización de la NT evade la degradación lisosomal. Sobre esta base se sustenta el éxito del poliplex de NT para transferir genes *in vivo* (Alvarez-Maya et al., 2001; Arango-Rodriguez et al., 2006; Gonzalez-Barrios et al., 2006a).

#### **1.4. Antagonistas específicos para los receptores NTRs**

En la actualidad se cuenta con diferentes fármacos no comerciales antagonistas específicos para NTS1 y NTS2 (Kitabgi et al., 1987), (Mazella et al., 1996), lo cuales representaron una herramienta invaluable en la caracterización de la especificidad de transferencia génica de NT-vector (Martinez-Fong et al., 1999; Alvarez-Maya et al., 2001; Navarro-Quiroga et al., 2002; Arango-Rodriguez et al., 2006).

El primer antagonista descrito fue el SR48692, fármaco no peptídico, descubierto al azar durante el escaneo de cientos de químicos (Gully et al., 1993). El SR48692 tiene mayor afinidad para el NTS1 ( $IC_{50} = 5.6$  nM) que para el NTS2 ( $IC_{50} = 300$  nM), diferencia que ha permitido distinguir el papel del NTS1 y ciertas propiedades fisiológicas de la NT (Gully et al., 1993). Sin embargo el SR48692 cuenta con la desventaja de su limitada solubilidad en soluciones acuosas, lo que dificulta su uso. Recientemente el grupo de Sanofi desarrolló un antagonista más soluble, el SR142948A (Gully et al., 1997). Sin embargo, el SR48692 es más utilizado para diferenciar a ambos receptores en base a su afinidad (Gully et al., 1993). Por lo tanto la evaluación de la especificidad del NT-vector que se realizó en este trabajo se hizo con el antagonista SR48692 por su mayor selectividad hacía el receptor NTS1.

La mejor herramienta para diferenciar entre los receptores NTS1 y NTS2 es un potente fármaco antihistamínico la levocabastina que tiene mayor afinidad por el NTS2 que por el NTS1 (Kitabgi et al., 1987), (Mazella et al., 1996). Se ha demostrado que  $1 \mu\text{M}$  de levocabastina bloquea completamente la unión de la NT a los NTS2, sin cambiar las propiedades de unión del NTS1 (Yamada et al., 1998). Este efecto de todo o nada es una



manera simple y eficaz para diferenciar ambos receptores (Yamada et al., 1998), (Kitabgi et al., 1987). El desarrollo de antagonistas de los receptores de la NT han favorecido de manera significativa el entendimiento de la interacción de la NT con sus receptores en diferentes especies de mamíferos (Kitabgi et al., 1985), incluyendo la involucrada en el envío dirigido de genes (Arango-Rodriguez et al., 2006; Navarro-Quiroga et al., 2002; Alvarez-Maya et al., 2001; Martinez-Fong et al., 1999).

### ***1.5. Relación de la NT con el sistema dopaminérgico***

El conocimiento de la distribución del NTS1 asociado a diferentes formas de transporte intracelular ha sido fundamental para desarrollar diferentes modelos de transferencia génica mediante el NT-poliplex. Una de las aportaciones de este trabajo fue la factibilidad de enviar genes a las neuronas dopaminérgicas nigrales utilizando el transporte retrógrado para la NT desde el núcleo estriado.

El transporte axonal retrógrado es un proceso activo más lento (130 - 200 mm/día) que el anterógrado (400 mm/día) y ambos dependen de la integridad de los microtúbulos (Johnston et al., 1986). Ensayos con radioisótopos en el estriado de la rata, han mostrado que la mayoría de los receptores de NT están localizados en las terminales axónicas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, por ello la vía nigroestriatal dopaminérgica es un modelo de elección para estudiar el transporte axonal retrógrado de la NT desde el estriado hasta la SNc (Castel et al., 1992a), (Laduron, 1995). Faure y colaboradores en 1995 mostraron el transporte axonal retrogrado de la NT mediada por su NTS1 (Faure et al., 1995).

Inicialmente surgieron dos hipótesis para explicar la internalización de la NT y su transporte retrógrado. La primera hipótesis está asociada a la degradación de la NT en los lisosomas o su reciclamiento en el retículo endoplásmico rugoso (Castel et al., 1994a). La segunda hipótesis propone que la NT unida a su receptor participa en la regulación de la expresión del gen de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina en la SNc (Laduron, 1995), (Burgevin et al., 1992a), (Castel et al., 1992b). Estudios de inyección intraestriatal con  $[I^{125}]$ -NT indican que la acumulación de la marca radioactiva en la SNc se inicia después de dos horas de la inyección, detectándose el nivel más alto a las 4 horas, y ausencia del marcaje después de 24 horas. Estos datos muestran que el transporte retrógrado de la NT es más rápido que el descrito para otras moléculas en otras terminales axónicas (Johnston et al., 1986). Aproximadamente el 13% del marcaje se detecta sobre los cuerpos celulares neuronales,

cubriendo principalmente el citoplasma, una gran proporción de estos granos citoplasmáticos son detectados sobre organelas identificadas claramente como el retículo endoplásmico rugoso, la mitocondria, lisosomas, aparatos de golgi o cuerpos multivesiculares. Al asociar estos hallazgos con estudios de microscopia electrónica y HPLC, se confirma que la NT es procesada en una variedad de vías intracelulares, incluyendo degradación en los lisosomas, reciclamiento en el retículo endoplásmico rugoso y aparato de golgi (Castel et al., 1994a). Un 35% del marcaje se presentó en las dendritas. Un 2% del marcaje se localizó en el núcleo, esta observación asocia al transporte axonal retrógrado de la NT con la transmisión de información desde las terminales nerviosas al cuerpo celular y la expresión de genes como respuesta a una serie de eventos sinápticos distales (Castel et al., 1994b).

Diversas hipótesis han surgido respecto a la localización de la NT en el núcleo celular de las neuronas dopaminérgicas. Una de ellas es que la NT puede alcanzar el cuerpo celular y posteriormente se disocia de su receptor y se une a receptores específicos localizados en la membrana nuclear. Se ha reportado la evidencia de sitios de unión de alta afinidad de la NT en el núcleo de neuronas del cerebro medio (Beaudet et al., 1998). Por lo tanto, el complejo ligando-receptor puede entrar al núcleo y se puede unir a proteínas de unión nuclear para participar en la expresión de diferentes genes. Además, la asociación de la NT con el núcleo se puede explicar por la escasa degradación de la NT. Un hallazgo que sustenta la acción fisiológica de la internalización nuclear de la NT es el incremento en la expresión del RNAm de la TH (+39%) 4 horas post-inyección intraestriatal de NT, en las células de la SNc ipsilateral del estriado inyectado, comparado con los controles estriados inyectados con solución salina. A su vez se correlacionó el tiempo de la expresión del RNAm de TH con la presencia nuclear de NT en la SNc (Burgevin et al., 1992a; Burgevin et al., 1992b). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que el efecto de la NT en la expresión del RNAm de TH no sea directo, sino a través de otras moléculas mensajeras producidas por la activación del receptor a NT en la superficie de la membrana celular.

### ***1.6. Expresión regulable de genes mediante el sistema de tetraciclina***

Gossen y Bujard desarrollaron el sistema de expresión regulable de tetraciclina en sus modalidades Tet-Off (1992) (Gossen and Bujard, 1992a) y Tet-On (1995) (Gossen et al., 1995). El sistema regulable de tetraciclina es considerado como una poderosa

herramienta genética que permite la expresión controlada y precisa del transgén ya sea en células cultivadas o en animales transgénicos (Kistner et al., 1996). El sistema regulable de tetraciclina involucra dos componentes subclonados en dos plásmidos diferentes. Un plásmido contiene el cDNA que codifica para el elemento regulador de tetraciclina de procariontes (TetR) o para el elemento regulador transverso de la tetraciclina (rTetR). El segundo plásmido contiene el elemento de respuesta a la tetraciclina y el promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) que dirige la expresión del gen de interés (Presland and Fleckman, 2005).

En el sistema Tet-Off, la expresión del gen se activa cuando la tetraciclina (Tc) o doxiciclina (Dc) es removida del medio de cultivo, mientras que el sistema Tet-On se activa únicamente con la adición de Dc. Ambos sistemas permiten una alta expresión de genes de manera regulada en respuesta a diversas concentraciones de Tc o Dc. La expresión lograda con el sistema regulable es comparable con la obtenida con promotores constitutivos de mamíferos como CMV. A diferencia de otros sistemas inducibles de expresión de genes en mamíferos, el sistema Tet posee un alto grado de especificidad.

El sistema Tet se basa en la proteína represora TetR, la cual regula negativamente al operón de resistencia a la tetraciclina en el Transposon Tn10 presente en *E. coli*. El bloqueo de la transcripción de estos genes TetR se da por la unión de la secuencia del operador tet (tetO) en ausencia de Tc. Tanto el TetR y el TetO son la base de la regulación y la inducción de los sistemas regulables en mamíferos.

La proteína reguladora en el sistema Tet-Off se llama trans-activador controlado por tetraciclina (tTA) y es una proteína de fusión (37 kDa) que contiene los a.a 1-207 de TetR y 127 a.a del C-terminal del dominio de activación VP16 del Herpes simples (Triezenberg et al., 1988) (Figura 2). La proteína de fusión actúa como un activador transcripcional. El tTA es codificado por el plásmido regulador pTet-Off, el cual posee también un gen de resistencia a la neomicina que permite la selección de células transfectadas establemente.

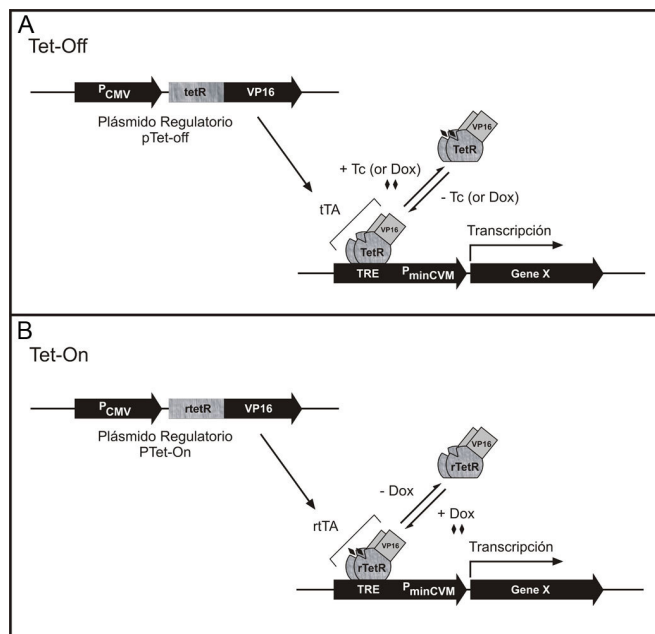
La proteína reguladora en el sistema Tet-On se llama trans-activador reverso controlado por tetraciclina (rtTA) es una proteína de fusión que contiene un represor reverso de Tet (rTetR) que resulta de la mutación de cuatro a.a en el TetR (Gossen et al., 1995), (Hillen and Berens, 1994), (Gossen and Bujard, 1995) y el VP16. La proteína de fusión se convierte en un activador transcripcional por la unión de la tetraciclina (Figura 2). La

proteína rtTA es codificada por el plásmido regulador pTet-On, que también posee un gen de resistencia a la neomicina.

El segundo plásmido que contiene el gen de interés, tiene el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE). El sistema TRE consiste en 7 repeticiones de una secuencia de 42-bp contenidas en el tetO, localizado corriente arriba del promotor mínimo del CMV ( $P_{\min\text{CMV}}$ ). El  $P_{\min\text{CMV}}$  carece del elemento amplificador asociado normalmente con el promotor temprano inmediato al CMV. Debido a la pérdida del elemento amplificador hay una mínima expresión del gen de interés desde el elemento TRE en ausencia de de tTA o de rtTA.

Otro grupo de vectores regulables son los pTRE-tight a los cuales se les ha modificado el elemento TRE ( $\text{TRE}_{\text{mod}}$ ) corriente arriba del  $P_{\min\text{CMV}}$  ( $P_{\min\text{CMV}\Delta}$ ) para reducir la expresión basal del gen de interés. Este sistema es de gran utilidad cuando se requiere ausencia de expresión del gen de interés, como aquellas proteínas que son extremadamente potentes o tóxicas para la célula huésped.

Debido a que en esta tesis se utilizó el sistema Tet-On solamente se explicará su funcionamiento. Los dos plásmidos del sistema se deben expresar en la misma célula. El plásmido pTetOn expresan rtTA, la cual es inactiva en ausencia de Dc. Cuando Dc se añade al medio, ésta se une a rtTA formando el complejo transcripcional que se une al TRE del plásmido que contiene el gen de interés bajo la regulación de  $P_{\min\text{CMV}\Delta}$ . Esta unión activa la transcripción del plásmido. Lógicamente, la transcripción se desactiva cuando se retira la Dc (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de regulación de la expresión de genes por el sistema pTet-Off (A) y pTet-On (B). Panel A. El TRE es localizado corriente arriba del promotor mínimo de citomegalovirus ( $P_{\text{minCMV}}$ ), el cual es silente en ausencia de activación. El activador de tetraciclina (tTA) se une al TRE y activa la transcripción del gen de interés en ausencia de Tc o Dc, por lo tanto, la presencia de alguno de esos antibióticos inhibe la transcripción debido a que se retira el complejo tTA del elemento TRE. Panel B. El represor reverso TetR (rTetR) fue creado por el cambio de cuatro aminoácidos invirtiendo la respuesta de la proteína a Dc, como resultado a estos cambios el rtTA se une al TRE y activa la transcripción en presencia de Dc.

### **1.7.1. Ventajas de los sistemas Tet**

Los sistemas Tet-Off y Tet-On poseen varias ventajas sobre otros sistemas de regulación de la expresión de genes que funcionan en células mamíferas. La regulación por ambos sistemas es extremadamente precisa, el background del gen de interés es mínimo en la ausencia de inducción, siendo más bajo con el sistema pTRE o su variante. No se observa ningún efecto pleiotrópico cuando se introduce en células mamíferas. Las proteínas regulatorias procarióticas (TetR o rTetR, precursores procarióticos tTA y rtTA) actúan específicamente en sus secuencias blanco debido a que estas secuencias regulatorias de DNA no estén presentes en genomas eucarióticos. El sistema regulatorio Tet es altamente inducible y la respuesta se da rápidamente, se ha observado que la inducción puede ser detectada entre 30 minutos usando niveles del inductor no tóxicos, mientras que otros sistemas de inducción en mamíferos han mostrado una leve inducción en varios días o una inducción incompleta o una alta inducción alcanzando niveles tóxicos (Gossen and Bujard, 1993), (Yarranton, 1992).

## **2. Planteamiento del problema**

Nuestro grupo desarrolló el NT-poliplex para transferir genes terapéuticos a tipos celulares específicos mediante la endocitosis del NTS1. Recientemente reportamos la capacidad del NT-poliplex de transferir el gen neurotrófico GDNF a neuronas dopaminérgicas de ratas hemiparkinsonianas. Evidencias anatómicas, bioquímicas y funcionales, apoyan fuertemente el potencial del NT-poliplex en la terapia neurotrófica (Gonzalez-Barrios et al., 2006a). A su vez, experimentos en curso exploran la potencialidad y funcionalidad del NT-poliplex en la terapia génica del neuroblastoma en ratones Nun-nuRb. No obstante, a las destacadas ventajas de nuestro vector como son: su especificidad, eficiencia, duración prolongada de la expresión del transgén, y su versatilidad para aplicarlo en dos diferentes modelos animales de terapia génica, se desconocían las propiedades biofísicas del mismo como son: la relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex que producen la máxima eficiencia de transfección para cada uno de los plásmidos de interés, el efecto de la transfección en la viabilidad celular, la capacidad del NT-poliplex para transferir dos diferentes plásmidos simultáneamente, los cambios físicos que ocurren por la interacción entre sus componentes y su estabilidad cuando se somete a cambios drásticos de acidez. A su vez, se ha reportado que la expresión continua de factores neurotróficos induce efectos citotóxicos en las neuronas, por ello quisimos regular la expresión del transgén mediante dos acercamientos, el primero fue con un elemento transcripcional endógeno el promotor del gen del transportador de dopamina humano (hDAT) que reguló la expresión del transgén BDNF-flag *in vivo*, y el segundo se logró con el sistema regulable pTet-On - pTRE-Tigh y algunas construcciones quiméricas derivadas de este sistema, las que fueron ensayadas en células en cultivo. Finalmente, al haber determinado la proporción de los componentes del NT-vector que producen nanopartículas solubles que puedan ser internalizadas de manera eficiente e inocua, quisimos diseñar una estrategia que permitiera desarrollar el NT poliplex auto-ensamblado con el objetivo de simplificar la síntesis química del NT-vector original y superar su eficiencia de transfección.

### **3. Objetivo General**

Por esta razón, los objetivos principales de esta tesis fueron:

1. Caracterizar las propiedades biofísicas del NT-poliplex que determinan su condensación en nanopartículas solubles para ser internalizadas de manera eficiente e inocua.
2. Regular la expresión del transgén por elementos transcripcionales endógenos y por construcciones transcripcionales quiméricas.
3. Diseñar la estrategia para el auto-ensamblaje del vector génico de neurotensina.

### **4. Objetivos específicos**

Caracterizar las propiedades biofísicas del NT-poliplex que determinan su condensación en nanopartículas solubles para ser internalizadas de manera eficiente e inocua.

1. Determinar la proporción y contribución de los componentes del NT-vector para su masa molecular.
2. Determinar los cambios en el patrón electroforético ocurridos por la interacción de los componentes del NT-poliplex.
3. Determinar por microscopía electrónica de transmisión los cambios físicos del pDNA en los pasos secuenciales de la formación del NT-poliplex.
4. Valorar el efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex
5. Determinar la relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex que producen la máxima eficiencia de transfección para cada uno de los plásmidos de interés.
6. Estudiar la capacidad del NT-poliplex para transfectar dos diferentes plásmidos simultáneamente.
7. Asociar el efecto de diferentes relaciones molares del NT-poliplex con la viabilidad celular.

Regular la expresión del transgén por elementos transcripcionales endógenos y con construcciones transcripcionales quiméricas.

1. Evaluar la efectividad del promotor del gene del transportador de dopamina humano (hDAT) para regular la expresión del transgén BDNF-flag *in vivo*.
2. Evaluar el sistema regulable pTet-ON - pTRE-Tigh en células en cultivo.

## Diseñar la estrategia para el NT-poliplex auto-ensamblado

1. Determinar la concentración molar óptima de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado.
2. Determinar los cambios en el patrón electroforético ocurridos por la interacción de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado.
3. Determinar por microscopía electrónica de transmisión los cambios físicos del pDNA en los pasos secuenciales de la formación del NT-poliplex auto-ensamblado.
4. Evaluar la especificidad de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado.
5. Estudiar la eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado.



## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Síntesis del NT-vector: [<sup>125</sup>I]-NT-[<sup>3</sup>H]-PF-SPDP-PLL**

Para la síntesis del NT-vector se utilizaron los siguientes péptidos marcados radioactivamente: la [<sup>125</sup>I]-NT (ELYENKPRRPYIL) con una pureza >90% y una actividad específica = 2000 Ci/mmol, 10 µCi (Amersham Pharmacia; Buckinghamshire, UK) y el [<sup>3</sup>H]-PF (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK), con una pureza del 96% y actividad específica = 4.5mCi/mmol, 10 µCi (Synpep Corp., Dublín, CA, USA). Ambos péptidos se unieron de forma simultánea a PLL de masa molecular (MM) de 48 KDa, la cual posee 328 grupos aminos potencialmente reactivos (Sigma, St. Louis MO, USA). Se utilizó el método de entrecruzamiento bifuncional con N-succinimidil 6-3[3-(2-piridilditio)propionamido] hexanoato (LC-SPDP; Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA).

La síntesis del NT-vector es un proceso que consiste en cuatro pasos secuenciales realizados a temperatura ambiente: 1) formación del conjugado PLL-SPDP-SH, 2) formación del conjugado [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP, 3) formación de [<sup>3</sup>H]-PF-SPDP, 4) formación del NT-vector ([<sup>125</sup>I]-NT-[<sup>3</sup>H]-PF-SPDP-PLL) a partir de los conjugados obtenidos previamente con el SPDP.

#### **5.1.1 Formación del conjugado PLL-SPDP-SH**

Se disolvieron 20 mg de PLL (48 KDa) en 1 mL de una solución balanceada de fosfatos (PBS; 17.42 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.58 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.2). Se mezcló con 7.5 mg de LC-SPDP disueltos previamente en 30 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). La mezcla de la PLL con el LC-SPDP se incubó durante 30 minutos en agitación constante. Finalizado este periodo, el conjugado resultante (PLL-SPDP) se purificó en una columna Econo-Pac 10DG (Bio-Rad Laboratorios; Hercules, CA, USA) equilibrada con PBS. Se recolectaron fracciones de 1 mL; de cada fracción se tomó una alícuota que se diluyó 1:5 con PBS para determinar la absorbancia a 215 y 280 nm. La columna Econo-Pac 10DG permite la elusión de moléculas < 6000 Da, por lo tanto el conjugado de PLL-SPDP (52043 Da) se obtiene en el volumen del primer pico (3-7 mL), mientras que el SPDP libre (425.5 Da) y la N-hidroxisuccinimida (114 Da) liberada como producto de la reacción eluyen en el segundo pico (7.5-15 mL). Por lo

tanto, las fracciones que corresponde al primer pico se recolectaron y concentraron en un volumen de 1 mL, mediante un concentrador por vacío (Heto).

