



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

GENERACIÓN DE VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADOS EN EL SISTEMA
CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS PARA EL TRATAMIENTO
DE LA HIPERAMONEMIA CRÓNICA POR MEDIO DE TERAPIA GÉNICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

LAURA SEVILLA TAPIA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MIGUEL ÁNGEL TORRES VEGA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTÍZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2018



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.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera; así como en el Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría del Dr. Miguel Ángel Torres Vega.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico a través de la beca CONACyT 379172. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT proyecto IN223210 y IT2003

DEDICATORIA

A mi madre,
aunque pienses que no valoro tus esfuerzos;
siempre has sido y serás un ejemplo de lucha
incansablemente para lograr todas mis metas.

y

A aquellas personas que llegaron a mi vida y le dieron un nuevo sentido.
A aquellas personas que reconocí desde el primer instante y que pasaron a
formar parte importante de mi mundo, sin importar ni el tiempo ni la distancia y
de las que he aprendido y seguramente seguiré aprendiendo grandes
enseñanzas.

“Todo mundo puede hacer magia..., todo mundo puede alcanzar sus metas si es capaz de pensar, si es capaz de esperar, si es capaz de ayunar.”

Siddharta, cuento indú

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de forjarme dentro de sus instalaciones desde una etapa muy temprana de mi formación académica, ofreciéndome siempre instalaciones y profesores de excelencia. En esta ocasión, quiero agradecer especialmente al Instituto de Biotecnología por formar profesionales comprometidos con el desarrollo de nuestro país.

A la Dra. Laura Alicia Palomares por brindarme su confianza y permitirme ingresar a su laboratorio. Gracias por el apoyo incondicional que me ha brindado. Gracias por ser un ejemplo de vida y desarrollo profesional.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por las anécdotas y los consejos que comparte con todos los integrantes de su grupo. Gracias por inculcarnos una visión de superación constante.

Al Dr. Miguel Ángel Torres Vega por confiar en mí desde un inicio y por compartir sus conocimientos con gran paciencia. Gracias por brindarme su amistad.

Al Dr. Carlos Arias López por las observaciones y recomendaciones hechas en cada una de las etapas de este trabajo.

A cada uno de los integrantes del jurado evaluador: Dr. Agustín López Munguía Canales, IBT; Dr. Jean Louis Charli Casalonga, IBT; Dr. Tomás David López Díaz, IBT; Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa, INSP; Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, IBO por aceptar revisar esta tesis y por sus valiosas observaciones y comentarios.

Al cuerpo técnico y administrativo del laboratorio Palomares-Ramírez: MC Vanessa Hernández, MC Martha Alicia Contreras, Biól. Rosa Román, MC Violeta Guadarrama, Biól. Larissa Campos, Karin Levy; en especial a la MC. Ruth Pastor Flores por su invaluable apoyo y enseñanzas.

A Antonio Bolaños y Gloria Villa de la unidad de docencia por todo su apoyo y compromiso con los estudiantes. A Adrián por brindarnos un servicio de excelencia que nos permite llegar salvos todas las noches a nuestras casas.

A los amigos que hice en esta etapa de mi vida: Wendy, Alma, Osvaldo, Ángel, Carolina y todos mis amigos del grupo GPR (Albert, Karina, Jaqui, Paz, Gonzalo, Víctor, David y Davidcito) con quienes compartí largas jornadas de trabajo y con su entusiasmo las hicieron más amenas. Al grupo de trabajo LT01 porque en muy poco tiempo me acogieron como parte de su equipo y de quienes aprendí mucho.

A todos ustedes mil gracias porque me brindaron sus conocimientos y me permitieron crecer tanto académica como personalmente. Me llevo sus enseñanzas y espero aplicarlas en beneficio de nuestra sociedad Mexicana.

A mi madre por todo su esfuerzo, por su paciencia y por estar siempre acompañándome y preocupándose por mi bienestar.