Para generar el conjugado altamente reactivo, el PLL-SPDP-SH, 12 mg de dithiothreitol (DTT) se disolvieron en 0.5 mL de PBS y se adicionaron a 1 ml de la solución PLL-SPDP. La mezcla se incubó durante 30 minutos con agitación constante. Al final de la incubación, una alícuota de la mezcla de la reacción se diluyó 1:10 para medir la absorbancia a 343 nm, longitud de onda que detecta a la piridina-2-tiona liberada durante la reacción. De esta forma se determinó la eficiencia de la conjugación en la reacción, mediante la siguiente fórmula:

$$C = (\text{Abs } 343 \text{ nm} / E_{343 \text{ nm}}) \times \text{FD}$$

Donde:

**C** = concentración de la piridina-2-tiona;

**Abs 343 nm** = absorbancia de la piridina-2-tiona a esta longitud de onda;

**E 343 nm** = coeficiente de extinción molar a 343 nm ( $8.08 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )

**FD** = factor de dilución

El conjugado PLL-SPDP-SH se purificó posteriormente en una columna Econo Pac 10 DG equilibrada con PBS, recolectando fracciones de 1 mL. Cada fracción se diluyó 1:5 con PBS para determinar la absorbancia a 215, 280 y 343 nm. Teniendo en cuenta el rango de separación de esta columna, el conjugado PLL-SPDP-SH (50613 Da) eluye en el volumen del primer pico (2-6 mL) y la piridina-2-tiona (110 Da) eluye en el segundo pico (9-14 mL). Las fracciones del primer pico se recolectaron y concentraron a un volumen de 1 mL.

### **5.1.2 Formación del conjugado [125I]-NT-SPDP**

La actividad específica (2000 Ci/mmol) de la [<sup>125</sup>I]-NT se disminuyó a 1673 μCi/mmol por la adición de 10 mg de NT. La cantidad total de [<sup>125</sup>I]-NT (1797 Da) se disolvió en 1 mL de PBS y se mezcló con 5 mg de LC-SPDP disueltos previamente en 30 μL de DMSO. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos en agitación constante. Finalizada la incubación, el conjugado NT-SPDP se purificó en una columna de Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) equilibrada con PBS. Se recolectaron fracciones de 0.25 mL; alícuotas de cada fracción se diluyeron 1:15 con PBS para determinar la absorbancia a 280 nm. La capacidad de elusión del Sephadex G-10 es <700 Da, por lo tanto el conjugado NT-SPDP (2419 Da) eluye en el

volumen del primer pico (5-7 mL), mientras que el SPDP libre (425.5 Da) y la N-hidroxisuccinimida de (114 Da) eluyen en el segundo pico (7.5-10 mL). Se recolectaron las fracciones que corresponden al primer pico y se concentraron a 1 mL. La radioactividad del [<sup>125</sup>I] se midió en un contador  $\gamma$  Packard Cobra II (eficiencia del 40%; PerkinElmer; Boston MA, USA).

### **5.1.3 Formación del conjugado [3H]-PF-SPDP**

La actividad específica (4.5 mCi/mmol) del [<sup>3</sup>H]-PF se disminuyó a 3.37 mCi/mmol por la adición de 2 mg de PF. Una cantidad de 8 mg de [<sup>3</sup>H]-PF (2695 Da) se diluyeron en 1 mL de PBS y se mezclaron con 2.5 mg de LC-SPDP, disuelto previamente en 30  $\mu$ L de DMSO. La mezcla se incubó durante 30 minutos con agitación constante. Finalizado este periodo de incubación, el conjugado de la [<sup>3</sup>H]-PF-SPDP se purificó en una columna de Sephadex G-15 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) equilibrada con PBS. Se recolectaron fracciones de 0.25 mL; una alícuota de cada fracción se diluyó 1:15 con PBS para determinar la absorbancia a 280 nm. La capacidad cromatográfica del Sephadex G-15 es < 1500 Da; por lo tanto, el conjugado [<sup>3</sup>H]-PF-SPDP (3317Da) eluye en el volumen del primer pico (5-8 mL), mientras que el SPDP libre (425.5 Da) y la N-hidroxisuccinimida (114 Da) eluyen en el segundo pico (8.75 - 12.5 mL). Se recolectaron las fracciones que corresponden al primer pico y se concentraron a un volumen de 1 mL.

Alícuotas diluidas 1:12.5 fueron analizadas en un contador  $\beta$  Beckman LS6500 (eficiencia del 40%; Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA) para determinar la cantidad de [<sup>3</sup>H]-PF.

### **5.1.4 Formación del NT-vector a partir de los conjugados previos**

Los tres conjugados con SPDP obtenidos previamente se mezclaron e incubaron durante 8 horas con agitación continua. Al finalizar este periodo, se tomó una alícuota de la mezcla de la reacción y se diluyó 1:10 para medir la absorbancia de la piridina-2-tiona a 343 nm. En base a su absorbancia se determinó la eficiencia de la reacción de conjugación mediante la fórmula:

$$C = (\text{Abs } 343 \text{ nm} / E_{343} \text{ nm}) \times \text{FD} \text{ (Fórmula descrita en el numeral 5.1.1.)}$$

Finalmente el conjugado [ $^{125}\text{I}$ ]-NT- $[\text{}^3\text{H}]$ -PF-SPDP-PLL se purificó en Biogel A1.5m (Bio-Rad Laboratorios; Hercules, CA. USA) utilizando como fase móvil un buffer de 2 M de guanidina en 10 mM de HEPES, a pH de 7.4. Se recolectaron fracciones de 1 mL; alícuotas de cada fracción se diluyeron 1:3 con PBS para medir la absorbancia a 215 nm. A su vez, se realizaron diluciones 1:50 para ser analizadas tanto en un contador  $\gamma$  como en uno  $\beta$  para determinar la concentración de [ $^{125}\text{I}$ ]-NT y el  $[\text{}^3\text{H}]$ -PF, respectivamente. El cromatograma mostró dos poblaciones moleculares de conjugado [ $^{125}\text{I}$ ]-NT- $[\text{}^3\text{H}]$ -PF-SPDP-PLL, las cuales fueron recolectadas y reducidas individualmente a un volumen final de 1.3 mL, utilizando una cámara concentradora bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  (Amicon Corporation Lexington, MA, USA). Al finalizar el proceso de concentración, el NT-vector se sometió a sucesivas diálisis con PBS para células (8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 138 mM  $\text{NaCl}$ , 2.7 mM  $\text{KCl}$ , pH 7.4) y se esterilizó por filtración (membrana hidrofílica de 0.22  $\mu\text{M}$ ). En cada una de las dos poblaciones recolectadas del conjugado [ $^{125}\text{I}$ ]-NT- $[\text{}^3\text{H}]$ -PF-SPDP-PLL se cuantificó la concentración de [ $^{125}\text{I}$ ]-NT y de  $[\text{}^3\text{H}]$ -PF. La concentración de la PLL se determinó mediante espectrofotometría a 215 nm. El NT-vector se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  en pequeñas alícuotas, permaneciendo estable por un periodo de 1 año.

## **5.2. Síntesis del vector sin ligando (PF-SPDP-PLL)**

El vector sin ligando PF-SPDP-PLL denominado “untargeted” contiene todos los componentes del NT-vector exceptuando la NT. El vector “untargeted” se sintetizó conservando la misma proporción de los componentes del NT-vector y se purificó siguiendo todo el procedimiento descrito en el numeral 5.1, exceptuando el paso 5.1.2.

## **5.3. Plásmidos**

En los diferentes experimentos se utilizaron los siguientes plásmidos.

El pEGFP-N1 (4.7 kbp), codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del CMV (Clontech, Palo Alto, CA, USA), (Figura 3A).

El pECFP-Nuc (4.8 kbp), codifica para la proteína cian fluorescente (CFP) bajo el control del promotor del CMV (Clontech, Palo Alto, CA, USA), (Figura 3B).

El pDAT-BDNF-flag (10.597 kbp), codifica para el BDNF-flag bajo el control del promotor hDAT el cual fue obtenido de la clonación de 854 bp de BDNF-flag en EcoRV-SalI de pDAT-EGFP, (Figura 3C).

El pDAT-EGFP (10.45 kbp), codifica para la GFP bajo el control del promotor hDAT (transportador de dopamina humana), el cual fue obtenido mediante la clonación de 6250 bp del extremo 5'-flanking de la región regulatoria del hDAT en Eco47III/Bgl1II de

pEGF-P1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), (Figura 3D).

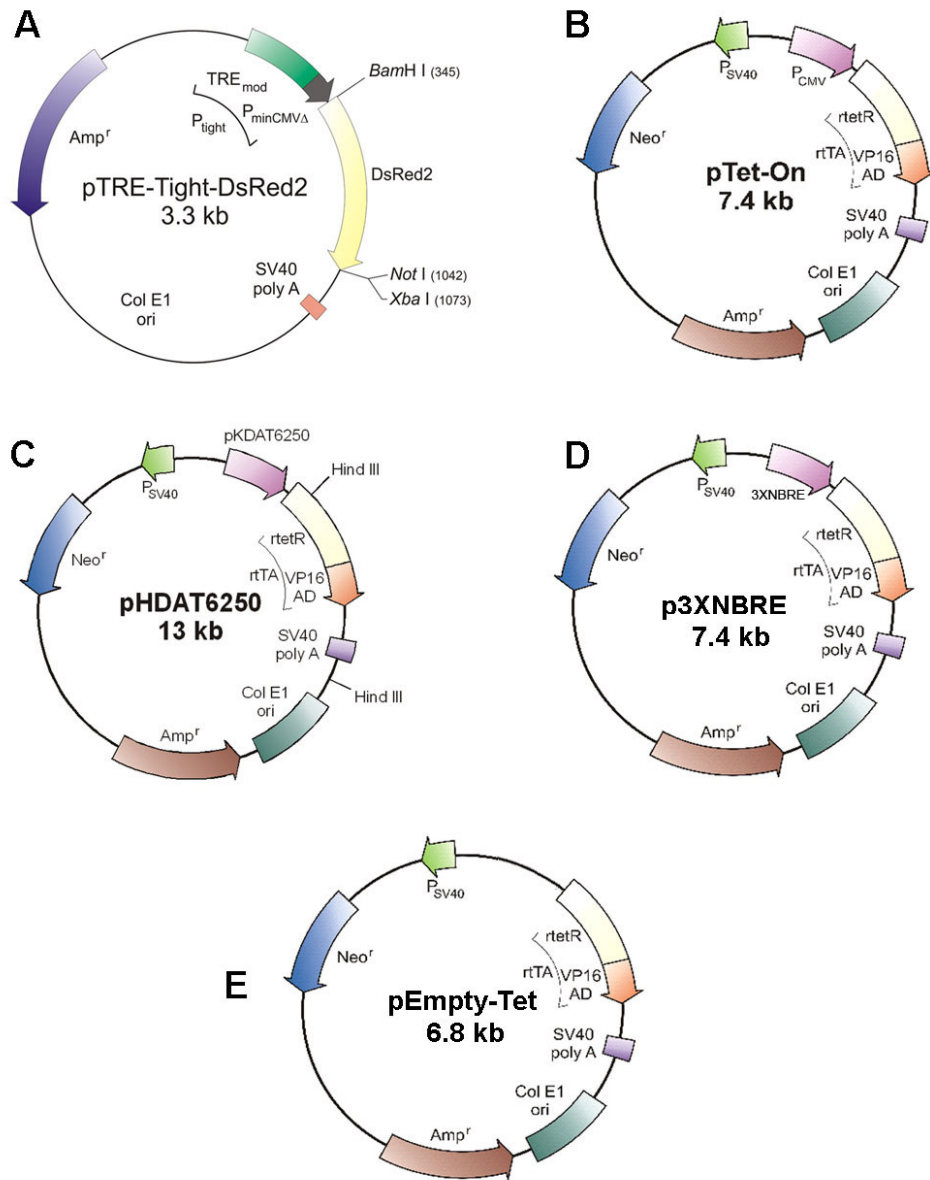
El pTRE-Tight-DsRed2 (3.3 kbp), codifica para la proteína roja fluorescente (DSRED2) bajo el control del promotor mínimo del CMV ( $P_{\min\text{CMV}\Delta}$ ) (Clontech, Mountain View, CA, USA), (Figura 4A).

El pTet-On (7.37 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor del CMV (Clontech, Mountain View, CA, USA), (Figura 4B).

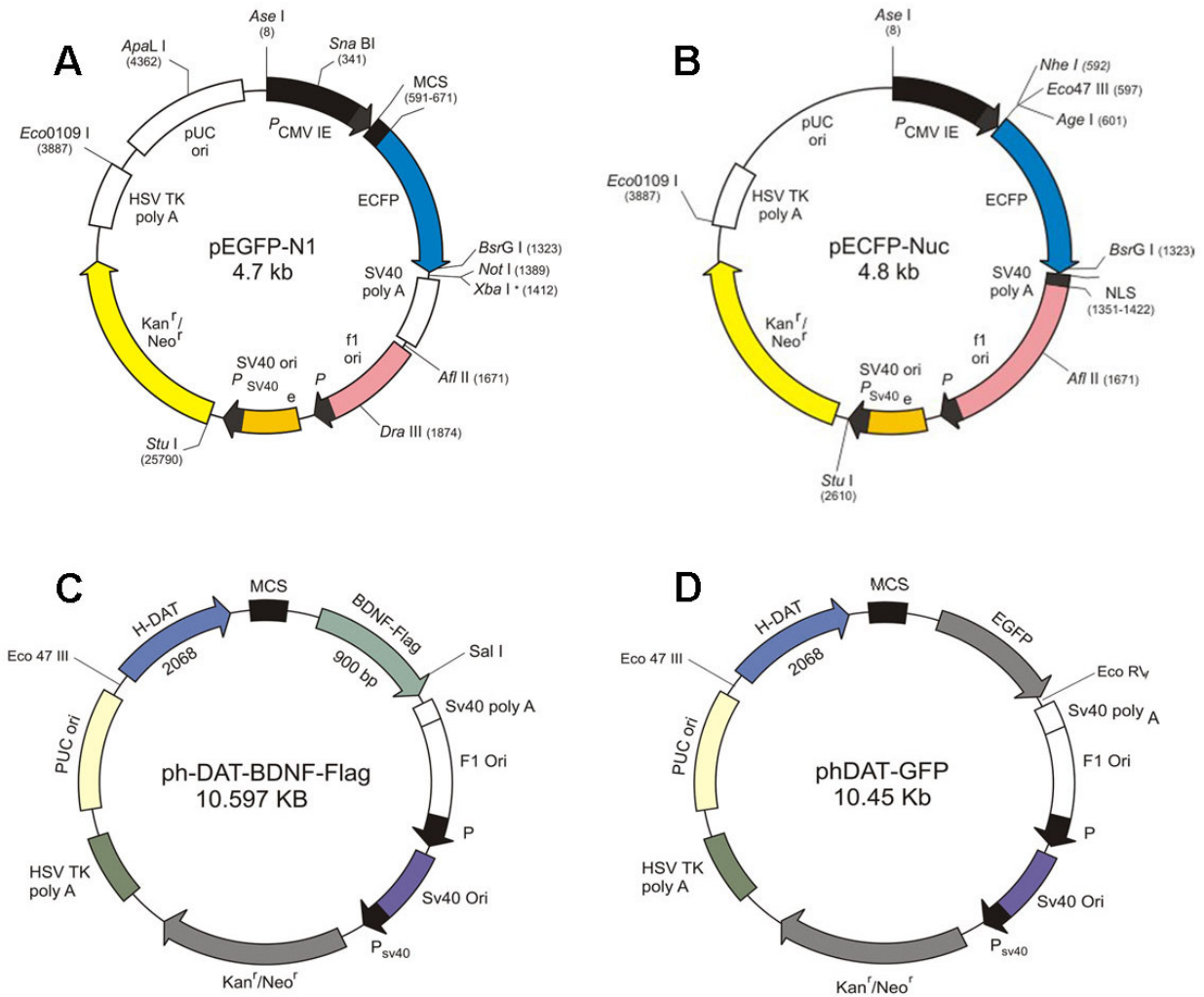
El hDAT-6250 pTet-On (13.054 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor hDAT, construido por el Dr. Michael J. Bañón, (Figura 4C).

El 3xNBRE pTet-On (7.391 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor 3xNBRE (3 elementos de respuesta a Nurr1, en tandem), construido por el Dr. Michael J. Bañón, (Figura 4D).

El Empty-Tet (7.391 kbp), consiste en el pTet-On ligado después de corte del promotor CMV (Figura 4E).



**Figura 3.** Esquema de los plásmidos. A) El pEGFP-N1 (4.7 kbp), codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del CMV. B) El pECFP-Nuc (4.8 kbp), codifica para la proteína cian fluorescente (CFP) bajo el control del promotor del CMV. C) El pDAT-BDNF-flag (10.597 kbp), codifica para el BDNF-flag bajo el control del promotor hDAT. D) El pDAT-EGFP (10.45 kbp), codifica para la GFP bajo el control del promotor hDAT.



**Figura 4.** Esquema de los plásmidos. A) El pTRE-Tight-DsRed2 (3.3 kbp), codifica para la proteína roja fluorescente (DsRed2) bajo el control del promotor mínimo del CMV ( $P_{\min CMV\Delta}$ ). B) El pTet-On (7.37 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor del CMV. C) El hDAT-6250 pTet-On (13.054 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor hDAT. D) El 3xNBRE pTet-On (7.391 kbp), codifica para la proteína (rtTA) bajo el control del promotor 3xNBRE (3 elementos de respuesta a Nurr1, en tandem). E) El Empty-Tet (7.391 kbp), consiste en el pTet-On ligado después de corte del promotor CMV.

#### ***5.4. Formación del complejo pDNA-PK***

La mutante de la proteína Vp1 del virus SV40 (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK) fue sintetizada por Synpep (Corp., Dublín, CA, USA) con una pureza del 90%. El PK posee carga neta positiva, permitiéndole su unión electrostática al pDNA (polianión) para formar así el complejo pDNA-PK. Tanto la solución del PK como del pDNA se diluyeron con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) libre de suero. La solución de PK se adicionó gota a gota a la solución del pDNA y la mezcla se agitó de forma constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente a la solución que contiene el complejo pDNA-PK se adicionó suero bovino fetal al 1% (SBF), mezclando levemente.

#### ***5.5. Formación del NT-Poliplex***

El complejo NT-poliplex fue formado a concentraciones constantes de pDNA (6 nM), PK (5  $\mu$ M) y 1% de SBF, y a concentraciones crecientes del NT-vector (de 162 nM a 204 nM). El pDNA, el PK y el NT-vector se disolvieron individualmente en DMEM libre de suero, conservando las siguientes proporciones: 3 partes de pDNA, 1 parte de PK, y 2 partes del NT-vector. La formación del NT-poliplex se realizó siguiendo los siguientes pasos: 1) la solución de PK se adiciona gota a gota a la solución del pDNA; la mezcla se agita suavemente a 900 rpm durante 30 minutos; 2) Se adiciona 1% de SBF a la solución pDNA-PK y se mezcla rápidamente; 3) a continuación se adiciona gota a gota la solución que contiene el NT-vector y se incuba durante 30 minutos con agitación continua (900 rpm). Todos los procedimientos son realizados a temperatura ambiente.

#### ***5.6. Geles de retardo y retención electroforética***

Se utilizaron los microensayos de retardo y retención electroforética para determinar la relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex original y auto-ensamblado. Para seleccionar la relación molar entre el pDNA y el PK que produjera polifecciones eficientes, se incubaron concentraciones constantes del pDNA (6 nM) con concentraciones crecientes del PK durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Al final de la incubación las diferentes mezclas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 80 V por 1 hora, y el corrimiento del pDNA se reveló con bromuro de etidio (10  $\mu$ g/ml en TAE). Se seleccionó la primera relación que mostró un claro retardo electroforético con respecto al pDNA control (sin PK). Esta relación se conoce como la relación óptima del transgén-PK según lo establecieron



nuestros trabajos previos (Navarro-Quiroga et al., 2002), (Arango-Rodriguez et al., 2006), (Gonzalez-Barrios et al., 2006a). A continuación se incubó esta relación óptima en forma constante (6 nM con respecto al pDNA, 5  $\mu$ M de PK) con concentraciones crecientes del NT-vector, con la finalidad de encontrar la relación óptima de la formación del NT-poliplex. Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Al final de la incubación, las diferentes mezclas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 80 V por 1 hora, y el corrimiento del pDNA se evidenció con bromuro de etidio (10  $\mu$ g / ml en TAE). Se seleccionó aquella relación en la que se observó claramente la retención del poliplex en el pozo. Esta relación se conoce como la relación óptima del NT-poliplex como lo hemos establecido en trabajos previos (Navarro-Quiroga et al., 2002), (Arango-Rodriguez et al., 2006). Las bandas fueron fotografiadas con una cámara Kodak EDAS 290 (Kodak Co.; Rochester, NY, USA).

### ***5.7. Efecto del pH en la estabilidad del NT- Poliplex***

Después de formar el NT-poliplex a la relación molar de 1:26 y a pH 7.4 se dividió en varias alícuotas que se sometieron a electroforesis en carriles aislados que contenían buffer a diferente pH. Para esto se fabricó una cámara de diez carriles separados que permitió el corrimiento individual de las muestras bajo el mismo campo eléctrico (80 v). Alícuotas del mismo volumen se colocaron individualmente en mini-geles de agarosa al 0.8% formados con buffer de corrimiento TAE (40 mM TRIS acetato y 1 mM EDTA) a diferente pH (7.2, 6.9, 6.6, 6.3, 6.0, 5.7, 5.4, 5.1, 4.8 y 4.5). Al final de la electroforesis, los bandas se tiñeron con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL) y se fotografiaron con una cámara Kodak EDAS 290 (Kodak Co.; Rochester, NY, USA) para analizar el patrón de migración del pDNA.

### ***5.8. Análisis del NT- Poliplex por microscopía electrónica***

Rejillas de cobre de 100 mayas se cubrieron con una solución al 2% de formvar-cloroformo y posteriormente se sometieron a un proceso de sublimación con Victawet (SPI-Chem TM West Chester,PA,USA). Se analizaron las siguientes muestras: 1) pDNA, 2) el complejo pDNA-PK, 3) el complejo anterior incubado con 1% de SBF y el 4) complejo final NT-poliplex formado a diferentes relaciones molares del complejo pDNA-PK y del NT-vector . Todas las muestras contenían concentraciones constantes de pDNA (6 nM) y PK (5  $\mu$ M) y se prepararon como se describió en el numeral 5.4.

Cada muestra se mezcló de forma individual v/v con 1.5% de acetato de uranilo disuelto en agua. Se depositó una gota de la muestra en la rejilla durante un minuto, la cual se secó posteriormente desde un extremo de la rejilla. Ésta se lavó dos veces con agua destilada, adicionada con una pipeta pasteur y se dejó secar totalmente. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2000EX (JEOL, Ltd; Tokio, Japan) con un objetivo de apertura # 4 y un voltaje de aceleración de 80 kv.

### ***5.9. Expresión in vitro de genes reporteros transfectados por el NT-poliplex***

Los estudios de expresión *in vitro* tanto para el NT-vector tradicional como el auto-ensamblado, se realizaron en la línea celular de neuroblastoma murino N1E-115, conocida por expresar exclusivamente el receptor NTS1 (Amar et al., 1985). Las células se cultivaron con DMEM suplementado con 10% de SBF y penicilina-streptomina (100 µg/mL de cada uno), se mantuvieron en cultivo a 37 °C bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. La eficiencia de transfección y cotransfección del NT-poliplex se determinó utilizando los plásmidos pEGFP-N1 y pECFP-Nuc. Los ensayos de transfección se realizaron cuando las células presentaban un 50% de confluencia en pozos de 1-mm de diámetro (48 h post-siembra a partir de un inóculo de 12500 células). En este punto se les adicionó el NT-poliplex formado a diferentes relaciones molares. Después de 24 horas de transfección, el medio se diluyó 1:2 con medio fresco suplementado y las células se incubaron por un periodo adicional de 48 h (periodo de expresión). Al finalizar este tiempo, las células se lavaron una vez con PBS para ser fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. En seguida, las células se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos cada lavado) para ser teñidas con yoduro de propidio (1 µM) durante 3 minutos. Después de 3 periodos de lavado (5 minutos cada uno) con PBS se agregó Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) a las laminillas y se sellaron. La fluorescencia en las células se analizó con el objetivo 20 X del microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany), usando los siguientes filtros: K3 para la GFP; TX2 para el yoduro de propidio, y BGR para CFP, GFP y el yoduro de propidio. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F camera (Leica Microsystems; Nussloch, Germany).

### **5.10. Ensayo de viabilidad celular**

Para evaluar el posible efecto citotóxico del NT-poliplex *in vitro* se realizó el estudio colorimétrico de viabilidad celular basado en la conversión enzimática del tetrazolio (MTT; (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio). Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, USA) a formazan (Mosmann, 1983). Las células N1E-115 fueron sembradas en platos de 4 pozos y fueron transfectadas con diferentes relaciones molares del NT-poliplex, como se describió en el numeral 5.9. Al finalizar el periodo de expresión, se adicionó el MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y posteriormente las células fueron incubadas durante un periodo adicional de 4 h. Al terminar este periodo se adicionó la solución de solubilización (10% SDS, 0.01 M HCl), la cual se dejó toda la noche. El volumen total de cada uno de los pozos con las diferentes transfecciones se colocó en pozos respectivos de un plato de ELISA para determinar la absorbancia a 595 nm. El control negativo fueron células no expuestas al NT-poliplex, sometidas a las mismas condiciones experimentales.

### **5.11. Sistema regulable**

Se utilizó el sistema pTet-On y pTRE-Tigh-DsRed2 (Clontech, Mountain View, CA, USA). Para tener el sistema completo se hizo la transfección simultánea de ambos plásmidos en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-AS.

El plásmido pTet-On bajo el promotor mínimo del CMV ( $P_{\min\text{CMV}\Delta}$ ), hDAT o 3xNBRE, produce rtTA y el plásmido pTRE-Tigh bajo la regulación de un promotor silente  $P_{\text{Tigh}}$  produce el gen reportero, la proteína DsRed2. Los transgenes no se expresaran en ningún tejido a menos que haya el complejo activador de transcripción compuesto por la proteína rtTA y la Dc, un derivado no tóxico de Tc. Por lo tanto, se realizó un estudio dosis-respuesta para determinar la concentración efectiva de la Dc.

Los estudios de expresión de los plásmidos del sistema regulable se realizaron en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-AS, que se sabe producen Nurr1 y a las que se les comprobó la presencia del receptor NTS1. Las células se cultivaron con DMEM suplementado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10% de SBF y penicilina-streptomina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada uno), se mantuvieron en cultivo a 37 °C bajo una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ .

Se utilizó lipofectamina (Lipofectamine 2000 Invitrogen life Technologies. U.S.A) para evaluar la funcionalidad de los plásmidos en las células SK-N-AS, sembradas 24 horas

antes de la lipofección a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células en pozos de 1 mm de diámetro. Los lipoplex fueron formados uniendo los plásmidos en un volumen de 50  $\mu$ L de DMEN y mezclándolos posteriormente con 50  $\mu$ L de lipofectamina, obteniendo la concentración final especificada en la Tabla 1. Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, las soluciones de los lipoplexes correspondientes a los componentes del sistema regulable fueron adicionados a las células, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de lipoplexes del sistema regulable pTetOn-pTRE-Tight-DsRed2

Grupo	Plásmido que codifica para rtTA		Plásmido que codifica para DsRed2	
	1	pTet-On	0.25 $\mu$ g	pTRE-Tight-DsRed2
2	hDAT-6250 pTet-On	0.4 $\mu$ g	pTRE-Tight-DsRed2	0.1 $\mu$ g
3	3xNBRE pTet-On	0.25 $\mu$ g	pTRE-Tight-DsRed2	0.1 $\mu$ g
4	Plásmido vacío-Tet	0.4 $\mu$ g	pTRE-Tight-DsRed2	0.1 $\mu$ g

Seis horas posteriores a la lipofección se adicionó Dc (1  $\mu$ g/mL) a las células. Veinte cuatro horas posteriores a la lipofección se retiró el medio y se adicionó 300  $\mu$ L de medio de cultivo fresco conteniendo 1  $\mu$ g/mL de Dc y las células se incubaron por un periodo adicional de 24 h (periodo de inducción de la expresión). Al finalizar este tiempo, las células se lavaron una vez con PBS para ser fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. En seguida, las células se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos cada lavado) para ser teñidas con 1  $\mu$ M de Hoesch durante 5 minutos. Después de 3 periodos de lavado (5 minutos cada uno) con PBS se agregó Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) a las laminillas, y se sellaron. La fluorescencia en las células se analizó con el objetivo 20 X del microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany), usando los siguientes filtros: TX2 para la DsRed2 y BGR para DsRed2, y Hoesch. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F camera (Leica Microsystems; Nussloch, Germany).

Como se describió en el numeral 5.6, se utilizaron los microensayos de retardo y retención para determinar las relaciones molares óptimas para la formación de los NT-poliplex con cada uno de los plásmidos del sistema regulable, manteniendo constante la concentración de pDNA (6 nM).

La formación de los diferentes NT-poliplex para los plásmidos del sistema regulables se realizó siguiendo los pasos detallados en el numeral 5.5.

Los ensayos de polifección se realizaron en la línea celular SK-N-AS a una confluencia de 50% en pozos de 1-mm de diámetro (48 h post-siembra a partir de un inóculo de 12500 células). En este punto se cotrasfectaron con los plásmidos del sistema regulable formados a diferentes relaciones molares. Después de 6 horas se adicionó 1 µg/mL de Dc. Después de 24 horas de transfección, el medio se diluyó 1:2 con medio fresco suplementado y las células se incubaron por un periodo adicional de 48 h (periodo de expresión). Al finalizar este tiempo, las células se lavaron una vez con PBS para ser fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. En seguida, las células se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos cada lavado) para ser teñidas con 1 µM de Hoesch durante 5 minutos. Después de 3 periodos de lavado (5 minutos cada uno) con PBS se agregó Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) a las laminillas y se sellaron. La fluorescencia en las células se analizó con el objetivo 20 X del microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany), usando los siguientes filtros: TX2 para la DsRed2 y BGR para DsRed2, y Hoesch. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F camera (Leica Microsystems; Nussloch, Germany).

## ***5.12. Formación del NT-poliplex auto-ensamblado***

El NT-poliplex auto-ensamblado utiliza los mismos componentes básicos que el poliplex original pero sintetizados en línea con la PLL. 1) Como ligando, la NT se unió a una cadena de 30 lisinas (ELYENKPRRPYIL); a este péptido se le llamó Lisina<sub>30</sub>-NT. 2) Como motivo fusogénico, el PF HA2 se unió a una cadena de 20 lisinas (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK), a este péptido se le llamó PF-Lisina<sub>20</sub>. 3) Como NLS se utilizó el PK de la proteína Vp1 del virus SV40 (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK) sin ninguna modificación. Todos los péptidos fueron sintetizados por la compañía Synpep Corp. (Dublín, CA, USA) a una pureza de 93.9% para la Lisina<sub>30</sub>-NT y 92.7% para el PF-Lisina<sub>20</sub>.

### ***5.12.1. Auto-ensamblaje del NT-poliplex***

El proceso de auto-ensamblaje del NT-poliplex se realizó mediante 4 pasos consecutivos de condensación: 1) unión electrostática entre el PK (5 µM) con el pDNA (6 nM), procedimiento descrito en el numeral 5.4; 2) precondensación del complejo DNA-PK mediante la adición de 1% SBF, concentración final descrito en el numeral 5.4.; 3) mayor grado de condensación del complejo DNA-PK-SBF, mediante la adición de la mezcla (1:1) de Lisina<sub>20</sub>-NT (50 nM) y PF-Lisina<sub>20</sub> (2700 nM), la cual se agitó

durante 30 minutos; 4) condensación a formas toroides de ese complejo por la suplementación con PLL(472.2 nM), a este complejo se le llamó NT-poliplex auto-ensamblado. Todos los componentes del complejo fueron preparados en medio DMEN libre de suero, a temperatura ambiente.

### **5.12.2. Internalización del NT-poliplex auto-ensamblado**

La internalización del NT-poliplex auto-ensamblado se analizó en la línea celular N1E-115, sembradas como se describió en el numeral 5.9. Cuarenta y ocho horas post-siembra, las células fueron incubadas con calceína AM (1 $\mu$ M) durante 45 minutos. En seguida se añadió el NT-poliplex auto-ensamblado, previamente teñido con yoduro de propidio (10  $\mu$ M) y formado en su relación molar óptima para el pGFP. Posterior a los 30 ó 45 minutos de incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, posteriormente fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y finalmente lavadas 3 veces con PBS. Las láminas son montadas con Vectashield.

La especificidad de la transferencia génica por el NT-poliplex auto-ensamblado se determinó por estudios de bloqueo; 1) bloqueo del dominio de unión del receptor de NT por un concentración saturante de NT (1  $\mu$ M) o por el SR-48692 (100 nM), antagonista no peptídico de los receptores de NT (Labbe-Jullie et al., 1998),(Yamada et al., 1995), el cual se adicionó 30 minutos previos a la adición del NT-poliplex auto-ensamblado. 2) bloqueo de la formación de las vesícula de clatrina por sacarosa 0.45 M. Las células fueron analizadas en un sistema de imagen confocal equipado con un láser de kriptón-argón (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). La fluorescencia fue detectada con el objetivo 60X en las condiciones Ex-Em de 488-522 nm (canal verde) y Ex-Em 568-585 nm (canal rojo). Se obtuvieron 10 a 20 secciones ópticas consecutivas de 1  $\mu$ m de intervalo en la serie z. Las imagines resultantes se proyectan en un plano bidimensional y se sobreponen sobre la pantalla del monitor designando el color verde para la fluorescencia de la calceína y el rojo para la del yoduro de propidio.

### **5.12.3. Expresión génica por el NT- poliplex auto-ensamblado**

Los estudios de expresión *in vitro* para el NT-poliplex auto-ensamblado, se realizaron en la línea celular de neuroblastoma murino N1E-115 como se describe en el numeral 5.9.

La eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado se determinó utilizando el plásmido pEGFP-N1. El procedimiento de transfección es idéntico al utilizado por el NT-poliplex original, procedimiento descrito en el numeral 5.9.

### **5.13. Animales**

Los estudios *in vivo* se realizaron en ratas macho de la cepa Wistar (210-230 g de peso). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales constantes, 23 °C, ciclo de luz- oscuridad de 12-12 h, con alimento y agua ad libitum. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio”, aprobado por el Comité para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL-CINVESTAV). Se realizó el mayor de los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y para reducir el número de animales usados.

### **5.14. Transferencia de genes a neuronas dopaminérgicas *in vivo***

Cada animal experimental se anestesió con una dosis de hidrato de cloral de (350 mg/kg, i.p.) y se colocó en un aparato estereotáxico (Modelo 51600, Stoelting; Wood Dale, ILL, USA) con la barra incisora a 3.3 mm, abajo de la línea interaural. Para proteger el motivo de unión del NT del poliplex de la degradación enzimática, se utilizó kelatorphan (50 mM), un inhibidor de endopeptidasas *in vivo* (Castel et al., 1990). Posterior a la trepanación craneal, se inyectaron en la SNc 2 µL de NT-poliplex (30 nM pDAT-EGFP y 600 nM del NT-vector). Para el estriado se inyectaron 4 µL del NT-poliplex (30 nM pDAT-BDNF-flag y 1350 nM del NT-vector). El flujo de la microinyección fue de 0.1 µL/min usando una bomba de microperfusión (Stoelting; Wood Dale, IL, USA). Las coordenadas esterotáxicas para la SNc fueron AP, - 4.9 desde bregma; ML, + 2.0 mm desde la línea media; DV, - 6.0 desde la superficie de la corteza. Para el estriado las coordenadas fueron AP, - 0.3 mm desde bregma; ML, + 4 mm desde la línea media; DV, - 5.5 mm desde la dura madre.

Se realizaron 3 experimentos controles para explorar la especificidad de la NT como molécula acarreadora para la transferencia de genes: 1) bloqueo del dominio de unión del receptor de NT con 1 µM de SR-48692, antagonista no peptídico específico del receptor de NT (Gully et al., 1993), 2) Transferencia de genes mediante el poliplex “untargeted”, 3) inyección del complejo pDNA-PK. El bloqueo con el SR-48692 se realizó inyectándolo tanto antes como de forma concomitante con la solución del NT-poliplex. El poliplex “untargeted” y el complejo pDNA-PK fueron formados en la

relación molar óptima e inyectados en las mismas condiciones que el NT-poliplex. El número de animales ensayados para cada condición fue de dos. A todos los animales post-cirugía se les inyectó penicilina benzathine (300,000 UI/kg, im) para prevenir algún tipo de infección.

### **5.15. Inmunofluorescencia indirecta**

La expresión *in vivo* del transgén se evaluó a diferentes tiempos después de la inyección; a los 21 días en el estriado y 90 días después en la SNc. Al finalizar el tiempo de estudio a los animales experimentales se les anestesió profundamente, para ser perfundidos transcárdialmente con 50 mL de PBS y posteriormente con 50 mL de paraformaldehído al 4% en PBS. Se obtuvieron los cerebros y se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 h a 4 °C para su fijación. Finalizado este tiempo se colocaron en soluciones crecientes de sacarosa en PBS (10%, 20% y 30%) a una temperatura de 4 °C. Al término de este tratamiento, los cerebros fueron cortados a 45 µm en el plano coronal o en el sagital utilizando un criostato Leica SM100 (Leica Microsystems; Nussloch, Germany). Se realizó una inmunofluorescencia doble a los cortes estriatales y mesencefálicos para demostrar la expresión del BDNF-flag y la GFP en la neuronas TH inmunoreactivas. Los cortes se permeabilizaron con una solución de tritón al 0.1% en PBS haciendo 3 incubaciones de 10 minutos cada una. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con una solución de tritón al 0.1% en PBS conteniendo suero de caballo al 10%, durante 60 minutos. Finalizado este tiempo se lavó tres veces con PBS-0.1% tritón; cada lavado de 5 minutos. Posteriormente los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: 1) anti-tirosina hidroxila monoclonal hecho en ratón (1/6000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 2) anti-flag policlonal hecho en conejo (1/400, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), o 3) anti-GFP policlonal hecho en conejo (1/60; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA ). Después de la incubación con el anticuerpo primario los cortes fueron lavados 3 veces x 10 minutos con PBS-0.1% tritón para continuar con la incubación de 2 horas, a temperatura ambiente, con los siguientes anticuerpos secundarios 1) IgG (H+L) anti-ratón rodaminada (Rho) hecho en burro (1/60; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA), 2) IgG fluoresceinada (FITC) anti-conejo hecho en cabra (1/60; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente los cortes fueron lavados con PBS 3 veces de 5 minutos cada lavado y montados en un portaobjetos. Después de agregar Vectashield los cortes fueron



cubiertos con cubreobjetos de vidrio. Las células se analizaron en un microscopio confocal equipado con láser de krypton-argon (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK). La fluorescencia se detectó a las siguientes longitudes de onda Ex-Em 488-522 nm para el canal verde y 568-585 nm para el canal rojo. Se realizaron de 10 a 20 secciones ópticas (1  $\mu\text{m}$ ) consecutivas en la serie z. La proyección total de los cortes se realizó en el plano bidimensional usando el tono verde para el FITC y tono rojo para Rho. Como control negativo se utilizaron secciones de cerebro procesadas bajo las mismas condiciones experimentales para la inmunofluorescencia indirecta, pero en ausencia del anticuerpo primario.

### ***5.16. Análisis estadístico***

Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. La diferencia entre las medias fue establecida por la prueba de ANOVA unifactorial. Cuando la prueba de ANOVA mostró una diferencia estadísticamente significativa, la comparación entre medias se analizó mediante una prueba de Dunnett's. La significancia fue considerada a  $P < 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1. Determinación de la proporción de los componentes del NT-poliplex

#### 6.1.1. Proporción de los componentes del NT-vector

Se utilizó [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP, [<sup>3</sup>H]-PF y una cantidad conocida de PLL para determinar el número de moléculas de los componentes del NT-vector y su contribución a su MM media, datos mostrados en la tabla 2.

La Figura 5 muestra los pasos cromatográficos de la purificación de los componentes del NT-vector, conjugados con el entrecruzador bifuncional SPDP. El cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP en biogel P2 muestra dos picos de absorbancia a 280 nm (Figura 5A). De acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 6000 Da), el primer pico (volumen 3-7 mL) corresponde al conjugado de PLL-SPDP (52,043 Da), y el segundo pico (volumen 7-15 mL) corresponde a la elusión de los componentes de baja MM tales como el SPDP libre y la N-hidroxisuccinimida, producto de la conjugación.

Tabla 2. Proporción y contribución de los componentes del NT-vector en su masa molecular (MM)

Componentes	MM	Concentración		Propor- ción	Contribución del NT-vector en su MM	
	Daltons	mg/mL	nmol/ mL		MM	%
[ <sup>125</sup> I]NT	1797	0.1540	85.7	1	1797	1.5
[ <sup>3</sup> H]FP	2695	0.9230	342.5	4	10780	9.1
PLL	48000	6.2500	130.2	2	96000	81.3
Cuatro residuos de SPDP	201	0.8153	4056.2	47	9525	8.1
Masa molecular					118102	100

La Figura 5 muestra los pasos cromatográficos de la purificación de los componentes del NT-vector, conjugados con el entrecruzador bifuncional SPDP. El cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP en biogel P2 muestra dos picos de absorbancia a 280 nm (Figura 5A). De acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 6000 Da), el primer pico (volumen 3-7 mL) corresponde al conjugado de PLL-SPDP (52,043 Da), y el segundo pico (volumen 7-15 mL) corresponde a la elusión de los componentes de baja MM tales como el SPDP libre y la N-hidroxisuccinimida, producto de la conjugación.

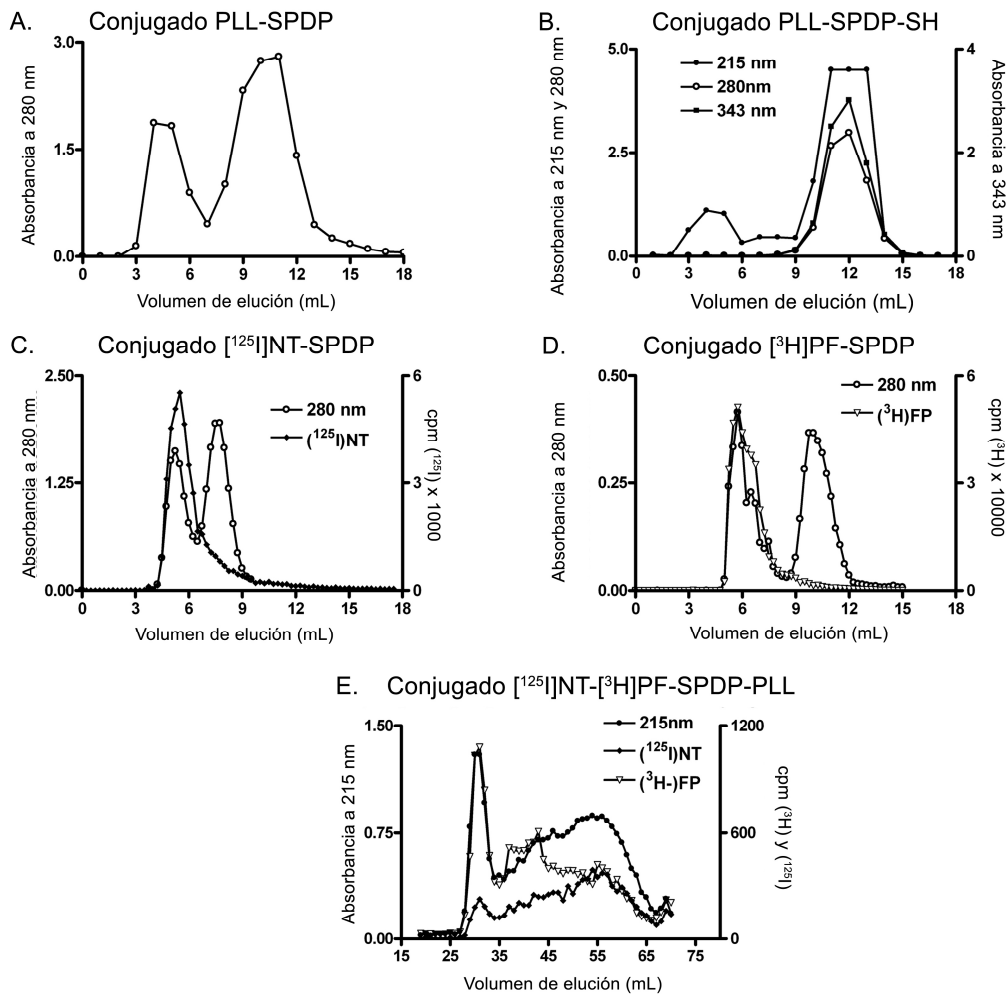
Posteriormente el conjugado PLL-SPDP es reducido con DTT a un conjugado altamente reactivo PLL-SPDP-SH, el cual fue purificado como el conjugado original. El cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP-SH en biogel P2 muestra dos picos de absorbancia a 215 nm (Figura 5B). El primer pico (volumen de 2-6 mL) corresponde a la elusión del conjugado PLL-SPDP-SH (50,631 Da) y el segundo pico (volumen de 9-14 mL) que se superpone con las absorbancias a 280 y 343 nm, corresponden a la piridina-2-tiona liberada durante la reacción. En esta síntesis la eficiencia de conjugación fue del 32% determinada por la medición de la concentración de la piridina-2-tiona.