I. ÍNDICE

II. ÍNDICE DE FIGURAS	III
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
IV. ABREVIATURAS.....	V
V. GLOSARIO	VIII
VI. RESUMEN.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 EL AMONIO Y SU METABOLISMO	3
2.2 GLUTAMINA SINTETASA (GS)	4
2.3 ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA (EH)	6
2.4 TERAPIA GÉNICA	6
2.5 VIRUS ADENO-ASOCIADOS (VAA)	7
2.5.1 Genoma de los VAA	8
2.5.2 Proteínas estructurales de los VAA	9
2.5.3 Proteínas no estructurales	10
2.5.4 Ciclo infeccioso de los VAA.....	10
2.5.5 Replicación y expresión del genoma	13
2.6 LOS VAA Y SU UTILIZACIÓN EN LA TERAPIA GÉNICA	14
2.7 PRODUCCIÓN DE LOS VECTORES DE VAA (vVAA)	15
2.7.1 Componentes del sistema células de insecto-baculovirus (SCI-BV).....	17
2.7.2 Producción de vVAA en el SCI-BV	18
2.8 vVAA Y SU USO EN TRATAMIENTOS DE TERAPIA GÉNICA	21
2.9 TERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DE HIPERAMONEMIAS	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
5.1 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS (VEB)	26
5.1.1 Plásmidos.....	26
5.1.2 Generación de los bácmidos recombinantes.....	27
5.1.3 Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR punto final.....	28
5.1.4 Cultivo de células Sf9.....	29
5.1.5 Transfección de células de insecto con los bácmidos recombinantes.....	29
5.1.6 Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales.....	30
5.1.7 Propagación de stocks virales a partir de placas aisladas.....	31
5.1.8 Determinación de títulos virales para baculovirus	31
5.1.9 Cuantificación de proteína	32
5.1.10 Western Blot.....	32
5.1.11 Dot Blot	33
5.2 PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE vVAA	34
5.2.1 Producción de vectores de VAA (vVAA)	34
5.2.2 Recuperación de cápsides de vVAA	34
5.2.3 Purificación de cápsides de VAA por gradientes de Iodixanol	34
5.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	35

5. 2. 5 Cuantificación de genomas encapsidados	35
5. 3 EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE LOS vVAA.....	37
5. 3. 1 Cultivo de células H9c2.....	37
5. 3. 2 Transducción de miotubos con los vVAA	37
5. 3. 3 Manejo de animales de laboratorio	37
5. 3. 4 Transducción in vivo con los vVAA.....	38
5. 3. 5 Ligadura del conducto biliar (LCB)	38
5. 3. 6 Toma de muestras sanguíneas a ratas Wistar.....	39
5. 3. 7 Desproteínización del plasma sanguíneo	39
5. 3. 8 Determinación de amonio.....	40
5. 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1.1 GENERACIÓN DE LOS BÁCMIOS RECOMBINANTES BAC REP-CAP 2/1 Y BAC REP-CAP 2/8	42
6.1.2 Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR punto final	42
6.1.3 Generación de los baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8.....	46
6. 2. 1 PRODUCCIÓN DE vVAA.....	50
6.2.2 Recuperación y purificación de las cápsides de los vVAA.....	52
6.2.3 Identificación de partículas de los vVAA a través de MET.....	55
6.2.4 Cuantificación de genomas encapsidados	57
6.3.1 DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS/MIOTUBOS MURINOS.....	59
6.3.2 Transducción in vitro con los vectores de VAA	62
6.3.3 Expresión de la GS en células transducidas con los vVAAGS	66
6.4 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE HIPERAMONEMIA CRÓNICA EN RATAS WISTAR	69
6.4.1 Transducción in vivo con los vectores de VAA.....	73
6.4.2 Niveles de amonio en ratas transducidas con los vVAA y con LCB.....	75
7. CONCLUSIONES.....	78
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
10. APÉNDICES.....	89
APÉNDICE I. MAPAS DE LOS DIFERENTES PLÁSMIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO.....	89
APÉNDICE II. ARTÍCULO GENERADO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.....	91

II. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. METABOLISMO Y TRÁFICO INTER ÓRGANO DEL AMONIO.	4
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA GLUTAMINA SINTETASA (GS) HUMANA Y LA REACCIÓN QUE CATALIZA.....	5
FIGURA 3. TIPOS DE VECTORES USADOS EN TRATAMIENTOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA.	7
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA CÁPSIDE DE UN VAA.	8
FIGURA 5. GENOMA DE DNA DE CADENA SENCILLA DE UN VAA.	9
FIGURA 6. PRINCIPALES EVENTOS EN LA INFECCIÓN PRODUCTIVA DE UN VAA.....	12
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA REPLICACIÓN DEL GENOMA Y EMPAQUETAMIENTO DE UN VAA.	14
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS COMPONENTES BÁSICOS PRESENTES EN UN INSERTO GÉNICO EMPAQUETADO DENTRO DE LOS VECTORES DE VAA.	15
FIGURA 9. CICLO DE VIDA DE UN BACULOVIRUS.....	17
FIGURA 10. ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE VVAA USANDO EL SISTEMA BAC TO BAC (INVITROGEN).	19
FIGURA 11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.	25
FIGURA 12. LIGADURA DOBLE DEL CONDUCTO BILIAR.....	39
FIGURA 13. COLONIAS BACTERIANAS DH10BAC TRANSFORMADAS CON: A) PSR651 Y B) PSR660..	42
FIGURA 14. AMPLIFICACIÓN POR PCRS DE COLONIA EN DH10BAC TRANSFORMADAS CON PSR651 Y PSR660.	43
FIGURA 15. REGIÓN DE TRANSPOSICIÓN DE LOS GENES REP-CAP.	44
FIGURA 16. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN <i>REP</i> DE LOS BÁCMIOS BAC REP-CAP 2/1 Y BAC REP-CAP 2/8.	44
FIGURA 17. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES <i>CAP1</i> Y <i>CAP8</i> PRESENTES EN LOS BÁCMIOS BAC REP- CAP 2/1 Y BAC REP-CAP 2/8.....	45
FIGURA 18. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE COLONIAS DH10BAC TRANSFORMADAS CON LOS PLÁSMIDOS PSR651 Ó PSR660.	46
FIGURA 19. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES BAC REP-CAP 2/1 Y BAC REP- CAP 2/8.	48
FIGURA 20. PRESENCIA DE CÁPSIDES DE VAA ENSAMBLADAS.	50
FIGURA 21. CARACTERIZACIÓN DE LOS VVAA1 Y VVAA8 PURIFICADOS POR GRADIENTES DISCONTINUOS DE IODIXANOL.....	54
FIGURA 22. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LOS VECTORES DE VAA OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO	56
FIGURA 23. PERFILES DE AMPLIFICACIÓN Y CURVAS ESTÁNDARES DE CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA PARA LOS VVAA.	58
FIGURA 24. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS H9C2 (MIOBLASTOS/MIOTUBOS DE RATA).....	60
FIGURA 25. EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS H9C2 DIFERENCIADAS PARCIALMENTE Y TRANSDUCIDAS CON VVAA1-GFP	64
FIGURA 26. EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS H9C2 DIFERENCIADAS Y TRANSDUCIDAS CON VVAA8-GFP.....	65
FIGURA 27. EXPRESIÓN DE LA GS EN MIOTUBOS TRANSDUCIDOS CON LOS VECTORES VAA1 GS+..	67
FIGURA 28. EXPRESIÓN DE LA GS EN MIOTUBOS TRANSDUCIDOS CON LOS VECTORES VAA8 GS+..	68
FIGURA 29. NIVELES DE AMONIO PLASMÁTICO INDUCIDOS POR LA LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR (LCB). 70	
FIGURA 30. DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR LA LIGADURA DOBLE DEL CONDUCTO BILIAR..	72
FIGURA 31. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA LA TRANSDUCCIÓN <i>IN VIVO</i> CON LOS VVAA EN EL MODELO DE LCB.....	74
FIGURA 32. NIVELES DE AMONIO EN SANGRE DE RATAS WISTAR CON LCB Y TRANSDUCIDAS CON A) VECTORES DE VAA1 Y B) VECTORES DE VAA8.	75
FIGURA 33. PLÁSMIDOS PSR651 Y PSR660.....	89
FIGURA 34. PLÁSMIDOS PFBGSC2 Y PFBGR.	90

III. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MOLÉCULAS RECEPTORAS Y CO RECEPTORAS IMPLICADAS EN EL RECONOCIMIENTO Y LA ENDOCITOSIS DE LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE VAA	11
TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA AMPLIFICAR DIFERENTES REGIONES DE LOS GENES <i>REP2</i> , <i>CAP1</i> Y <i>CAP8</i> A TRAVÉS DE PCR PUNTO FINAL.	29
TABLA 3. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y DE LAS SONDAS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GENOMAS ENCAPSIDADOS A TRAVÉS DE QPCR TIEMPO REAL.	36
TABLA 4. BACULOVIRUS RECOMBINANTES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO Y SU TÍTULO VIRAL.	48
TABLA 5. COINFECCIONES DE CÉLULAS Sf9 CON LOS DIFERENTES BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS VECTORES DE VAA1 Y VAA8	51
TABLA 6. RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS VECTORES DE VAA DEL SEROTIPO 1 Y 8, CUANTIFICADOS POR NÚMERO DE GENOMAS.	58
TABLA 7. NÚMERO DE GENOMAS/CÉLULA (GV/CÉL) DE CADA UNO DE LOS VECTORES DE VAA UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	62
TABLA 8. NÚMERO DE GENOMAS DEL VECTOR DE VAA POR RATA (GV/RATA) UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	77

IV. ABREVIATURAS

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Mono-Núcleo Poliedrovirus
ATP	Adenosín Trifosfato
BacGFP	Baculovirus recombinante con el gen de la proteína reportera GFP
BacGS	Baculovirus recombinante con el gen de la GS
Bac Rep-Cap 2/1	Baculovirus recombinante con el gen de las proteínas Rep 78 y Rep52 del VAA-2 y con el gen de las VPs del VAA-1
Bac Rep-Cap 2/8	Baculovirus recombinante con el gen de las proteínas Rep 78 y Rep52 del VAA-2 y con el gen de las VPs del VAA-8
CCI	Concentración Celular al momento de la Infección
cél	Célula
CINVA	Comité de Investigación en Animales
CMV	Citomegalovirus
Ct	Ciclo umbral
DE	Desviación estándar
DEN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dsDNA	DNA de doble cadena
ssDNA	DNA de una sola cadena
E.C.	Comisión enzimática
eGFP	Proteína verde fluorescente potenciada
EH	Encefalopatía hepática
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos, EUA
GFP	Proteína verde fluorescente
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GS	Glutamina sintetasa
gv	Genomas del vector
hpi	horas post-infección
HSV	Virus del Herpes simple
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

ISHEN	Sociedad Internacional de Encefalopatía Hepática y Metabolismo del Nitrógeno
ITR	Repeticiones terminales invertidas
kb	kilobases
LB	medio Luria Bertani
MDI	Multiplicidad de infección
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mRNA	RNA mensajero
MTT	bromuro de 3-(4,6-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
MWCO	Peso molecular de corte
NIH	Institutos Nacionales de Salud, EUA
NLS	Señal de localización nuclear
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	Amortiguador de fosfatos-Solución salina
PBS-MK	PBS con 1 mM MgCl ₂ y 2.5 mM KCl
PBS-T	PBS con 0.1% Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativo
PLA2	Fosfolipasa A2
polh	promotor de poliedrina
RBE	Elementos de unión a Rep
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rx	reacción
SCI-BV	Sistema células de insecto baculovirus
SDS	Dodecil-Sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-SDS
SFB	Suero fetal bovino
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica
SV40	Virus vacuolado de simio 40
TDC	Tiempo de cosecha
TRS	Sitio de resolución terminal
Tm	Temperatura de fusión
Tn	Transposón

U	Unidades enzimáticas
ufp	Unidades formadoras de placa
VAA	Virus adeno-asociado
VAA-1	Virus adeno-asociado del serotipo 1
VAA-2	Virus adeno-asociado del serotipo 2
VAA-8	Virus adeno-asociado del serotipo 8
VEB	Vector de expresión de baculovirus
VPs	Proteína Vírica, proteínas de la cápside de los virus adeno-asociados
vVAA	Vector de virus adeno-asociado
xg	Gravedades

V. GLOSARIO

Ad libitum. Término que significa a voluntad, hace referencia a que la comida y agua se deja de forma permanente, permitiendo que los animales se alimenten a voluntad.