El cromatograma de purificación del conjugado [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP en Sephadex G10, muestra dos picos de absorbancia a 280 nm y un solo pico de radioactividad de [<sup>125</sup>I], el cual se superpone con el primer pico a 280 nm (Figura 5C). De acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 700 Da), el primer pico (volumen 5-7 mL) corresponde al conjugado de [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP (2,419 Da), como lo demuestra la presencia de [<sup>125</sup>I].

El cromatograma de purificación del conjugado [<sup>3</sup>H]-PF-SPDP en Sephadex G15, muestra dos picos de absorbancia a 280 nm y un solo pico de radioactividad de [<sup>3</sup>H], el cual se superpone con el primer pico a 280 nm (Figura 5D). De acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 1,500 Da), el primer pico (volumen 5-7 mL) corresponde al conjugado de [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP (3317 Da), como lo demuestra la presencia de [<sup>3</sup>H].

La eficiencia de unión del [<sup>125</sup>I]-NT-SPDP, [<sup>3</sup>H]-PF-SPDP con la PLL-SPDP-SH fue del 26% calculada a través de la concentración de la piridina-2-tiona liberada en la reacción. El monitoreo de la purificación del conjugado [<sup>125</sup>I]-NT-<sup>3</sup>H]-PF-SPDP-PLL en Biogel A-1.5 m se realizó por espectrofotometría a 215, 280 y 343 nm, así como por centellometría del [<sup>125</sup>I] y [<sup>3</sup>H]. El cromatograma a 215 nM muestra dos picos que contienen además la radioactividad [<sup>125</sup>I] y [<sup>3</sup>H] (Figura 5E). En base a la calibración de

la columna, los conjugados con MM >1500 kDa eluyen en el primer pico (volumen 28-35 mL), los conjugados cuya MM están entre 11000 kDa (volumen 36 mL) y los conjugados de 67 kDa eluyen en el segundo pico (volumen 62 mL). En nuestras condiciones los conjugados con MM > 300 kDa (volumen < 46 mL) no son funcionales como vectores para la transferencia génica (Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000), (Martinez-Fong et al., 1999). Mientras que los conjugados útiles y más eficientes eluyen en el rango de volúmenes elusión de 51 mL (198.5 kDa) a 62 mL (42.5 kDa), los cuales tienen una MM media de 102.5 kDa según la extrapolación en la curva de calibración.



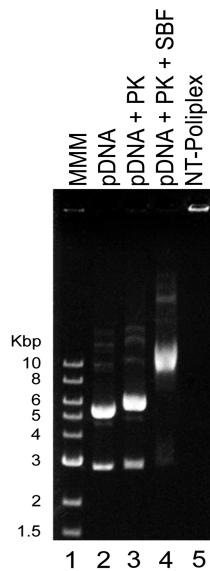
**Figura 5.** Conjugación de  $[^{125}\text{I}]\text{-NT}$  y  $[^3\text{H}]\text{-PF}$  con la PLL usando el entrecruzador bifuncional LC-SPDP. La reacción involucra cuatro pasos secuenciales.

- A) Conjugación de la PLL con el LC-SPDP.
- B) Reducción del conjugado PLL-SPDP con DTT para producir PLL-SPDP-SH.
- C) Conjugación de la  $[^{125}\text{I}]\text{-NT}$  con el LC-SPDP.
- D) Conjugación del  $[^3\text{H}]\text{-PF}$  con LC-SPDP.
- E) Unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-NT-SPDP}$  y  $[^3\text{H}]\text{-PF-SPDP}$  con PLL-SPDP-SH para la síntesis del vector-NT.

### 6.1.2. Análisis electroforético del NT-poliplex

Los diferentes grados en la condensación del pDNA (pEGFP-N1) causada por la interacción secuencial de los componentes del NT-poliplex se refleja en el patrón electroforético de la migración del plásmido (Figura 6). Se utilizó el marcador de MM (1 Kpb) no para medir el tamaño del DNA sino como referencia para medir el grado de

retardo que va presentando el pDNA al interactuar con cada uno de los componentes en la formación del NT-poliplex. El patrón electroforético del plásmido pEGFP-N1 (6 nM) sirvió de comparación de los cambios en la movilidad de los complejos resultantes en la formación secuencial del NT-poliplex (Figura 6 línea 2). La interacción electrostática de PK (5  $\mu$ M) con el pDNA (6 nM) retardó las bandas que corresponden a 3 y 6 kbp del marcador del DNA (Figura 6 línea 1), lo que sugiere la formación del complejo pDNA-PK (Figura 6 línea 3). La adición de 1% de SBF retardó la migración del complejo pDNA-PK (Figura 6 línea 4) al nivel entre 8 y 10 kbp del marcador de MM del pDNA. Finalmente, la interacción electrostática del NT-vector (204 nM) con el complejo pDNA-PK-SBF para formar el NT-poliplex, produjo un retardo en la migración electroforética (Figura 6 línea 5).

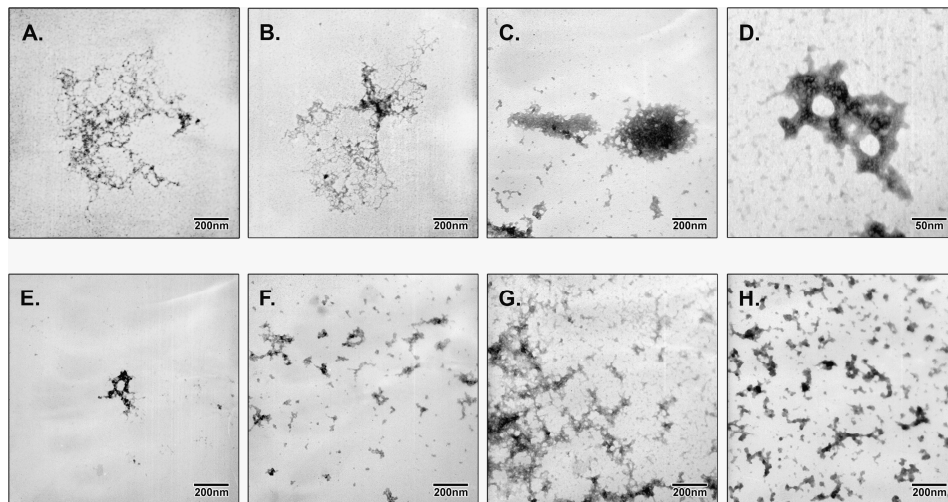


**Figura 6.** Electroforesis de la interacción de los componentes del NT-poliplex. La fotografía de migración electroforética del pEGFP-N1 (6nM), marcado con bromuro de etidio, muestra diferentes niveles de retardo cuando el pEGFP-N1 es condensado por la adición secuencial de PK (5 nM), 1% FBS y el vector-NT (204 nM). Marcador de masa molecular (MMM) = 1kb. pDNA = plásmido DNA. 0.8% de agarosa.

### ***6.1.3. Análisis de microscopía electrónica en la formación del NT-poliplex***

La modificación física del pDNA debida a la interacción secuencial de los componentes en la formación del NT-poliplex fue determinada por microscopía electrónica de

transferencia. La forma del pDNA (6 nM) es una red irregular o laxa (Figura 7A). Un pequeño núcleo de condensación en el pDNA se observó después de su unión electrostática con el PK (6  $\mu$ M) (Figura 7B). El complejo pDNA-PK se condensó en unas estructuras ovoides o esféricas después de la adición de 1% de SBF (Figura 7C). La unión electrostática del NT-vector, a una concentración de 204 nM, con el complejo del pDNA-PK-SBF causó su condensación en estructuras toroides, cuyo diámetro osciló entre 100 – 200 nm (Figura 7D). Adicionalmente, el número estructuras toroides aumentó de manera proporcional a la concentración del NT-vector (Figura 7E-H)

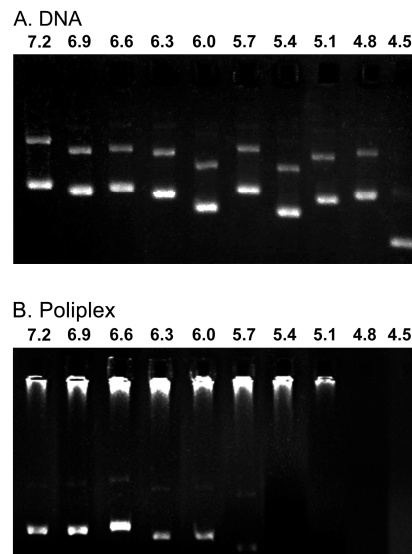


**Figura 7.** Microscopía electrónica de los pasos secuenciales de la formación del NT-poliplex con el pEGFP-N1. A) La microfotografía muestra la forma natural del pDNA solo (6 nM). B) Condensación inicial de pDNA causada por la adición de 6  $\mu$ M de PK. C) Condensación del complejo pDNA-PK en la presencia de 1% SBF. D) Condensación del complejo pDNA-PK-SBF en nanopartículas toroidales por la adición del vector-NT en la relación molar óptima (1:34), formándose así el NT-poliplex. Las microfotografías de los paneles E-H muestran el incremento en la cantidad de estructuras toroides por el NT-poliplex en función de la relación molar entre el pDNA y el vector-NT. Las relaciones molares fueron E) 1:15, F) 1:24, G) 1:34 y H) 1:42.

#### **6.1.4. Efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex**

Mediante nuestros estudios electroforéticos hemos determinado que el NT-poliplex electro-neutro no migra hacia ninguno de los dos electrodos (cátodo - ánodo), por lo tanto no es visualizado en el gel de agarosa. Por lo tanto, el efecto del pH sobre la estabilidad del NT-poliplex fue ensayado en NT-poliplexes formados a la relación molar 1:26, relación menor que la relación molar óptima (1:34), y así poder identificar

cambios en el patrón electroforético. A relaciones menores de la óptima, el patrón electroforético muestra una banda en el pozo del gel que corresponde al NT-poliplex (Figura 6 línea 5) y una banda inferior que corresponde al DNA libre (Figura 8B), como lo corrobora la Figura 8A. La desaparición de ambas bandas fue observada a pH 4.8, lo que sugiere que este pH es un punto crítico en la estabilidad del NT-poliplex. La Figura 8A muestra que el patrón electroforético del pDNA control, solamente se afectó a pH 4.5 debido a la hidrólisis ácida.



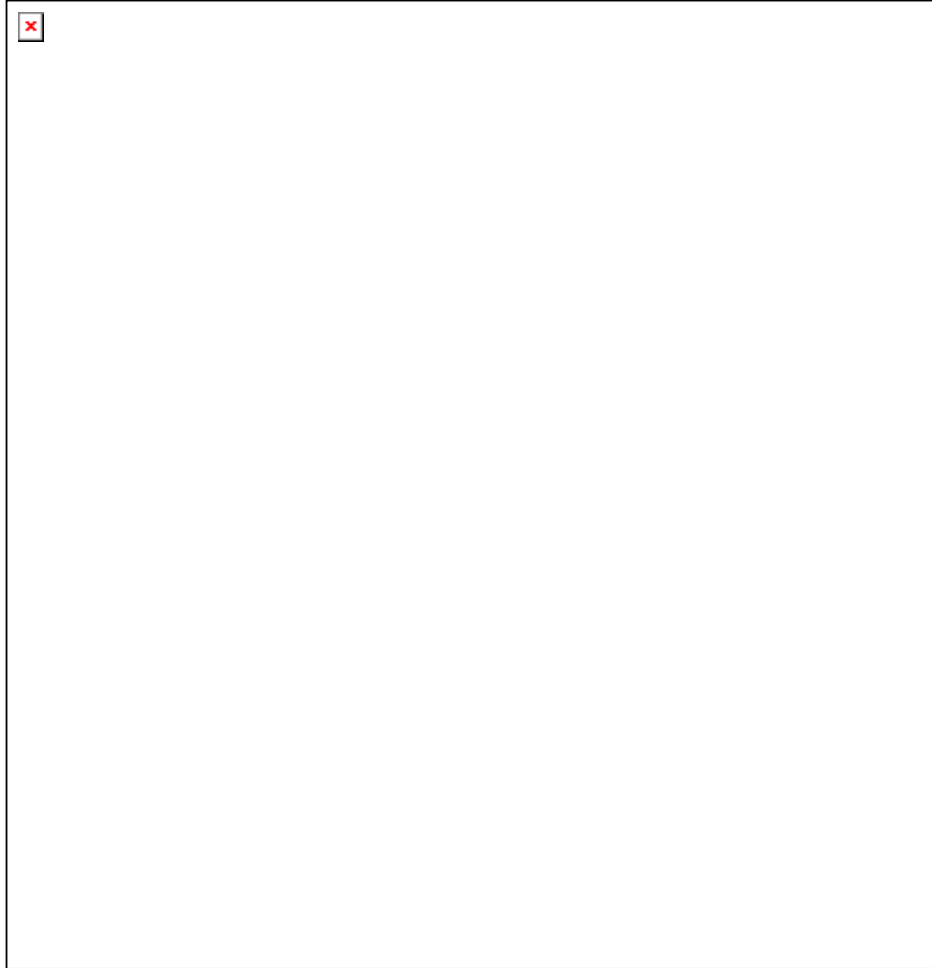
**Figura 8.** Efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex. Alícuotas del pDNA (6 nM) y NT-poliplexes formados a la relación molar 1:26 a un pH de 7.4, fueron sujetos a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, en una cámara de corrimiento electroforético especial, la cual permite realizar la electroforesis en carriles aislados que contienen el buffer de corrimiento electroforético TAE con diferentes pHs, bajo un mismo campo eléctrico (80 V). A) Muestra el análisis electroforético del pDNA solo sometido a los diferentes pHs. B) muestra el corrimiento de los NT-poliplex, sometidos a los diferentes pHs. Los números indicados en la parte superior del gel corresponden al pH de los buffers de corrimiento electroforético.

### **6.1.5. Determinación de la relación molar óptima del NT-poliplex**

Los ensayos de transfección con el plásmido pEGFP-N1 (Figura 9A) y pECFP-Nuc (Figura 9C) en la línea celular N1E-115 mostraron que la máxima eficiencia de transfección se presenta a una relación molar de los componentes del poliplex (pDNA-PK:NT-vector). A esta relación le hemos nombrado relación molar óptima (Arango-

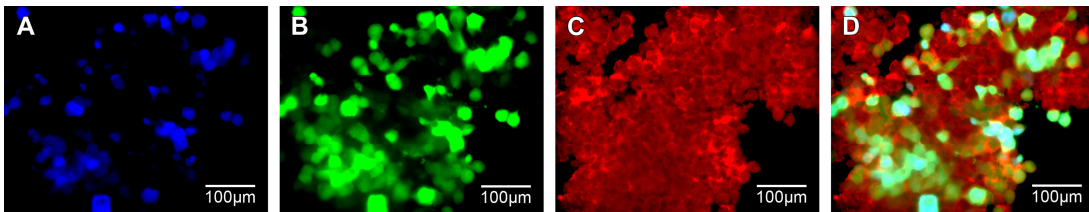


Rodriguez et al., 2006). La eficiencia de transfección fue del 42% para el pEGFP-N1 a la relación molar óptima 1:34 (Figura 9B), mientras que para el plásmido pECFP-Nuc fue del 24% en la relación molar óptima 1:27 (Figura 9D). Se observó una baja eficiencia de transfección en las relaciones molares más bajas o más altas que la relación molar óptima (Figura 9B y D).



**Figura 9.** La relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex que producen la máxima eficiencia de transfección. A) Microfotografías de la expresión de GFP en células N1E-115 incubadas con el NT-poliplex que contiene el pEGFP-N1 en las siguientes relaciones molares 1:20 (c y d), 1:34 (e y f) y 1:42 (g y h), control negativo (a y b). B) La gráfica muestra la relación entre la eficiencia de expresión de la GFP con las diferentes relaciones molares del NT-poliplex. C) Microfotografías de la expresión de la CFP en las células N1E-115 incubadas con el NT-poliplex que contiene el pECFP-Nuc en las siguientes relaciones molares: 1:21 (c y d), 1:27 (e y f) y 1:42 (g y h), control negativo (a y b). B) La gráfica muestra la relación entre la eficiencia de expresión de la CFP con las diferentes relaciones molares del NT-poliplex. La fluorescencia fue observada con un microscopio Leica DMIRE2 usando un objetivo 20 X y el filtro K3 para el GFP, el A para el CFP y TX2 para el yoduro de propidio.

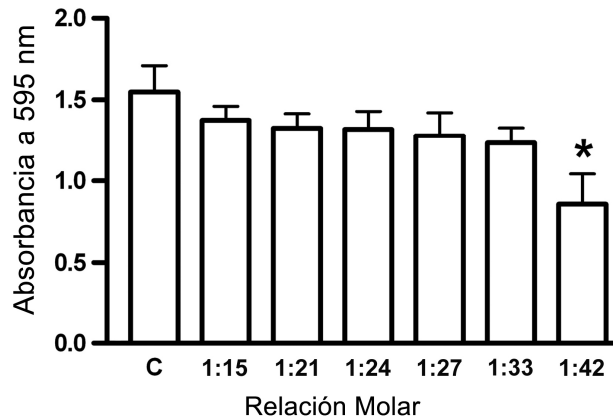
En la relación molar óptima tanto del pEGFP-N1 como del pECFP-Nun, el NT-poliplex fue capaz de cotransfectar ambos plásmidos (1:1, v/v) en la línea celular N1E-115 (Figura 10D). La proporción de colocalización de CFP (Figura 10A) y GFP (Figura 10B) fue alrededor de un 50%.



**Figura 10.** Capacidad del NT-poliplex para transfectar dos diferentes plásmidos simultáneamente. Los plásmidos pECFP-Nuc y pEGFP-N1 fueron transferidos a las células N1E-115 por el NT-poliplex en la relación molar óptima. A) Expresión de la proteína cian fluorescente. B) Expresión de la proteína verde fluorescente. C) Contra-tinción de las células N1E-115 con yoduro de propidio. D) Sobre-posición de las imágenes A-C. La fluorescencia fue observada con un microscopio Leica DMIRE2 usando un objetivo 20X y el filtro K3 para el GFP, el A para el CFP, TX2 para el yoduro de propidio y BGR para CFP, GFP y yoduro de propidio.

#### **6.1.6. Efecto del NT-poliplex en la viabilidad celular**

Utilizando el ensayo colorimétrico MTT (Mosmann, 1983) se evaluó en la línea celular N1E-115 la posible citotoxicidad del poliplex de NT formado a diferentes relaciones molares con el plásmido pEGFP-N1. Disminución significativa ( $P < 0.005$ ) en la absorbancia del formazan (595 nm) solamente se produjo a relaciones mayores de 1:42 (Figura 11). Este resultado sugiere que a relaciones mayores de 1:42 el NT-poliplex induce citotoxicidad.



**Figura 11.** Efecto de diferentes relaciones molares del NT-poliplex sobre la viabilidad celular. La viabilidad celular fue observada midiendo la absorbancia del formazan que resulta del metabolismo enzimático del MTT por la deshidrogenada mitocondrial. Las células control no fueron expuestas al NT poliplex y el blanco fue el MTT (0.5 mg/mL en PBS). La media  $\pm$  S.E.M fue obtenida a partir de cuatro experimentos independientes. \* Diferencia estadísticamente significativa desde el grupo control respectivo ( $P < 0.005$ , prueba de Dunnett's). C = control

## 6.2. Regulación de la expresión del transgén

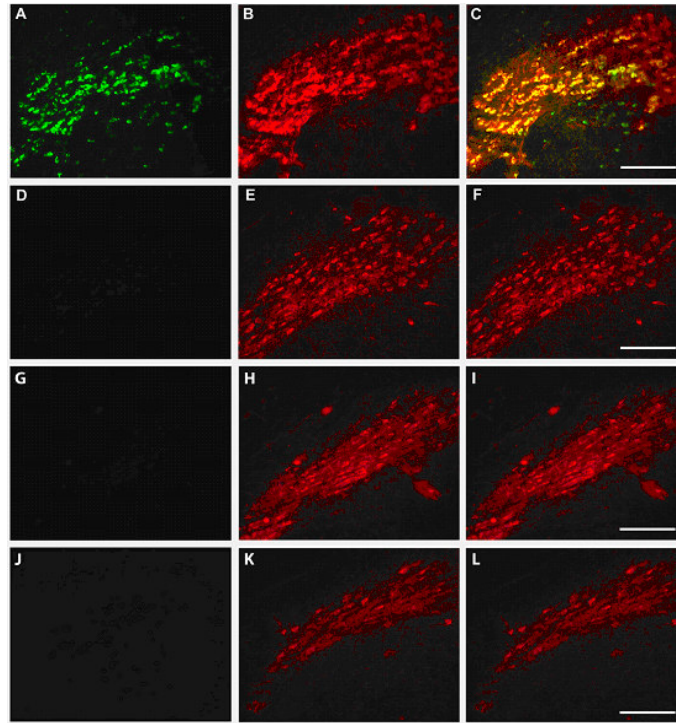
### 6.2.1. Regulación por elementos transcripcionales endógenos

El promotor hDAT es hasta el momento el más específico para regular la expresión de transgenes en neuronas dopaminérgicas (Bannon et al., 2001), (Sacchetti et al., 1999), (Sacchetti et al., 2001). Debido a su alta especificidad, el promotor hDAT fue utilizado para regular la expresión del transgén neurotrófico BDNF-flag (pDAT-BDNF-flag). Esta construcción fue transferida por el NT-poliplex a neuronas dopaminérgicas de la SNc en ratas adultas utilizando la vía retrógrada (Figura 12A-C) como la somática (Figura 13A-C) de la NT (Arango-Rodriguez et al., 2006).

La inyección del NT-poliplex en el estriado ocasionó la expresión del transgén BDNF-flag (Figura 12A) en las neuronas dopaminérgicas (Figura 12B) de la SNc ipsilateral como lo demuestra la sobreposición de las dos imágenes (Figura 12C). El bloqueo del dominio de unión del NTS1 mediante el antagonista no peptídico SR-48692 (1  $\mu$ M) previno la expresión del transgén causada por el NT-poliplex (Figura 12D-F).

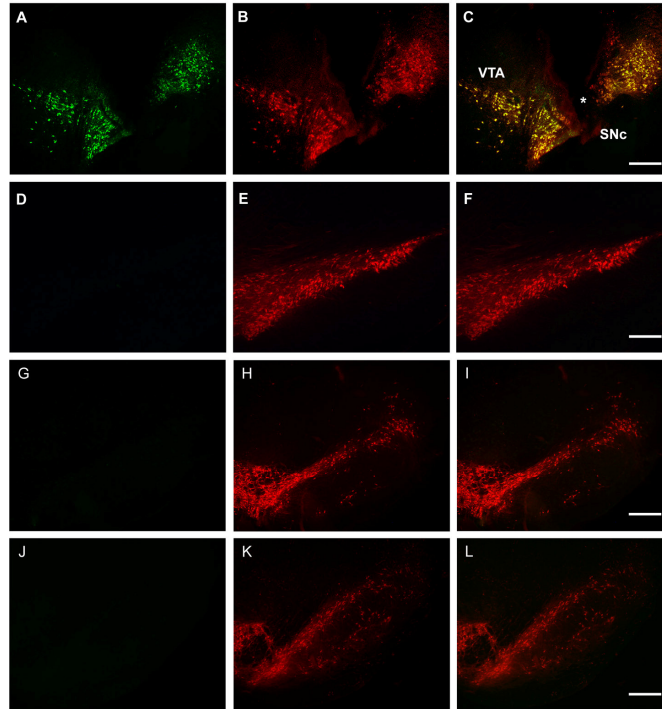
Igualmente se observó ausencia de expresión del transgén cuando pDAT-BDNF-flag fue transferido por el poliplex sin ligando (Fig., 12G-I) o cuando se inyectó solo el complejo pDNA-KP (Fig., 12J-L). Estos resultados demostraron que los péptidos

virales no participan en la entrada del poliplex de NT a la célula blanco. La ausencia de expresión del transgén en el estriado (Fig. 14A-C) demostró la efectividad del promotor tejido específico hDAT, lo que apoya la utilización de elementos regulatorios transcripcionales endógenos para incrementar la especificidad de transfección del NT-poliplex.

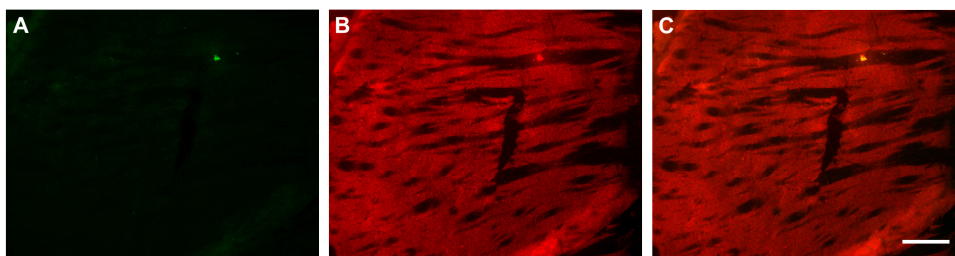


**Figura 12.** Envío dirigido del transgén pDAT-BDNF-flag a las neuronas dopaminérgicas de la SNc por la ruta del transporte retrógrado de la NT. La expresión del transgén fue determinada en la SNc después de la inyección ipsilateral del NT-poliplex con el pDAT-BDNF-flag en el estriado. A) Muestra la expresión del transgén BDNF-flag en las neuronas dopaminérgicas TH positivas de la SNc ipsilateral (B) después de la inyección del NT-poliplex en el estriado, como lo demuestra la sobre-posición de las dos imágenes (C). Los paneles D-F muestran que el bloqueo del dominio de unión del NTS1 mediante el antagonista no peptídico SR-48692 (1  $\mu$ M) previene la expresión del transgén causada por el NT-poliplex. Igualmente se observó ausencia de expresión del transgén cuando pDAT-BDNF-flag fue transferido por el poliplex sin ligando (G-I) o cuando se inyectó solo el complejo pDNA-PK (J-L). Los paneles A, D, G y J muestran la inmunoreactividad contra el BDNF-flag. Los paneles B, E, H y K muestran la inmunoreactividad contra TH. Las microfotografías C, F, I y L son la sobre-posición de las imágenes. La inmunoreactividad para FITC del BDNF-flag fue detectada a 488-522 nm, ExEm, y Rho de TH a 568-585 nm, ExEm. Las ilustraciones son representativas de dos experimentos independientes. Barras de calibración = 100  $\mu$ M..

La inyección del NT-poliplex en la SNc ocasionó la expresión del gen reportero GFP (Figura 13A) en las neuronas dopaminérgicas (Figura 13B) de la SNc ipsilateral como lo demuestra la sobreposición de las dos imágenes (Figura 13C). El bloqueo del dominio de unión del NTS1 mediante el antagonista no peptídico SR-48692 (1  $\mu$ M) previno la expresión de EGFP causada por el NT-poliplex (Figura 13D-F). Igualmente se observó ausencia de expresión del transgén cuando pDAT-BDNF-flag fue transferido por el poliplex sin ligando (Fig., 13G-I) o cuando se inyectó solo el complejo pDNA-KP (Fig., 13J-L).



**Figura 13.** La inyección del NT-poliplex en la SNc ocasionó la expresión del gen reportero EGFP. A) Muestra la expresión del transgén EGFP en las neuronas dopaminérgicas TH positivas (B) después de la inyección del NT-poliplex en la SNc, como lo confirma la sobreposición de las dos imágenes (C). El bloqueo del dominio de unión del NTS1 mediante el antagonista no peptídico SR-48692 (1  $\mu$ M) previno la expresión de EGFP causada por el NT-poliplex (D-F). Igualmente se observó ausencia de expresión del transgén cuando EGFP fue transferido por el poliplex sin ligando (G-I) o cuando se inyectó solo el complejo pDNA-KP (J-L). Los paneles A, D, G y J muestran la inmunoreactividad contra el EGFP. Paneles B, E, H y K muestran la inmunoreactividad contra TH. Las microfotografías C, F, I y L son la sobreposición de las imágenes. La inmunoreactividad para FITC de la GFP fue detectada a 488-522 nm, ExEm, y Rho para TH a 568-585 nm, ExEm. Las ilustraciones son representativas de dos experimentos independientes. Barras de calibración = 100  $\mu$ M. VTA= área ventral tegmental. SNc = sustancia negra compacta. El asterisco muestra el daño de la SNc por la inyección.

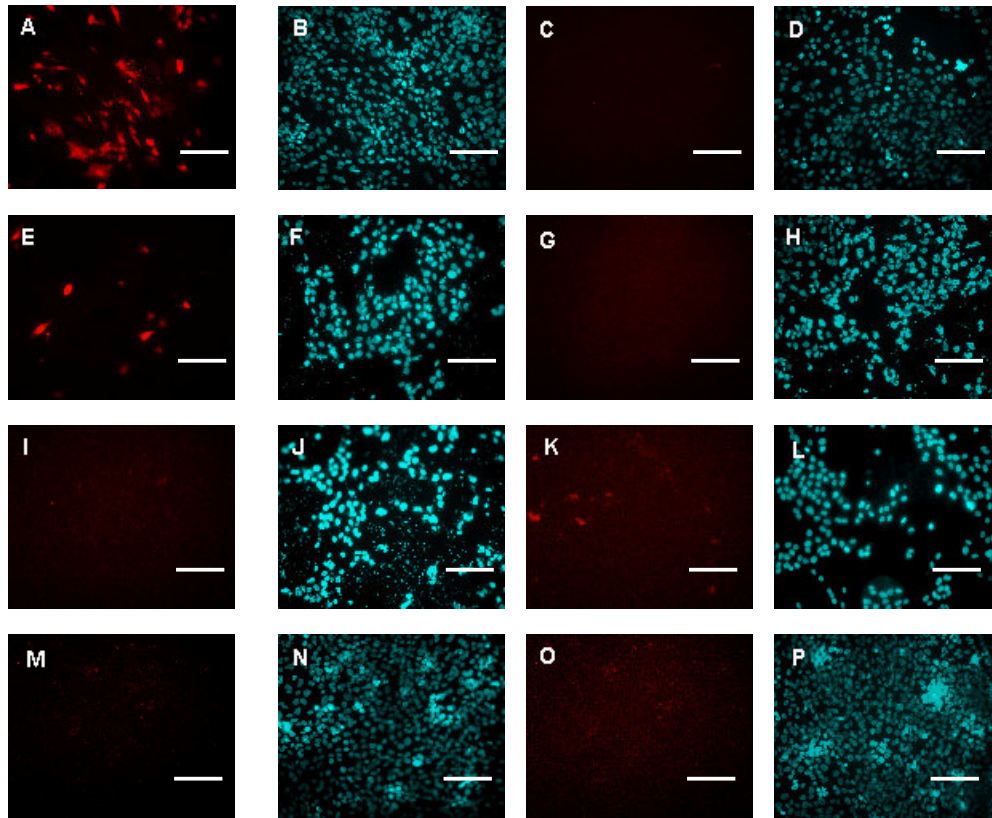


**Figura 14.** Efectividad del promotor tejido específico hDAT. El panel A muestra la ausencia de expresión del transgén BDNF-flag en el estriado. El panel B muestra la inmunoreactividad contra TH. El panel C es la sobre-posición de las imágenes anteriores. La inmunoreactividad para FITC del BDNF-flag fue detectada a 488-522 nm, ExEm, y Rho para TH a 568-585 nm, ExEm. Las ilustraciones son representativas de dos experimentos independientes. Barras de calibración = 100  $\mu$ M.

### **6.2.2. Regulación por construcciones transcripcionales quiméricas**

La expresión desregulada de factores neurotróficos produce efectos deletéreos en el sistema dopaminérgico *in vitro* e *in vivo*. Además de la regulación por el promotor hDAT, consideramos aplicar un elemento de control que permita encender y apagar la transcripción del transgén. Con este propósito utilizamos el sistema pTet-On y pTRE-Tight-DsRed2 en células de neuroblastoma humano SK-N-AS que se sabe produce Nurr1 (Michelhaugh et al., 2005) y a las cuales les comprobamos que expresan el NTS1. Se evaluó la funcionalidad del sistema regulable formado por pTRE-Tight-DsRed2 y pTet-On original (con el promotor CMV) y por el promotor hDAT (hDAT-6250 pTet-On) o por 3 elementos de respuesta a Nurr1, en tandem (3xNBRE pTet-On). En ausencia de Dc, las células SK-N-AS lipofectadas con los diferentes pares de plásmidos (Tabla 2) no mostraron expresión de la DsRed2 (Figura 15). En contraste, la administración de Dc (1  $\mu$ g/mL) fue capaz de inducir la expresión de la DsRed2, en magnitud diferente dependiendo del promotor del pTet-On (Figura 15 A,E,I,M). Cualitativamente se observó que el par de plásmidos que mostró la mayor eficiencia de expresión fue pTet-On (0.25  $\mu$ g) con pTRE-Tight-DsRed2 (0.1  $\mu$ g) (Figura 14A). Aunque la eficiencia de expresión fue baja, solamente el par de plásmidos con pTet-On modificado con promotores tejido específico que produjo expresión inducida por Dc fue el 3xNBRE pTet-On (0.25  $\mu$ g) con pTRE-Tight-DsRed2 (0.1  $\mu$ g) (Figura 15E). El grupo control negativo de la expresión formado por los plásmidos Empty-Tet 0.4  $\mu$ g con pTRE-Tight-DsRed2 0.1  $\mu$ g no se produjo expresión de la DSRED2 inducida por Dc (Figura 15M).





**Figura 15:** Inducción de la expresión de la proteína DsRed2 por la administración de Dc (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la línea celular SK-N-AS. Se utilizó lipofectamina para transfectar el plásmido pTRE-Tight-DsRed2 que codifica para la proteína DsRed2 en combinación con pTet-On (A-D), 3xNBRE-pTet-On (E-H), hDAT-6250-pTet-On (I-L), o pEmpty-Tet (M-P). Las microfotografías en ausencia de Dc corresponden a los paneles C-D, G-H, K-L, y O-P. Las microfotografías que muestran la inducción de la expresión por Dox son los paneles A-B, E-F, I-J, M-NP. Las fotografías B, D, F, H, J, L, N, y P muestran los núcleos celulares teñidos con Hoesch. Las fotografías A, C, E, G, I, K, M, y O muestran las células que expresan la proteína DsRed2. Barras de calibración = 50  $\mu\text{M}$ .

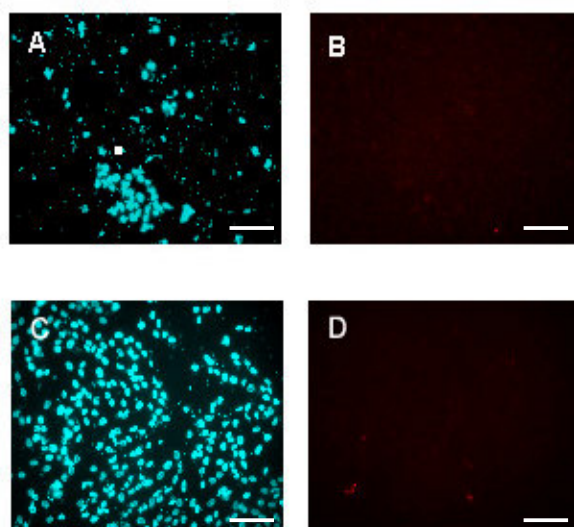
Los geles de retardo y de retención determinaron la relación óptima tanto del PK como del NT-vector respectivamente, para cada uno de los plásmidos del sistema regulable (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos de poliplexes del sistema regulable pTetOn-pTRE-Tight-DsRed2 utilizando 6 nM de pDNA.

Grupo	Plásmido codifica para rTA	PK $\mu$ M	Vector nM	Plásmido que codifica para DsRed2	PK $\mu$ M	Vector nM
1	pDATpTet-On	9	252	pTRE-Tight-DsRed2	7	126
2	3xNBRE pTet-On	7	198	pTRE-Tight-DsRed2	7	126
3	Plásmido vacío-Tet	7	216	pTRE-Tight-DsRed2	7	126

rTta = activador transverso de la tetraciclina; DsRed2 = proteína roja fluorescente; hDAT = transportador de dopamina humano; 3xNBRE = 3 elementos de respuesta a Nurr1, en tandem.

A las relaciones molares óptimas, los experimentos de transfección con el poliplex y los diferentes grupos del sistema regulable no mostraron expresión de la DsRed2 inducida por Dc en ninguno de los grupos. Por el contrario, se observó que la transfección causó una alta citotoxicidad (Figura 16).



**Figura 16.** Imagen representativa de uno de los experimentos de transfección con el poliplex y los diferentes grupos del sistema regulable que muestra severa citotoxicidad. Inducción de la expresión de la proteína DsRed2 por la administración de Dc (1  $\mu$ g/mL) en la línea celular SK-N-AS. Se utilizó el NT-poliplex para transfectar el plásmido pTRE-Tight-DsRed2 que codifica para la proteína DsRed2 en combinación con pTet-On (A-B). Las microfotografías (C-D) son el control, corresponden a células sin transfectar. Las microfotografías que muestran la inducción de la expresión por Dox y en las que se observa severa citotoxicidad son el panel A-B. Las fotografías A y C muestran los núcleos celulares teñidos con Hoesch. Las fotografías B y D, muestran la ausencia de expresión de la proteína DsRed2. Barras de calibración = 50  $\mu$ m



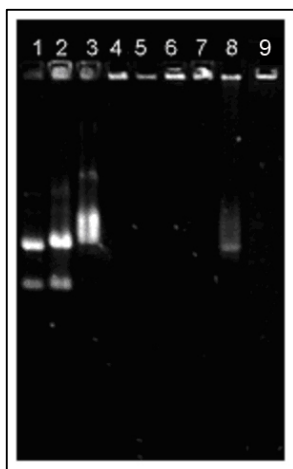
### **6.3. Auto-ensamblaje del NT- poliplex**

#### **6.3.1. Relación molar óptima de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado**

La caracterización fisicoquímica del NT-poliplex de original demostró la cantidad de moléculas de PLL para condensar el pDNA en estructuras toroides y de moléculas de NT y PF para producir la transferencia génica (Tabla 1). Por lo tanto, el primer experimento se planteó considerando la concentración del péptido Lisina<sub>30</sub>-NT que saturará el NTS1 y que su aporte de PLL sumado a la del aporte del péptido PF-Lisina<sub>20</sub> condensará al pDNA, en estructuras toroides.

#### **6.3.2. Análisis electroforético de la interacción de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado**

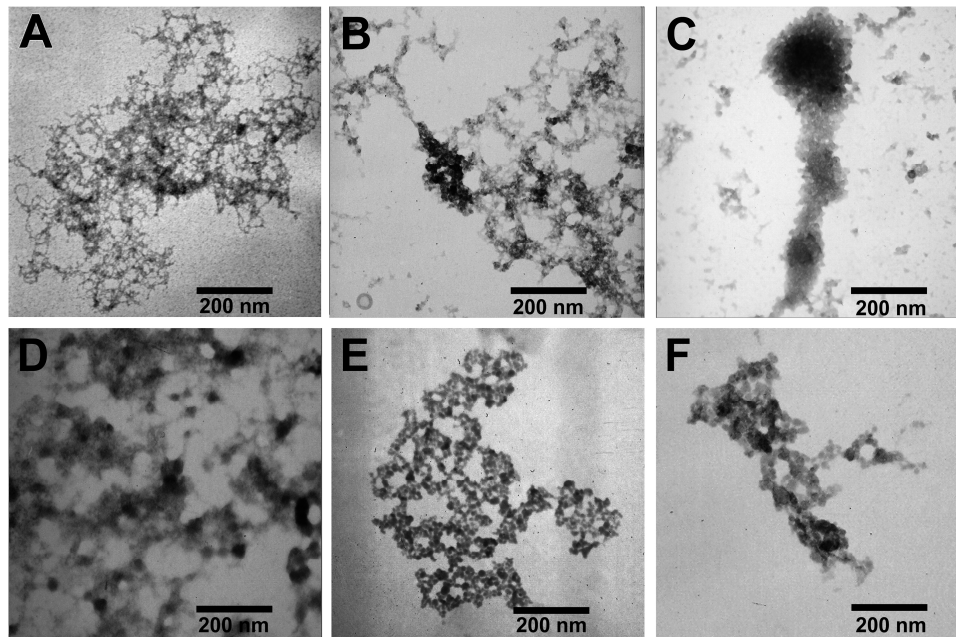
Los cambios en el patrón electroforético del pDNA que resultan de la interacción de los componentes del NT-poliplex reflejan el grado de condensación observada por microscopía electrónica de transmisión (Figura 18). La condensación del pEGFP-N1 (6 nM) (Figura 17 línea 1) se logró por la interacción secuencial de 5  $\mu$ M de PK (Fig. 17 línea 2), 1%SBF (Figura 17 línea 3) y concentraciones equimolares de Lisina<sub>30</sub>-NT y PF-Lisina<sub>20</sub> de 6.4  $\mu$ M (Figura 17 línea 5), de 3.2  $\mu$ M (Figura 17 línea 6) o de 1.6  $\mu$ M (Figura 17 línea 7), en comparación a la condensación inducida por el NT-poliplex original (Figura 17 línea 4). Sin embargo, la concentración de 0.8  $\mu$ M de ambos péptidos produjo condensación parcial del pDNA (Figura 17 línea 8) debido a que la cantidad de cargas positivas que aportan las lisinas de ambos péptidos no son suficientes para neutralizar las cargas de pDNA. De este resultado se deduce que es necesario el aporte adicional de PLL para condensar adecuadamente el pDNA cuando se utilicen concentraciones inferiores a 0.8  $\mu$ M de ambos péptidos sintéticos, como lo demuestra la Figura 17 línea 9). La adición de 493 nM PLL a la cantidad aportada por ambos péptidos a sus concentraciones inocuas produjo la retención del pDNA (Figura 17 línea 9), comparándola con la del NT-poliplex original (Figura 17 línea 4).



**Figura 17.** Electroforesis de la interacción secuencial de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado. La fotografía muestra la condensación del pEGFP-N1 (6 nM) (carril 1) mediante la interacción secuencial de 5  $\mu$ M de PK (línea 2), 1% de SBF (carril 3) y concentraciones equimolares de Lisina<sub>30</sub>-NT y PF-Lisina<sub>20</sub> de 6.4  $\mu$ M (carril 5), 3.2  $\mu$ M (carril 6) y 1.6  $\mu$ M (carril 7), en comparación a la condensación inducida por el NT-poliplex original (carril 4). El carril 8 muestra la condensación parcial del pDNA inducida por la concentración equimolar de 0.8  $\mu$ M de ambos péptidos. La adición de 493 nM PLL (42 KDa) a la relación molar óptima de los péptidos Lisina<sub>20</sub>-NT (50 nM) y PF-Lisina<sub>20</sub> (2700 nM) logra la condensación adecuada del pDNA (carril 9).

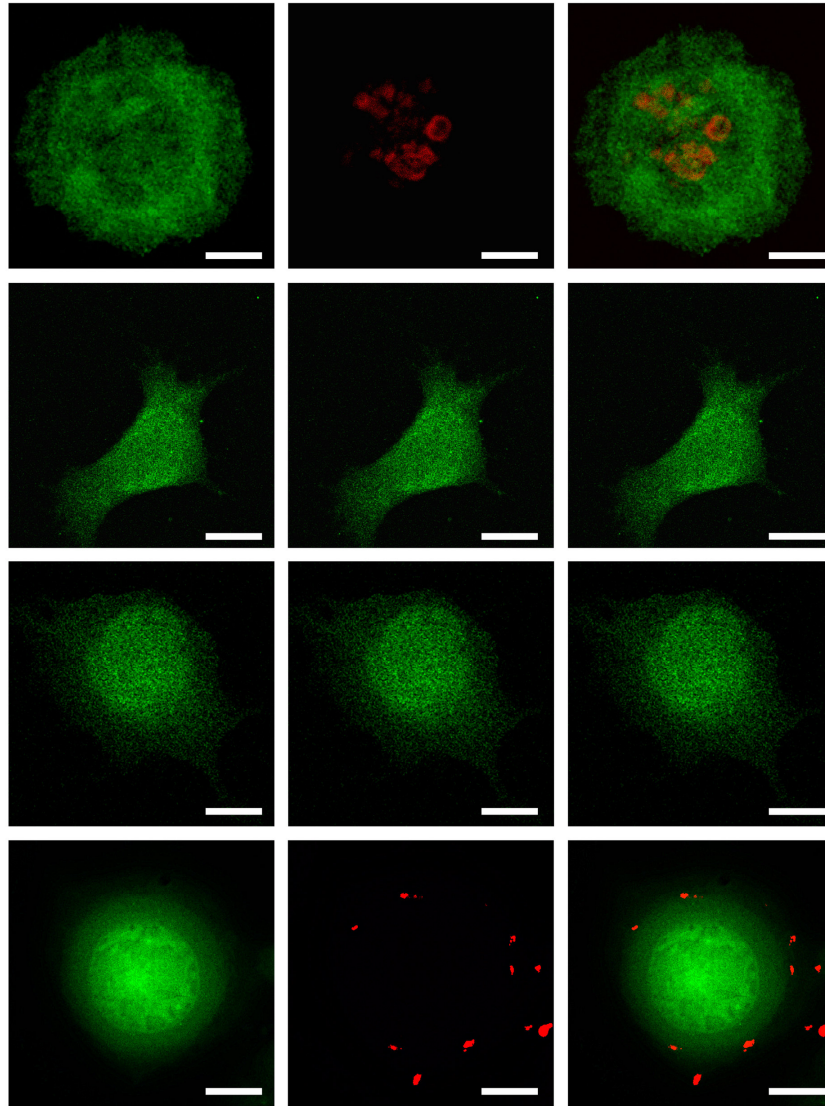
### ***6.3.3. Cambios físicos del pDNA en la formación del NT-poliplex auto-ensamblado***

Los estudios de TEM mostraron los cambios físicos del pDNA inducidos por la interacción secuencial de los componentes, en la formación del NT-poliplex auto-ensamblado. La forma del pDNA (6nM) es de red irregular o laxa (Figura 18A). Un claro núcleo de condensación en el pDNA se observó después de su unión electrostática con el PK (6 $\mu$ M) (Figura 18B). El complejo pDNA-PK se condensó en unas estructuras ovoides o esféricas después de la adición de 1% SBF (Figura 18C). La unión electrostática de los péptidos Lisina<sub>20</sub>-NT (50 nM) y PF-Lisina<sub>20</sub> (2700 nM) no produjo la condensación del complejo pDNA-PK-1% SBF en estructuras toroides (Figura 18D). Esta condensación se logró por la adición de 472 nM de PLL (Figura 18E).



**Figura 18.** Microscopía electrónica de los cambios físicos del pDNA durante los pasos secuenciales de la formación del NT-poliplex auto-ensamblado con el pEGFP-N1. A) La microfotografía muestran la forma natural del pDNA solo (6 nM). B) Condensación inicial de pDNA causada por la adición de 6  $\mu$ M de PK. C) Condensación del complejo pDNA-PK en la presencia de 1% SBF. D) Condensación parcial del complejo pDNA-PK-SBF inducida por la unión electrostática de los péptidos Lisina<sub>20</sub>-NT y PF-Lisina<sub>20</sub> a la relación molar óptima (50 nM : 2700 nM). E) Condensación en nanopartículas toroidales inducida por la adición de 472 nM de PLL a la relación molar óptima de los péptidos. F) Acercamiento de nanopartículas toroidales formadas por el NT-poliplex auto-ensamblado. 6.3.4. Especificidad del NT-poliplex auto-ensamblado

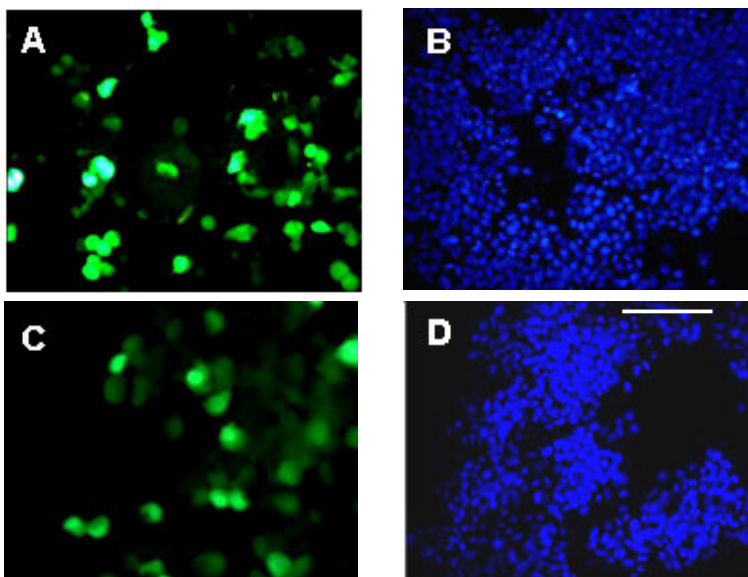
El estudio de microscopía confocal mostró la presencia de pDNA marcado con yoduro de propidio a nivel del núcleo celular a los 45 minutos de la adición del NT-poliplex auto-ensamblado a las concentraciones molares de 50 nM de Lisina<sub>20</sub>-NT, 2,700 nM de PF-Lisina<sub>20</sub>, 472 nM de PLL, 6  $\mu$ M de PK y 6 nM de pEGFP-N1 (Figura 19 A-C). Los experimentos de bloqueo del dominio de unión del NTS1 tanto con SR-48692 (500 nM) (Figura 19 D-F) como con 1  $\mu$ M de NT (Figura 19 G-I), mostraron ausencia de pDNA marcado con yoduro de propidio en el interior de la célula. La solución hipertónica de sacarosa (0.45 M), inhibidor de la polimerización de la clatrina (Heuser, 1989), previno la endocitosis del NT-poliplex auto-ensamblado, marcado con yoduro de propidio (Figura 19 J-L). Estos experimentos en conjunto apoyan la participación de la endocitosis mediada por el NTS1 en la internalización del NT-poliplex auto-ensamblado.



**Figura 19.** Participación de la endocitosis del receptor de alta afinidad a neurotensina en la transferencia génica del NT-políplex auto-ensamblado. Los paneles A-C muestran la presencia de pDNA marcado con yoduro de propidio a nivel del núcleo celular a los 45 minutos de la adición del NT-políplex auto-ensamblado a las concentraciones molares de 50 nM de Lisina<sub>20</sub>-NT, 2,700 nM de PF-Lisina<sub>20</sub>, 472 nM de PLL, 6  $\mu$ M de PK y 6 nM de pEGFP-N1. Los paneles D-F muestran la ausencia de marcas de yoduro de propidio en el interior celular debida al bloqueo del dominio de unión del NTS1 con SR-48692 (500 nM). Los paneles G-I muestran el efecto del bloqueo del dominio de unión del NTS1 por 1  $\mu$ M de NT. Los paneles J-L muestran la presencia de las marcas de yoduro de propidio en la periferia celular debido a la inhibición de la endocitosis por una solución hipertónica de sacarosa (0.45 M). Barras de calibración = 100  $\mu$ M.

### 6.3.5. Eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado

La Figura 20 A muestra que la máxima eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado, en la línea celular N1E-115, se obtiene con las siguientes concentraciones molares de sus componentes: NT 50 nM, PF 2,700 nM y pK 6  $\mu$ M y 472 nM de PLL. La misma eficiencia de transfección se mantuvo en el rango de concentraciones de NT de 5.3 – 50 nM manteniendo constante la concentración de los otros componentes (datos no mostrados). La máxima eficiencia del NT-poliplex auto-ensamblado fue aproximadamente 50%, similar a la producida por NT-poliplex original (Figura 20 C).



**Figura 20:** Capacidad del NT-poliplex auto-ensamblado de transfectar células N1E-115. Los paneles A-B muestran la máxima eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado (NT 50 nM, PF 2,700 nM y pK 6  $\mu$ M y 472 nM de PLL). Los paneles C-D muestran la máxima eficiencia de transfección obtenida con el NT-poliplex original. B y D corresponde a la totalidad de núcleos teñidos con Hoesch. La fluorescencia fue observada con un microscopio Leica DMIRE2 usando un objetivo 20X y el filtro K3 para la GFP y el A para el Hoesch. Barras de calibración = 100  $\mu$ M

## 7. Discusión

En este trabajo detallamos el procedimiento para la síntesis del NT-poliplex mejorado por péptidos virales y determinamos la proporción de sus componentes que permiten su alta eficiencia de transfección tanto en células en cultivo como en el SNC. Concluimos que una molécula de NT y cuatro moléculas de PF conjugadas con 2 moléculas de PLL

producen una alta eficiencia de expresión del transgén *in vivo* e *in vitro*, lo cual es adicionalmente determinado por una relación molar específica entre el pDNA y el NT-vector. Bajo estas condiciones, el NT-poliplex se condensa en nanopartículas con una estructura particular (formas toroides) y un tamaño preciso que determinan su endocitosis y la expresión del transgén, sin efecto citotóxico. En la relación molar óptima para cada plásmido, el NT-poliplex es capaz de cotransfectar dos diferentes plásmidos en la misma célula. Demostramos, además, una estrecha asociación entre el patrón electroforético de pDNA con los cambios físicos observados por microscopía electrónica que resultan de la interacción electrostática de los componentes del NT-poliplex.

### **7.1. Propiedades biofísicas del NT-poliplex**

Previamente reportamos el cálculo teórico que predice la conjugación de 5 moléculas de NT a la PLL, usando como entrecruzador bifuncional al LC-SPDP, considerando que la eficiencia de la reacción fuera 100% (Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000). En este trabajo la eficiencia final del SPDP fue de un 26%, por lo tanto la consideración teórica podría predecir un promedio de 1.3 moléculas de NT unidas a la PLL. Usando [<sup>125</sup>I]-NT determinamos 1 molécula en el conjugado con la PLL, resultado cercano a la predicción. La corroboración de la exactitud del cálculo teórico garantiza que los diferentes pasos de la síntesis descritos en este trabajo son tan precisos que proporcionarán la concentración de los motivos funcionales del NT-poliplex necesaria para una transfección exitosa. En la relación molar óptima, la concentración de la NT proporcionada por el NT-poliplex fue de 253 nM para el pEGFP-N1 y 745 nM para el pDAT-EGFP, concentraciones más altas que la constante de afinidad (*K<sub>d</sub>*) de la unión del NT al NTS1 en las células N1E-115 (5 nM) (Cusack et al., 1991) y en las neuronas dopaminérgicas *in vivo* (0.3 nM) (Boudin et al., 1998). Por lo tanto, con las concentraciones de los componentes de NT-poliplex que se aportan a la relación molar óptima se garantizó la activación de la endocitosis mediada por NTS1 (Arango-Rodriguez et al., 2006).

La formación del alfa-hélice a pH 6.0 del PF derivado de la hemaglutinina es el responsable de la propiedad anfifílica de la fusogenicidad (Swalley et al., 2004), (Madhusoodanan and Lazaridis, 2003). El análisis electroforético en gradientes crecientes de acidez demostró que a pH 6.0 el NT-poliplex tiene un patrón de movilidad similar al observado a pH fisiológico. Este resultado sugiere integridad y estabilidad

del NT-poliplex a un pH en el que se dispara la fusogenicidad del PF. Usando [<sup>3</sup>H] calculamos que el NT-vector contiene 4 moléculas de PF, lo que sugiere que por lo menos esta cantidad induce la liberación del NT-poliplex desde el endosoma (Mastrobattista et al., 2002). A continuación, el pDNA del poliplex puede ser translocado al núcleo mediante la NLS de la proteína VP1 del virus SV40 (Ishii et al., 1994; Aris and Villaverde, 2003) como previamente lo demostraron otros estudios de nuestro grupo (Navarro-Quiroga et al., 2002).

La adecuada condensación del pDNA en nanopartículas toroidales (< 200 nm) a una concentración suficiente es una condición necesaria para obtener transfecciones eficientes mediadas por el NT-poliplex (Demeneix et al., 2004). El análisis de microscopía electrónica mostró que estas características son cumplidas por el NT-poliplex en la relación molar óptima. A pesar de la incrementada cantidad de estructuras toroides presentes en la relación molar de 1:42, la eficiencia de transfección fue más baja que la relación 1:34. Este resultado podría ser explicado por la competición por el NTS1 entre el NT-vector libre y el NT-poliplex. Sugerimos, que el exceso del NT-vector libre podría resultar después de la condensación total del pDNA (6 nM) en la relación molar óptima. Otra posible hipótesis para explicar la baja eficiencia de transfección en la relación molar 1:42 ha sido discutida por otros autores, quienes atribuyen la baja eficiencia a la compactación extrema del DNA que resulta de altas proporciones de proteína: DNA (Hwang et al., 2001), (Fischer et al., 2004). Otro factor que puede explicar la baja expresión del transgén es la citotoxicidad, como lo apoya la disminución de la viabilidad celular observada en la relación molar 1:42.

El estudio de microscopía electrónica sugiere que tanto 6 µM de PK como 1% de SBF causan condensación parcial del pDNA antes de que el NT-vector induzca la aparición de las nanopartículas toroidales, como se muestra en la figura 7 B y C. Este efecto de precondensación puede ser causado por la interacción de las cargas electrostáticas entre el pDNA (anión), el PK catiónico del SV40 y las proteínas catiónicas del SBF. La adición del suero estabiliza la estructura del poliplex eléctricamente neutro en concentraciones fisiológicas de sales, evitando así la rápida formación de grandes agregados (Cotten and Wagner, 1993). Estas macropartículas son generalmente poco efectivas para liberar genes y pueden ser tóxicas debido a la embolización que causan en los vasos sanguíneos del pulmón (Pack et al., 2005). Sin embargo, hay datos contradictorios en los que se reporta que la albúmina del suero y otras proteínas cargadas negativamente causan agregación y pueden conducir a un rápido aclaramiento

del poliplex por las células fagocíticas y por el sistema retículo endotelial (Dash et al., 1999). Mediante estudios de citometría de flujo (FACS) se ha observado que la expresión de la GFP es reducida aproximadamente un 80% en presencia de 1% suero (Medina-Kauwe et al., 2001a). Nosotros determinamos que el suero es más efectivo si se adhiere antes de colocar el NT-vector, debido a que en este punto hay más cargas aniónicas disponibles que permiten la unión de las proteínas catiónicas del suero, a su vez quedando cargas aniónicas libres para la unión posterior del NT-vector.

Sugerimos que los ensayos de retención electroforética del pDNA en geles de agarosa es un procedimiento rápido, simple y poco costoso, útiles como una herramienta para predecir la relación molar óptima para el plásmido de interés (Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000), (Navarro-Quiroga et al., 2002), (Martinez-Fong et al., 1994). En este trabajo mostramos que el ensayo de retención también refleja el grado de condensación del pDNA (6 nM) inducido por la interacción electrostática de los componentes del NT-poliplex (Figura 6). Además, el ensayo de retención fue útil para demostrar la sensibilidad del NT-poliplex a extrema acidez (Figura 8).

Basándonos en la relación molar óptima, mostramos que el NT-poliplex es capaz de transfectar dos diferentes plásmidos en la misma célula. Esta propiedad está en relación con la habilidad potencial de los vectores de genes basados en PLL para coliberar varios plásmidos, como se ha mostrado previamente en cultivo primario de neuronas (Collins et al., 2003).

En este estudio, la especificidad de la NT como molécula directriz de la transferencia génica fue demostrada por la incapacidad del NT-poliplex para transfectar cuando el dominio de unión del NTS1 es bloqueado por un antagonista no peptídico de la NT (Gully et al., 1993). Además, la ausencia de expresión del transgén cuando el plásmido fue liberado por el poliplex “untargeted” o con el complejo pDNA-PK dan soporte a la especificidad del NT-vector y demuestran que el PF y el PK no son los responsables de la entrada del plásmido a las neuronas dopaminérgicas *in vivo*. No obstante a esto, un estudio reciente *ex vivo* ha mostrado que la simple adición de PF a un complejo denominado molossin PLL-DNA es capaz de transfectar el 100% de las células endoteliales corneales sin la contribución de la molécula directriz, la molossin (Collins and Fabre, 2004). Las diferentes condiciones utilizadas en la preparación de los complejos con el DNA llevan a la formación de partículas que varían en tamaño, carga y estabilidad del complejo/DNA, lo que favorece la atracción con la superficie celular, determina el mecanismo por el cual entra el complejo a la célula blanco para la



liberación exitosa del transgén (Collins and Fabre, 2004). Se ha demostrado que al preparar los complejos en medios isotónicos no iónicos como la dextrosa al 5%, las partículas se hacen más pequeños ~70 nm y más electropositivos a diferencia de cuando se preparan en medios que contienen sales como NaCl al 0.15 M, PBS o medio libre de suero (Zhang et al., 2001) en lo que adquieren un mayor tamaño ~600 nm; esta diferencia en tamaño ~70 nm vs. ~600 nm favorece la difusión más rápida del complejo y determina el mecanismo mediante el cual entra el complejo a la célula.

Las propiedades intrínsecas del tipo celular, el mecanismo molecular de la internalización, y las diferentes condiciones experimentales (*in vitro* vs. *in vivo*) pueden ser factores que permiten o no la transferencia de genes por ciertos vectores no virales.

En adición nosotros mostramos que el NT-poliplex inyectado en el estriado fue capaz de transferir el gen BDNF-flag principalmente en las neuronas dopaminérgicas de la SNc con una alta eficiencia. Sin embargo, se observó que algunas neuronas no dopaminérgicas que están cerca a la SNc fueron inmunoreactivas para flag. Estos hallazgos sugieren que las neuronas GABAérgicas nigrales que expresan el receptor trkB (Arenas et al., 1996) pudieran haber capturado la proteína BDNF-flag liberada de las neuronas dopaminérgicas transfectadas. El transporte retrógrado del NT-poliplex desde el estriado a la SNc representa una ruta atractiva para la transfección, evitando así el daño mecánico de las neuronas dopaminérgicas que ocurre por la administración directa en el mesencéfalo. Un estudio reciente *in vivo* ha mostrado la liberación de un pDNA utilizando la vía del transporte retrogrado desde la lengua a neuronas motoras hipoglosales de ratones (Morris et al., 2004). La expresión específica de este plásmido se atribuyó al uso de un promotor tejido específico como fue la subunidad  $\alpha 1$  del receptor a glicina (Gly-R) el cual fue clonado en un plásmido para dirigir la expresión de la proteína EGFP, constructo denominado EGFP::GlyR $\alpha 1$ . A su vez, inyectaron el plásmido en el núcleo central de la amígdala el cual recibe proyecciones del núcleo parabranchial y tiene una alta densidad de receptores GlyR. En este caso observaron expresión de la proteína en neuronas del núcleo parabranchial mas no en la corteza insular, demostrando así que esta secuencia promotora es suficiente para conferir especificidad a la expresión del transgén. La diferencia con nuestros estudios *in vivo* en los que al inyectar pDNA solo (datos no mostrados) o unido al PK (Fig. 12-13) no obtenemos expresión del gen de interés se puede atribuir a la cantidad del pDNA utilizado. Generalmente los autores que utilizan pDNA solo, inyectan localmente entre

5-10  $\mu\text{g}$  de pDNA, cantidad 6-12 veces mayor que la utilizada en nuestro modelo experimental *in vivo* (0.8  $\mu\text{g}$ ). Otra diferencia radica en el mecanismo de internalización, mientras que el pDNA desnudo entra a la célula por macropinocitosis a través de vesículas o por poros transitorios de la membrana celular, (Zhang et al., 2004; Wolff and Budker, 2005), el NT- poliplex lo hace por endocitosis activada por receptor (Martinez-Fong et al., 1999; Alvarez-Maya et al., 2001; Navarro-Quiroga et al., 2002; Arango-Rodriguez et al., 2006).

En conclusión, el NT-poliplex debe cumplir con 4 condiciones para asegurar una constante y alta eficiencia de transfección en células específicas: 1) debe tener suficiente concentración de NT para activar la endocitosis mediada por NTS1, 2) debe alcanzar una adecuada condensación que es obtenida en la relación molar óptima entre el pDNA y el NT-vector, 3) debe contener un concentración suficiente de PF para que rompa la membrana endosomal y 4) debe contar con un PK que permita la translocación hacia el núcleo del pDNA. La caracterización de las propiedades biofísicas de los componentes del NT-poliplex podría ser la base para el desarrollo de otros vectores génicos.

## ***7.2. Regulación de la expresión del transgén***

El control de la expresión de transgenes es esencial para evitar efectos deletéreos causados por la excesiva expresión de genes no regulados (Croll et al., 1999), (Toniatti et al., 2004). Existen reportes que indican que la sobre-expresión por largos periodos de GDNF disminuye la expresión de TH en la SNc y en el VTA, así como la síntesis de dopamina en el núcleo estriado (Rosenblad et al., 2003). La excesiva expresión de GDNF también provoca ramificaciones neuronales aberrantes en núcleos extra-estriales (Rosenblad et al., 2003; Georgievska et al., 2002). De igual manera, la sobreproducción de BDNF se ha asociado con deficiencias en aprendizaje e hiperexcitabilidad en neuronas del hipocampo y corteza entorinal (Croll et al., 1999). Recientemente se reportó que el NT-poliplex es un sistema eficiente para transferir el gen neurotrófico GDNF-flag a neuronas dopaminérgicas de ratas hemiparkinsonianas (Gonzalez-Barrios et al., 2006a). La expresión del GDNF-flag causó la recuperación anatómica, bioquímica y fisiológica de los animales hemiparkinsonianos en un periodo de 1 mes post-polifeción (Gonzalez-Barrios et al., 2006a). Debido a la gran eficiencia de transfección no podemos descartar que la desmedida expresión de GDNF-flag de manera constante produzca efectos deletéreos.

El promotor hDAT es hasta el momento el más específico para regular la expresión de transgenes en neuronas dopaminérgicas (Bannon et al., 2001), (Sacchetti et al., 1999). La potencia del promotor hDAT explica la alta eficiencia de expresión del transgén neurotrófico BDNF-flag en neuronas dopaminérgicas de la SNc, transfectadas tanto por la vía retrógrada como por la vía somática de la NT (Arango-Rodriguez et al., 2006). La ausencia de expresión del transgén en células estriatales conocidas que también expresan el receptor NTS1 (Mendez et al., 1997), demuestra la especificidad del promotor hDAT. Por lo tanto, con la incorporación de elementos transcripcionales endógenos como el promotor hDAT para regular la expresión del transgén, hemos logrado proporcionar un punto adicional de selectividad al NT-poliplex restringiendo la expresión de transgenes a las neuronas dopaminérgicas.

La expresión prolongada del gen phDAT-EGFP por la transfección del NT-poliplex puede ser debida al promotor hDAT. También el promotor constitutivo hEF-1 $\alpha$  es capaz de promover la expresión prolongada del hGDNF-flag aún en neuronas dopaminérgicas bajo la influencia del estrés oxidativo inducido por 6-OHDA (Gonzalez-Barrios et al., 2006a). Estos hallazgos sugieren que los promotores tejido específicos (hDAT) o constitutivos (EF-1 $\alpha$ ) son más efectivos que los promotores virales (Alvarez-Maya et al., 2001) para prolongar la expresión del transgén cuando se usa el NT-poliplex para la transferencia génica. Es posible que los promotores tejido específicos o constitutivos evadan los mecanismos de inactivación transcripcional (Sacchetti et al., 1999), (Sacchetti et al., 2001), a diferencia de los promotores virales conocidos por dirigir la expresión del transgén en un corto periodo (Beck et al., 2004). Estos promotores virales son inactivados con el tiempo por metilación en sitios específicos de las citosinas en los dobles CpG preferencialmente (Brooks et al., 2004).

La gran eficiencia de los elementos transcripcionales endógenos produce expresión del transgén sostenida en la población celular a la que se restringe la transfección. Por esto, la tendencia actual de la terapia génica es controlar la expresión para evitar efectos citotóxicos por la expresión prolongada del gen de interés. Los sistemas para la regulación de la expresión de genes actualmente disponibles presentan desventajas tales como expresión basal del transgén, efectos inespecíficos, y citotoxicidad del agente inductor del sistema. Por eso, esta aplicación se limita a ciertos tipos celulares y cuando se requieren bajos niveles de expresión del gen de interés (Yarranton, 1992). Hasta la fecha el sistema Tet ha mostrado ser el más exitoso ya que se activa por la administración de dosis no tóxicas de la Dc o Tc, promoviendo la alta expresión del

transgén, y se inactiva en ausencia de esos fármacos. Además, la activación e inactivación del sistema ocurre de una forma rápida comparado con otros sistemas disponibles (Baron and Bujard, 2000). Recientemente la modificación del sistema Tet ha evitado la expresión basal del transgén en ausencia del inductor (estado inactivo), por lo que se conoce como Tight (Gossen and Bujard, 1992b). Es ideal para aquellas aplicaciones en las que la proteína transducida es potencialmente tóxica en dosis ínfimas.

Utilizando lipofectamina como método de transfección comprobamos la funcionalidad del sistema pTet-On y pTRE-Tight-DsRed2, el cual fue capaz de activarse por Dc. Sin embargo, la cotransfección de esos dos plásmidos con el NT-poliplex causó severa citotoxicidad. Es posible que la alta eficiencia de transfección del NT-poliplex pueda estar generando la sobre-expresión de la proteína tTA, la cual se ha reportado que, aún en niveles bajos, es tóxica debido a la presencia del dominio trans-activador VP16 (Shockett et al., 1995). Aunque el NT-poliplex permite la cotransfección de dos plásmidos de tamaño semejante en una misma célula (Arango-Rodriguez et al., 2006), es probable que la cotransfección de dos plásmidos de diferente tamaño molecular conduzca al desarrollo de la citotoxicidad por algún mecanismo aun no aclarado.

Además de la regulación dada por la administración de Dc se puede otorgar otro punto de especificidad al sistema regulable Tet-On, mediante la sustitución del promotor CMV del plásmido pTet-On por promotores específicos de tejido (Fitzsimons et al., 2002; Gardaneh and O'Malley, 2004; Dumortier et al., 2005). De esta manera, a la vez que se restringe la expresión del transgén al tipo celular deseado, también se puede prolongar e incrementar la expresión del transgén por la respuesta del promotor a los factores transcripcionales endógenos. Nosotros evaluamos con lipofectamina la funcionalidad del sistema pTet-On modificado con dos promotores tejido específicos para las neuronas dopaminérgicas el pDATpTet-On y el 3xNBREpTet-On. De estas dos construcciones, solamente el par de plásmidos 3xNBRE pTet-On (0.25 µg) con pTRE-Tight-DsRed2 (0.1 µg) produjo expresión inducida por Dc aunque con baja eficiencia. Atribuimos esta reducida eficiencia de expresión del transgén a los bajos niveles de el factor transcripcional Nurr1 en las células SK-N-AS, el cual es indispensable para activar al elemento de respuesta 3XNBRE presente en ambos promotores tejido específico de neuronas dopaminérgicas.

### **7.3. Auto-ensamblaje del NT-poliplex**

Previamente demostramos que al menos tres motivos funcionales son necesarios para que el NT-poliplex transfiera pDNA específica y eficientemente; estos son, el ligando (NT), el motivo fusogénico (PF), y la señal de localización nuclear (PK) (Navarro-Quiroga et al., 2002). La principal conclusión que emerge de este trabajo es que los dos péptidos quimeras (Lisina<sub>30</sub>-NT y PF-Lisina<sub>20</sub>) así como el PK y el pDNA suministrados individualmente fueron capaces de auto-ensamblarse por uniones electrostáticas para formar el NT-poliplex. El NT-poliplex auto-ensamblado produjo transfección específica y eficiente comparable al NT-poliplex original.

La condensación del pDNA en nanopartículas toroides (50-100 nm) es una condición necesaria pero no suficiente para la transferencia génica vía endocitosis mediada por receptor (Conwell and Huang, 2005). La caracterización biofísica del NT-poliplex demostró que las concentraciones de 5  $\mu$ M de PK y 198 nM de NT-vector son requeridas para condensar 6 nM de pEGFP-N1 en nanopartículas toroides (Arango-Rodriguez et al., 2006). Esto se debe a que esa concentración del NT-vector provee 611.5 nM concentración de PLL, principal factor condensante del pDNA (Martinez-Fong and Navarro-Quiroga, 2000). El análisis de microscopía electrónica reveló que la cantidad de PLL (30 K) proveída por las concentraciones funcionales de Lisina<sub>30</sub>-NT (5.3-50 nM) y PF-Lisina<sub>20</sub> (2700 nM) no pudo inducir la condensación del pDNA en nanopartículas toroides (Figura 17D). Estas estructuras fueron inducidas solamente por la adición de 472.2 nM de PLL (40 kDa), como lo muestra la Fig. 17E. El orden de la adición de PLL afecta la eficiencia de transfección; los NT-poliplex auto-ensamblados más eficientes fueron producidos cuando la PLL de alto peso molecular fue añadida al pDNA previamente condensado por la adición de la mezcla de Lisina<sub>20</sub>-NT y PF-Lisina<sub>20</sub>. La complementación con PLL de alto peso molecular demerita la simplicidad del NT-vector auto-ensamblado y lo asemeja al NT-poliplex original. Otros sistemas de transferencia génica basados en péptidos quiméricos también requieren de otro polímero de mayor masa molecular como la protamina para inducir la correcta condensación del pDNA (Medina-Kauwe et al., 2001a), así como de cloroquina para inducir la adecuada liberación del complejo del endosoma (Zeng et al., 2004). Recientemente se han reportado otros sistemas de transferencia génica auto-ensamblados capaces de transfectar de manera específica y eficiente a células de la retina (monensina), a células neuronales que expresan trakA, células que expresan el

receptor a integrinas (Ad3-PBK10), entre otros. Estos hallazgos sugieren que aún péptidos quimeras cortos como los de esos sistemas de transferencia génica pueden proveer la PLL suficiente para condensar adecuadamente el pDNA. La discrepancia en el uso adicional de un polication de alto peso molecular puede deberse a diferencias metodológicas, al diferente número de motivos funcionales utilizados, a las propiedades intrínsecas del tipo celular y al mecanismo de endocitosis involucrado. Por ejemplo, la adición de PF al complejo PLL-molosina-DNA contribuye a la formación de nanopartículas neutras > 200 nm que pudieran internalizarse específicamente a través de macropinocitosis. En contraste, ambos tipos de NT-poliplexes que se condensan en partículas toroides < 100 nm se internalizan a través de la endocitosis mediada por NTS1.

El péptido ligando en línea con la PLL representa una gran ventaja con respecto al ligando unido por enlace disulfuro a la PLL, porque se puede predeterminar con precisión la concentración efectiva para activar al receptor. Nuestros resultados demuestran que el NT-poliplex auto-ensamblado con el péptido Lisina<sub>30</sub>-NT en el rango de concentraciones de 5.3 a 50 nM produjo la misma eficiencia de transfección (alrededor de 50%). Este rango de concentraciones está dentro de las concentraciones fisiológicas de la activación del NTS1 correspondiendo a la *Kd* del NTS1 para las células N1E-115 (5 nM) y a una concentración 2 veces menor que la concentración saturante (1 µM) (Cusack et al., 1991). Solamente en este rango de concentración, la NT (1 µM) o el SR-48692 (0.5 µM) bloquearon de manera competitiva la internalización del NT-poliplex auto-ensamblado. De igual manera, el bloqueo de la polimerización de la clatrina por sacarosa 0.45 M evitó la internalización del NT-poliplex auto-ensamblado, apoyando así la participación de la endocitosis de NTS1 como en el caso del NT-poliplex original. Sin embargo, concentraciones mayores que 0.8 µM de péptido Lisina<sub>30</sub>-NT en el NT-poliplex auto-ensamblado ocasionaron severos efectos citotóxicos (datos no mostrados). Este resultado concuerda con el hallazgo de que el NT-poliplex produce citotoxicidad a relaciones mayores que la relación molar óptima. Es posible que la excesiva entrada de Ca<sup>2+</sup> por la sobre-estimulación del NTS1 sea el responsable de los efectos deletéreos en las células N1E-115 expuestas a concentraciones saturantes del NT-poliplex. Otra posible fuente de citotoxicidad podría ser el exceso de PLL provista por las concentraciones saturantes del NT-poliplex. Se conoce que la PLL de baja y alta masa molecular tanto en su forma libre como unida al pDNA, induce apoptosis en células cultivadas (Symonds et al., 2005).

Hemos mostrado previamente que la inclusión de un motivo fusogénico y kariofílico incrementa la eficiencia de transfección del NT-poliplex. Utilizando [<sup>3</sup>H]-PF se determinó que el NT-vector efectivo (113 KDa) tiene 4 moléculas fusogénicas y su concentración aportada por el poliplex formado a la relación molar óptima para pEGFP-N1 (1:33) es de 198 nM (Arango-Rodriguez et al., 2006). Trabajos previos han establecido que 6 μM de PK es la concentración mínima necesaria para causar un retardo en el corrimiento electroforético de 6 nM de pDNA y para incrementar la eficiencia de transfección del NT-poliplex. Sobre estas bases, las concentraciones del péptido PF-Lisina<sub>20</sub> y la del PK fueron utilizadas de manera constante en este estudio para 6 nM del plásmido pEGFP-N1. En nuestras manos concentraciones mayores a las utilizadas son citotóxicas (datos no mostrados). Estudios previos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estos dos motivos no intervienen en la transferencia génica mediada por el NTS1. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la sola adición de PF al complejo PLL-molosina-DNA es capaz de transfectar de manera específica el 100% de las células cultivadas del endotelio corneal, sin la participación de la molécula ligando la molosina (Collins and Fabre, 2004). Este hallazgo sugiere fuertemente que algunos poliplexes pueden entrar a las células por otras vías endocíticas diferentes a las mediadas por receptor.

La señal de localización nuclear de la proteína Vp1 del virus SV40 (Ishii et al., 1994; Ishii et al., 1996), es un péptido de 20 a.a. contiene 4 lisinas que han permitido su acople electrostático al pDNA, como lo demostró el microensayo de retado electroforético en geles de agarosa. La naturaleza catiónica del PK resultó ser de gran utilidad para el auto-ensamblaje del NT-poliplex. Sin embargo, se ha reportado que motivos kariofílicos unidos covalentemente al pDNA no contribuyen al incremento de la eficiencia de transfección de otros sistemas no virales (Neves et al., 1999). Es posible que el tipo de unión (electrostática v.s. covalente) del PK al pDNA contribuya para ejercer su función.

En resumen, nuestros resultados mostraron que utilizando el motivo de unión al receptor y el PF en línea con una cadena de PLL es otra estrategia para formar el NT-poliplex. Al igual que el PK, todos esos elementos pueden interaccionar de manera electrostática con el pDNA y auto-ensamblarse en el NT-poliplex. La adición de PLL de alta masa molecular para ayudar a la condensación del pDNA en nanopartículas toroidales reduce el atractivo de la simplicidad del auto-ensamblaje. Si bien el vector auto-ensamblado igualó la eficiencia de transfección del NT-poliplex, no la superó. Estas limitaciones

sumadas a los altos costos de la síntesis química de los péptidos quimeras hacen poco atractivo la utilización rutinaria del NT-poliplex auto-ensamblado para transfecciones *in vitro* e *in vivo*, o para su utilización en modelos animales de terapia génica. Seguramente la aplicación de la tecnología recombinante para el desarrollo de los péptidos quimeras hará más accesible su disposición (Medina-Kauwe et al., 2001b; Medina-Kauwe et al., 2001a), (Deshayes et al., 2005), (Dincer et al., 2005).



## **8. Conclusiones**

### **8.1. Características biofísicas del poliplex de NT**

Una molécula de NT y cuatro moléculas de PF conjugadas con 2 moléculas de PLL producen una alta eficiencia de expresión del transgén *in vitro* e *in vivo*.

Existe una estrecha asociación entre el patrón electroforético de pDNA con los cambios físicos observados por microscopía electrónica que resultan de la interacción electrostática de los componentes del NT-poliplex.

En la relación molar óptima entre el pDNA y el NT-vector, el NT-poliplex se condensa en nanopartículas toroidales de un tamaño adecuado para que sea endocitado y ocurra la expresión exitosa del transgén, sin afectar la viabilidad celular.

En la relación molar óptima, el NT-poliplex es capaz de cotransfectar dos diferentes plásmidos en la misma célula y puede transfectar plásmidos de gran tamaño (10.597 kbp).

El NT-poliplex tiene la ventaja de que su síntesis y su preparación son fáciles y de costo reducido.

La caracterización de las propiedades fisicoquímicas del NT-poliplex sirve como una guía que ayuda a obtener constantes y eficientes transfecciones, como también comprender su interacción con el sistema biológico.

### **8.2. Regulación de la expresión del transgén**

La incorporación de elementos transcripcionales de tejido específico como hDAT fue capaz de regular la expresión del transgén *in vivo*, restringiéndola a las neuronas dopaminérgicas.

La lipofección del par de plásmidos del sistema regulable (pTet-On con pTRE-Tight-DSRed2) en la línea celular SK-N-AS, demostró la regulación de la expresión del transgén por elementos transcripcionales externos.

La lipofección del par de plásmidos del sistema regulable con el elemento de respuesta a Nurr1 (p3xNBR-pTet-On) produjo inducción por Dc de la expresión de DSRED2, aunque la eficiencia de transfección fue más baja que la del sistema original (pTet-On con pTRE-Tight-DSRed2).

La expresión del pTRE-Tight-Red bajo el control del phDAT 6250 pTet-On no produjo expresión de la DSRed2 y presentó un efecto citotóxico posterior a la lipofección.

Es probable que las células SK-N-AS no expresen el factor de transcripción *Nurr1* a niveles suficientes para la activación de los plásmidos que contienen los promotores tejido específico.

Con el NT-poliplex no se logró la regulación del transgén por elementos transcripcionales externos. Por el contrario, se observó alta citotoxicidad posterior a la polifeción en las células SK-N-AS que pudiera ser ocasionada por la alta eficiencia de transfección del NT-poliplex.

### ***8.3. Auto-ensamblaje del NT- poliplex***

El ensayo de retención electroforético y el análisis por microscopía electrónica de transmisión mostraron que la aportación de PLL por los péptidos quimeras en concentraciones funcionales, no es suficiente para condensar el pDNA en estructuras toroidales, lo cual se logra por la suplementación de PLL de alto peso molecular.

La internalización del NT-poliplex auto-ensamblado es por endocitosis del NTS1.

El NT-poliplex auto-ensamblado igualó la eficiencia de transfección obtenida con el NT-poliplex original.

El vector auto-ensamblado de NT no superó la eficiencia de polifeción obtenida con el vector tradicional de NT.



## **Referencias**

Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10):1651-1659.

Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D (2001) In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol Med* 7:186-192.

Amar S, Mazella J, Checler F, Kitabgi P, Vincent JP (1985) Regulation of cyclic GMP levels by neurotensin in neuroblastoma clone N1E115. *Biochem Biophys Res Commun* 129:117-125.

Anson DS (2004) The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 2:9.

Arango-Rodriguez ML, Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Arguelles DB, Bannon MJ, Kouri J, Forgez P, Rostene W, Garcia-Villegas R, Jimenez I, Martinez-Fong D (2006) Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 1760:1009-1020.

Arenas E, Akerud P, Wong V, Boylan C, Persson H, Lindsay RM, Altar CA (1996) Effects of BDNF and NT-4/5 on striatonigral neuropeptides or nigral GABA neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 8:1707-1717.

Aris A, Villaverde A (2003) Engineering nuclear localization signals in modular protein vehicles for gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 304:625-631.

Arnold LJ, Jr. (1985) Polylysine-drug conjugates. *Methods Enzymol* 112:270-285.

Arnold LJ, Jr., Dagan A, Gutheil J, Kaplan NO (1979) Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3246-3250.

Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P (2001) The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11:449-455.

Baron U, Bujard H (2000) Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* 327:401-421.

Barroso S, Richard F, Nicolas-Etheve D, Reversat JL, Bernassau JM, Kitabgi P, Labbe-Jullie C (2000) Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J Biol Chem* 275:328-336.

Beaudet A, Dournaud P, Boudin H (1998) Complementarity of radioautographic and immunohistochemical techniques for localizing neuroreceptors at the light and electron microscopy level. *Braz J Med Biol Res* 31:215-223.

Beck C, Uramoto H, Boren J, Akyurek LM (2004) Tissue-specific targeting for cardiovascular gene transfer. Potential vectors and future challenges. *Curr Gene Ther* 4:457-467.

Bissette G, Nemeroff CB, Loosen PT, Prange AJ, Jr., Lipton MA (1976) Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature* 262:607-609.

Bloomfield VA (1991) Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers* 31:1471-1481.

Boudin H, Pelaprat D, Rostene W, Pickel VM, Beaudet A (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J Neurosci* 18:8473-8484.

Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6:395-404.

Brown DW, Blais BP, Robinson HL (1988) Long terminal repeat (LTR) sequences, env, and a region near the 5' LTR influence the pathogenic potential of recombinants between Rous-associated virus types 0 and 1. *J Virol* 62:3431-3437.

Burgevin MC, Castel MN, Quarteronet D, Chevet T, Laduron PM (1992a) Neurotensin increases tyrosine hydroxylase messenger RNA-positive neurons in substantia nigra after retrograde axonal transport. *Neuroscience* 49:627-633.

Burgevin MC, Laduron PM, Quarteronnet D, Chevet T, Castel MN (1992b) Striatal injection of neurotensin increases tyrosine hydroxylase mRNA in substantia nigra. *Ann N Y Acad Sci* 668:311-313.

Bustamante JO, Michelette ER, Geibel JP, Dean DA, Hanover JA, McDonnell TJ (2000b) Calcium, ATP and nuclear pore channel gating. *Pflugers Arch* 439:433-444.

Bustamante JO, Michelette ER, Geibel JP, Dean DA, Hanover JA, McDonnell TJ (2000a) Calcium, ATP and nuclear pore channel gating. *Pflugers Arch* 439:433-444.

Capecchi MR (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22:479-488.

Castel MN, Beaudet A, Laduron PM (1994a) Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem Pharmacol* 47:53-62.

Castel MN, Beaudet A, Laduron PM (1994b) Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem Pharmacol* 47:53-62.

Castel MN, Malgouris C, Blanchard JC, Laduron PM (1990) Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. *Neuroscience* 36:425-430.

Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, Beaudet A (1992a) Autoradiographic localization of retrogradely transported neurotensin in nigrostriatal neurons. *Ann N Y Acad Sci* 668:323-325.

Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, Beaudet A (1992b) Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 50:269-282.

Chabry J, Gaudriault G, Vincent JP, Mazella J (1993) Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem* 268:17138-17144.

Chabry J, Labbe-Jullie C, Gully D, Kitabgi P, Vincent JP, Mazella J (1994) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J Neurochem* 63:19-27.

Chan CK, Jans DA (2002) Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. *Immunol Cell Biol* 80:119-130.

Chiou HC, Tangco MV, Levine SM, Robertson D, Kormis K, Wu CH, Wu GY (1994) Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers. *Nucleic Acids Res* 22:5439-5446.

Chowdhury NR, Hays RM, Bommineni VR, Franki N, Chowdhury JR, Wu CH, Wu GY (1996) Microtubular disruption prolongs the expression of human bilirubin-uridinediphosphoglucuronate-glucuronosyltransferase-1 gene transferred into Gunn rat livers. *J Biol Chem* 271:2341-2346.

Collins L, Asuni AA, Anderton BH, Fabre JW (2003) Efficient gene delivery to primary neuron cultures using a synthetic peptide vector system. *J Neurosci Methods* 125:113-120.

Collins L, Fabre JW (2004) A synthetic peptide vector system for optimal gene delivery to corneal endothelium. *J Gene Med* 6:185-194.

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.

Conwell CC, Huang L (2005) Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv Genet* 53:3-18.

Cotten M, Wagner E (1993) Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol* 4:705-710.

Cotten M, Wagner E, Birnstiel ML (1993a) Receptor-mediated transport of DNA into eukaryotic cells. *Methods Enzymol* 217:618-644.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Birnstiel ML (1993b) Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants. *J Virol* 67:3777-3785.

Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93:1491-1506.

Cusack B, Stanton T, Richelson E (1991) Developmental regulation of neurotensin receptor expression and function in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Eur J Pharmacol* 206:339-342.

Dalluge R, Haberland A, Zaitsev S, Schneider M, Zastrow H, Sukhorukov G, Bottger M (2002) Characterization of structure and mechanism of transfection-active peptide-DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1576:45-52.

Danielsen S, Varum KM, Stokke BT (2004) Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters. *Biomacromolecules* 5:928-936.

Dash PR, Read ML, Barrett LB, Wolfert MA, Seymour LW (1999) Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* 6:643-650.

Dean DA, Strong DD, Zimmer WE (2005) Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther* 12:881-890.

Demeneix B, Hassani Z, Behr JP (2004) Towards multifunctional synthetic vectors. *Curr Gene Ther* 4:445-455.

Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 62:1839-1849.

Dincer S, Turk M, Piskin E (2005) Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther* 12 Suppl 1:S139-S145.



Dumortier J, Schonig K, Oberwinkler H, Low R, Giese T, Bujard H, Schirmacher P, Protzer U (2005) Liver-specific expression of interferon gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice. *Gene Ther* 12:668-677.

Duncan R (1992) Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anticancer Drugs* 3:175-210.

Ekrami HM, Shen WC (1995) Carbamylation decreases the cytotoxicity but not the drug-carrier properties of polylysines. *J Drug Target* 2:469-475.

Elferink JG (1991) Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations. *Inflammation* 15:103-115.

Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P (1996) Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 225:186-194.

Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P (1997) The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1324:27-36.

Fassio A, Evans G, Grisshammer R, Bolam JP, Mimmack M, Emson PC (2000) Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 39:1430-1442.

Faure MP, Nouel D, Beaudet A (1995) Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 68:519-529.

Fischer D, Dautzenberg H, Kunath K, Kissel T (2004) Poly(diallyldimethylammonium chlorides) and their N-methyl-N-vinylacetamide copolymer-based DNA-polyplexes: role of molecular weight and charge density in complex formation, stability, and in vitro activity. *Int J Pharm* 280:253-269.

Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ (2002) Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* 28:227-236.

Fuller M, Anson DS (2004) Can the use of HIV-1 derived gene transfer vectors for clinical application be justified? *Curr Gene Ther* 4:65-77.

Gailly P, Najimi M, Hermans E (2000) Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett* 483:109-113.

Gardaneh M, O'Malley KL (2004) Rat tyrosine hydroxylase promoter directs tetracycline-inducible foreign gene expression in dopaminergic cell types. *Brain Res Mol Brain Res* 126:173-180.

Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A (2002) Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol* 177:461-474.

Giulotto E, Israel N (1984) DNA-mediated gene transfer is more efficient during S-phase of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 118:310-316.

Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, Trudeau LE, Aceves J, Martinez-Arguelles DB, Garcia-Villegas R, Jiménez I, Segovia J, Martinez-Fong D (2006a) Neurotensin-polyplex as an efficient carrier for delivering the human gdnf gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther*.

Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, Trudeau LE, Aceves J, Martinez-Arguelles DB, Garcia-Villegas R, Jimenez I, Segovia J, Martinez-Fong D (2006b) Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther* 14:857-865.

Gossen M, Bujard H (1992b) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.

Gossen M, Bujard H (1992a) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.

Gossen M, Bujard H (1993) Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 21:4411-4412.

Gossen M, Bujard H (1995) Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* 19:213-216.

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.

Gully D, Canton M, Boige grain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heaulme M, Leyris R, Brouard A, . (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:65-69.

Gully D, Labeeuw B, Boige grain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud-Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbe-Jullie C, Kitabgi P, Soubrie P, Le FG, Maffrand JP (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 280:802-812.

Hagstrom JE, Ludtke JJ, Bassik MC, Sebestyen MG, Adam SA, Wolff JA (1997) Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18):2323-2331.

Hermans E, Maloteaux JM (1998) Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther* 79:89-104.

Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, Maloteaux JM (1997) Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int* 31:291-299.

Heuser J (1989) Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology. *J Cell Biol* 108:401-411.

Hillen W, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48:345-369.

Hud NV, Vilfan ID (2005) Toroidal DNA condensates: unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34:295-318.

Hwang SJ, Bellocq NC, Davis ME (2001) Effects of structure of beta-cyclodextrin-containing polymers on gene delivery. *Bioconjug Chem* 12:280-290.

Ishii N, Minami N, Chen EY, Medina AL, Chico MM, Kasamatsu H (1996) Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J Virol* 70:1317-1322.

Ishii N, Nakanishi A, Yamada M, Macalalad MH, Kasamatsu H (1994) Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J Virol* 68:8209-8216.

Jans DA, Xiao CY, Lam MH (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22:532-544.

Johnston KM, Connolly JA, van der KD (1986) Inhibition of axonal transport 'in vivo' by a tubulin-specific antibody. *Brain Res* 385:38-45.

Joubert D, van Zyl J, Hawtrey A, Ariatti M (2003) A note on poly-L-lysine-mediated gene transfer in HeLa cells. *Drug Deliv* 10:209-211.

Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* 58:32-45.

Kichler A, Zauner W, Ogris M, Wagner E (1998) Influence of the DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA particles. *Gene Ther* 5:855-860.

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933-10938.

Kitabgi P, Carraway R, Leeman SE (1976) Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem* 251:7053-7058.

Kitabgi P, Carraway R, Van RJ, Granier C, Morgat JL, Menez A, Leeman S, Freychet P (1977) Neurotensin: specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1846-1850.

Kitabgi P, Checler F, Mazella J, Vincent JP (1985) Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm* 5:397-486.

Kitabgi P, Rostene W, Dussaillant M, Schotte A, Laduron PM, Vincent JP (1987) Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur J Pharmacol* 140:285-293.

Kollen W, Erbacher P, Midoux P, Roche AC, Monsigny M, Glick MC, Scanlin TF (1997) Glycosylated polylysines. Nonviral vectors for gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Chest* 111:95S-96S.

KORNGUTH SE, Stahmann MA (1961) Effect of polylysine on the leakage and retention of compounds by Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 21:907-912.

KORNGUTH SE, Stahmann MA, ANDERSON JW (1961) Effect of polylysine on the cytology of Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Cell Res* 24:484-494.

Kulkarni RP, Castelino K, Majumdar A, Fraser SE (2006) Intracellular transport dynamics of endosomes containing DNA polyplexes along the microtubule network. *Biophys J* 90:L42-L44.

Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr JP (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 3:1010-1017.

Labbe-Jullie C, Barroso S, Nicolas-Eteve D, Reversat JL, Botto JM, Mazella J, Bernassau JM, Kitabgi P (1998) Mutagenesis and modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist. *J Biol Chem* 273:16351-16357.

Laduron PM (1995) Functional consequences of retrograde axonal transport of receptor-bound neurotensin. *Trends Pharmacol Sci* 16:338-343.

Lechardeur D, Lukacs GL (2002) Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* 2:183-194.

- Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, Lukacs GL (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 6:482-497.
- Lee SJ, Matsuura Y, Liu SM, Stewart M (2005) Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435:693-696.
- Louise C (2006) Nonviral vectors. *Methods Mol Biol* 333:201-226.
- Ludtke JJ, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA (1999) A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 112 ( Pt 12):2033-2041.
- Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 275:1625-1629.
- Madhusoodanan M, Lazaridis T (2003) Investigation of pathways for the low-pH conformational transition in influenza hemagglutinin. *Biophys J* 84:1926-1939.
- Malendowicz LK, Nussdorfer GG (1994) Modulatory action of neurotensin on the pituitary-adrenocortical function in rats: evidence for an acute dose-dependent biphasic effect. *Life Sci* 55:201-205.
- Marenzi S, Adams RL, Zardo G, Lenti L, Reale A, Caiafa P (1999) Efficiency of expression of transfected genes depends on the cell cycle. *Mol Biol Rep* 26:261-267.
- Martinez-Fong D, Mullersman JE, Purchio AF, rmendariz-Borunda J, Martinez-Hernandez A (1994) Nonenzymatic glycosylation of poly-L-lysine: a new tool for targeted gene delivery. *Hepatology* 20:1602-1608.
- Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I (2000) Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res Brain Res Protoc* 6:13-24.
- Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, varez-Maya I, Meraz MA, Luna J, rias-Montano JA (1999) Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res Mol Brain Res* 69:249-262.

- Mastrobattista E, Koning GA, van BL, Filipe AC, Jiskoot W, Storm G (2002) Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J Biol Chem* 277:27135-27143.
- Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13:1-6.
- Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P, Vincent JP (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16:5613-5620.
- Medina-Kauwe LK, Kasahara N, Kedes L (2001a) 3PO, a novel nonviral gene delivery system using engineered Ad5 penton proteins. *Gene Ther* 8:795-803.
- Medina-Kauwe LK, Maguire M, Kasahara N, Kedes L (2001b) Nonviral gene delivery to human breast cancer cells by targeted Ad5 penton proteins. *Gene Ther* 8:1753-1761.
- Mendez M, Souza F, Nagano M, Kelly PA, Rostene W, Forgez P (1997) High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J Mol Neurosci* 9:93-102.
- Michelhaugh SK, Vaitkevicius H, Wang J, Bouhamdan M, Krieg AR, Walker JL, Mendiratta V, Bannon MJ (2005) Dopamine neurons express multiple isoforms of the nuclear receptor nurr1 with diminished transcriptional activity. *J Neurochem* 95:1342-1350.
- Morris R, Morgan BS, Lewis TM, Pierce KD, Pisano A, Schofield PR (2004) In vivo somatic delivery of plasmid DNA and retrograde transport to obtain cell-specific gene expression in the central nervous system. *J Neurochem* 90:1445-1452.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Muhlhauser P, Muller EC, Otto A, Kutay U (2001) Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* 2:690-696.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759-803.

Nakielny S, Dreyfuss G (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99:677-690.

Navarro-Quiroga I, Antonio Gonzalez-Barrios J, Barron-Moreno F, Gonzalez-Bernal V, Martinez-Arguelles DB, 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 Res Mol Brain Res* 105:86-97.

Nemeroff CB (1986) The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: basic neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 11:15-37.

Neves C, Byk G, Scherman D, Wils P (1999) Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. *FEBS Lett* 453:41-45.

Ogris M, Wagner E (2002) Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat Cell Mol Genet* 27:85-95.

Otis KO, Thompson KR, Martin KC (2006) Importin-mediated nuclear transport in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 16:329-335.

Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 4:581-593.

Pelaprat D (2006) Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides*.

Perales JC, Ferkol T, Molas M, Hanson RW (1994) An evaluation of receptor-mediated gene transfer using synthetic DNA-ligand complexes. *Eur J Biochem* 226:255-266.

Perales JC, Grossmann GA, Molas M, Liu G, Ferkol T, Harpst J, Oda H, Hanson RW (1997) Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 272:7398-7407.

Plank C, Zauner W, Wagner E (1998) Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes. *Adv Drug Deliv Rev* 34:21-35.



Plum GE, Arscott PG, Bloomfield VA (1990) Condensation of DNA by trivalent cations. 2. Effects of cation structure. *Biopolymers* 30:631-643.

Poinot-Chazel C, Portier M, Bouaboula M, Vita N, Pecceu F, Gully D, Monroe JG, Maffrand JP, Le FG, Casellas P (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene *Krox-24*. *Biochem J* 320 ( Pt 1):145-151.

Pouton CW, Seymour LW (1998) Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 34:3-19.

Presland RB, Fleckman P (2005) Tetracycline-regulated gene expression in epidermal keratinocytes. *Methods Mol Biol* 289:273-286.

Read ML, Logan A, Seymour LW (2005) Barriers to Gene Delivery Using Synthetic Vectors. *Adv Genet* 53PA:19-46.

Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 16:35-40.

Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D (2003) Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *Eur J Neurosci* 17:260-270.

Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* 74:167-174.

Sacchetti P, Mitchell TR, Granneman JG, Bannon MJ (2001) *Nurr1* enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J Neurochem* 76:1565-1572.

Savdie C, Ferguson SS, Vincent J, Beaudet A, Stroh T (2006) Cell-type-specific pathways of neurotensin endocytosis. *Cell Tissue Res* 324:69-85.

Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DA (2000) Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 67:598-606.

Schaffer DV, Lauffenburger DA (1998) Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* 273:28004-28009.

Schaffer DV, Lauffenburger DA (2000) Targeted synthetic gene delivery vectors. *Curr Opin Mol Ther* 2:155-161.

Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC (2004) Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:51-70.

Sever S (2002) Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14:463-467.

Sever S, Damke H, Schmid SL (2000) Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 150:1137-1148.

Sever S, Skoch J, Newmyer S, Ramachandran R, Ko D, McKee M, Bouley R, Ausiello D, Hyman BT, Bacskai BJ (2006) Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis. *EMBO J*.

Shier WT, Dubourdieu DJ, Durkin JP (1984) Polycations as prostaglandin synthesis inducers. Stimulation of arachidonic acid release and prostaglandin synthesis in cultured fibroblasts by poly(L-lysine) and other synthetic polycations. *Biochim Biophys Acta* 793:238-250.

Shir A, Ogris M, Wagner E, Levitzki A (2006) EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice. *PLoS Med* 3:e6.

Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG (1995) A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6522-6526.

Souaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P (2006) Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 66:6243-6249.

Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11:391-401.

Swalley SE, Baker BM, Calder LJ, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC (2004) Full-length influenza hemagglutinin HA2 refolds into the trimeric low-pH-induced conformation. *Biochemistry* 43:5902-5911.

Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A, Moghimi SM (2005) Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. *FEBS Lett* 579:6191-6198.

Tanaka K, Masu M, Nakanishi S (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4:847-854.

Tiera MJ, Winnik FO, Fernandes JC (2006) Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives. *Curr Gene Ther* 6:59-71.

Toniatti C, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G (2004) Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther* 11:649-657.

Toy-Miou-Leong M, Bachelet CM, Pelaprat D, Rostene W, Forgez P (2004) NT agonist regulates expression of nuclear high-affinity neurotensin receptors. *J Histochem Cytochem* 52:335-345.

Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 2:718-729.

Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD (1999) Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1445:53-64.

Tyler-McMahon BM, Boules M, Richelson E (2000) Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul Pept* 93:125-136.

Uhl GR, Kuhar MJ, Snyder SH (1977) Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4059-4063.

Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A (2000) Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 113 ( Pt 17):2963-2975.

Varga CM, Wickham TJ, Lauffenburger DA (2000) Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. *Biotechnol Bioeng* 70:593-605.

Vilfan ID, Conwell CC, Sarkar T, Hud NV (2006) Time study of DNA condensate morphology: implications regarding the nucleation, growth, and equilibrium populations of toroids and rods. *Biochemistry* 45:8174-8183.

Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:302-309.

Vogel S, Hoppe J (1986) Polyamines stimulate the phosphorylation of phosphatidylinositol in membranes from A431 cells. *Eur J Biochem* 154:253-257.

Wadhwa MS, Collard WT, Adami RC, McKenzie DL, Rice KG (1997) Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug Chem* 8:81-88.

Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML (1991) Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4255-4259.

Wagner E, Culmsee C, Boeckle S (2005) Targeting of polyplexes: toward synthetic virus vector systems. *Adv Genet* 53:333-354.

Wagner E, Ogris M, Zauner W (1998b) Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 30:97-113.

Wagner E, Ogris M, Zauner W (1998a) Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 30:97-113.

Walther W, Stein U (2000) Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60:249-271.

- Wilke M, Fortunati E, van den BM, Hoogeveen AT, Scholte BJ (1996) Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* 3:1133-1142.
- Wittekindt C, Bottger M, Holtje HD, Schafer-Korting M, Cartier R, Haberland A (2004) Integrin specificity of the cyclic Arg-Gly-Asp motif and its role in integrin-targeted gene transfer. *Biotechnol Appl Biochem* 40:281-290.
- Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohaln J, Ulbrich K (1999) Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem* 10:993-1004.
- Wolff JA, Budker V (2005) The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 54:3-20.
- Yamada M, Bolden-Watson C, Watson MA, Cho T, Coleman NJ, Yamada M, Richelson E (1995) Regulation of neurotensin receptor mRNA expression by the receptor antagonist SR 48692 in the rat midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 33:343-346.
- Yamada M, Yamada M, Lombet A, Forgez P, Rostene W (1998) Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 62:L-80.
- Yarranton GT (1992) Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3:506-511.
- Zauner W, Kichler A, Schmidt W, Mechtler K, Wagner E (1997) Glycerol and polylysine synergize in their ability to rupture vesicular membranes: a mechanism for increased transferrin-polylysine-mediated gene transfer. *Exp Cell Res* 232:137-145.
- Zauner W, Kichler A, Schmidt W, Sinski A, Wagner E (1996) Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection. *Biotechniques* 20:905-913.
- Zeng J, Too HP, Ma Y, Luo ES, Wang S (2004) A synthetic peptide containing loop 4 of nerve growth factor for targeted gene delivery. *J Gene Med* 6:1247-1256.

Zhang G, Budker VG, Ludtke JJ, Wolff JA (2004) Naked DNA gene transfer in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 245:251-264.

Zhang X, Collins L, Sawyer GJ, Dong X, Qiu Y, Fabre JW (2001) In vivo gene delivery via portal vein and bile duct to individual lobes of the rat liver using a polylysine-based nonviral DNA vector in combination with chloroquine. *Hum Gene Ther* 12:2179-2190.

Zhang X, Sawyer GJ, Dong X, Qiu Y, Collins L, Fabre JW (2003) The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct. *J Gene Med* 5:209-218.

## ***Lista de abreviaturas***

AFM = Microscopía de Fuerza Atómica  
Ara-AMP = Adenina arabinósido monofosfato  
BDNF-flag = Factor neurotrófico derivado del cerebro  
Ca<sup>2+</sup> = Calcio  
CD = Dicroísmo circular  
CFP = Proteína cian fluorescente  
Cl<sup>-</sup> = Cloro  
CMV = Citomegalovirus  
Dc =Doxiciclina  
DMEM = Medio Eagle modificado de Dulbecco  
DMSO = Dimetil sulfóxido  
DSRED2 = Proteína roja fluorescente  
DTT = Dithiothreitol  
EDC = 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida Hidrocloruro  
EGF = Factor de Crecimiento Epidérmico  
EMCS = *N*(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida  
FITC = Fluoresceína  
GAPs = Proteínas activadoras de GTPasa  
GEFs = Factores de intercambio de nucleótidos de guanina  
GFP = Proteína verde fluorescente  
GPCRs = Receptores acoplados a la proteína G  
hnRNP-A1 = Ribonucleoproteína heterogénea  
HRV2 = Rinovirus Humano 2  
HRV14 = Rinovirus Humano 14  
IP3 = Inositol 1,4,5-trisfosfato  
*Kd* = Constante de afinidad  
LC-SPDP = N-succinimidil-3-[2-[piridilditio]propionato  
LDH = Lactato deshidrogenada  
MM = Masa Molecular  
MTT = (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro)  
NGF = Factor de Crecimiento Nervioso  
NLS = Señal de Localización Nuclear

NLS<sup>T</sup> = Señal de Localización Nuclear del Antígeno T del SV40

NPC = Complejo del Poro Nuclear

NT = Neurotensina

NTRs = Receptores de la Neurotensina

NTS1 = Receptor de alta afinidad de neurotensina

PBS = Solución balanceada de fosfatos

P<sub>CMV</sub> = Promotor del citomegalovirus

pDNA = DNA plasmídico

PEG = Poly(ethylene glycol)

PF = Péptido Fusogénico

phDAT = Promotor del Transportador de Dopamina humano

PK = Péptido Kariofílico

PLC = Fosfolipasa C

PLL = Poli-L-lisina

P<sub>minCMV</sub> = Promotor mínimo del CMV

P<sub>minCMVΔ</sub> = Promotor CMV mínimo alterado

RAP = Proteína asociada a receptor

SBF = Suero Bovino Fetal

SMPB = Succinimidil-4-[*p*-maleimidofenil]butyrato

SNC = Sistema Nervioso Central

SNC = Sustancia Negra compacta

Tc = Tetraciclina

TEM = Microscopía de Transmisión Electrónica

TGN = Trans-Golgi Network

TH = Tirosina hidroxilasa

tetO = Operador Tet

TetR = Elemento Regulador de Tetraciclina de los procariontes

TM = Trans-membranal

TRE = Elemento de respuesta a tetraciclina

TRE<sub>mod</sub> = Elemento TRE modificado

Trp = Triptofano rTetR = Elemento regulador reverso de la tetraciclina

rtTA = Trans-activador reverso controlado por tetraciclina

VTA = Área ventral tegmental

WGA = Aglutinina de Germen de Trigo



## ***Lista de Figuras y tablas***

**Figura 1:** Barreras intracelulares para los vectores no virales

**Figura 2:** Esquema de regulación de la expresión de genes por el sistema pTet-Off y pTet-On

**Figura 3:** Esquema de los plásmidos

**Figura 4:** Esquema de los plásmidos

**Figura 5:** Síntesis del NT-vector:[<sup>125</sup>I]-NT-[<sup>3</sup>H]-PF-SPDP-PLL

**Figura 6:** Análisis electroforético de la interacción de los componentes del NT-poliplex

**Figura 7:** Análisis de microscopía electrónica en la formación del NT-poliplex

**Figura 8:** Efecto del pH en la estabilidad del NT-poliplex

**Figura 9:** Determinación de la relación molar óptima del NT-poliplex

**Figura 10:** Habilidad del NT-poliplex para transfectar dos diferentes plásmidos simultáneamente

**Figura 11:** Efecto del NT-poliplex en la viabilidad celular

**Figura 12:** Envío dirigido del transgén pDAT-BDNF-flag por la ruta retrógrada

**Figura 13:** Liberación local del transgén EGFP

**Figura 14:** Efectividad del promotor tejido específico hDAT.

**Figura 15:** Inducción de la expresión de la proteína DsRed2

**Figura 16:** Inducción de la expresión de la proteína DsRed2 por el NT-poliplex

**Figura 17:** Análisis electroforético de la interacción secuencial de los componentes del NT-poliplex auto-ensamblado

**Figura 18:** Análisis de microscopía electrónica en la formación del NT-poliplex auto-ensamblado.

**Figura 19:** Participación de la endocitosis del receptor de alta afinidad a la neurotensina en la transferencia génica del NT-poliplex auto-ensamblado.

**Figura 20:** Eficiencia de transfección del NT-poliplex auto-ensamblado.

**Tabla 1:** Grupos de lipoplexes del sistema regulable pTetOn - con pTRE-Tight-DsRed2

**Tabla 2:** Contribución y proporción de los componentes del NT-vector en su masa molecular

**Tabla 3:** Grupos del NT-poliplex del sistema regulable pTetOn con pTRE-Tight-DsRed2