Bácmido. Genoma recombinante de un baculovirus que contiene un replicón mini-F, un marcador de resistencia a kanamicina y un sitio diana (*attTn7*) para el transposon bacteriano Tn7.

Baculovirus. Familia de virus de DNA de doble cadena que tienen como hospederos diversos insectos.

Bilis: Sustancia líquida amarillenta, amarronado o de color verde oliva, producida por el hígado de muchos vertebrados. Interviene en los procesos de digestión funcionando como emulsionante de los ácidos grasos. Contiene sales biliares, proteínas colesterol, hormonas y agua.

Coleostasis: Detención del flujo de la bilis desde la vesícula biliar donde se almacena hacia el duodeno.

Elementos reguladores en cis. Son regiones no codificantes del DNA que regulan la transcripción de genes cercanos. Estos elementos reguladores se encuentran en las proximidades del gen o genes que regulan. Normalmente regulan la transcripción de genes al funcionar como sitios de unión para factores de transcripción.

Elementos reguladores en trans. Son genes que pueden modificar o regular la expresión de genes distantes. En general son secuencias de DNA que regulan factores de transcripción.

Esteatosis: Acumulación de grasa en el tejido hepático.

Estupor: Estado de inconsciencia parcial, con inactividad mental aparente y con reducida capacidad de reacción a los estímulos. La persona se inmoviliza, perdiendo el movimiento voluntario.

Gen. Unidad estructural y funcional fundamental, secuencia en el DNA compuesta por una región reguladora y una región que se transcribe como una sola unidad.

In vitro. Término que se aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente, aislados del conjunto del organismo.

Letargia: Es una condición de somnolencia o indiferencia que usualmente es signo de fatiga crónica o debilidad después de una prolongada enfermedad. Se manifiesta en el cuerpo con la pérdida de la fuerza muscular a consecuencia de la extrema relajación.

Multiplicidad de infección (MOI): se refiere al número de virus infecciosos añadidos a un cultivo por cada célula y se expresa en unidades formadoras de placa por célula (ufp/cél).

Parvovirus: Representa toda una familia de virus de DNA lineal de cadena sencilla, con un genoma de alrededor de 5 Kb.

Plásmido. Molécula de DNA circular, autónoma y extracromosómica, capaz de replicarse de manera independiente del genoma bacteriano dentro de una bacteria. Son portadores de genes de resistencia a antibióticos. Se convierten en vectores de clonación cuando son reestructurados para contener un origen de replicación, un gen marcador (por lo general el de resistencia a un antibiótico), así como sitios de restricción únicos para poder insertar otros fragmentos de DNA.

Sarcopenia. Pérdida de masa muscular.

Serotipo: Reactividad de ciertos anticuerpos antivirales contra proteínas virales.

Transaminación: Reacción enzimática donde se traspa el grupo amino desde un α - aminoácido a un α -cetoácido, convirtiéndose el primero en un α -cetoácido y el segundo en un α - aminoácido. Las enzimas que catalizan estas reacciones son las transaminasas.

Transducción: Transferencia de material genético exógeno a través de un vector viral.

Transfección: Término general usado para referirse a la introducción de material genético exógeno al interior de una célula eucariota.

Transformación: Proceso de introducción de DNA recombinante manipulado in vitro en una célula bacteriana para su propagación, identificación y aislamiento.

Transgen. Gen exógeno que se ha introducido en el genoma de otro organismo.

Translocación: Mutación cromosómica en la que se transfiere una parte del material genético de un cromosoma a otro no homólogo.

Transposasa. Enzima encargada de llevar a cabo los eventos de transposición.

Transposón (Tn): Elemento transponible. Secuencia discreta del genoma que se mueve por sí mismo hacia otras localizaciones dentro del genoma

Tropismo: Término usado en virología para definir la afinidad de un virus por un tejido hospedero en particular. El tropismo es determinado principalmente por la expresión de moléculas específicas (receptores celulares) en la superficie de las células del tejido a las cuales se une el virus.

Vectores de expresión de baculovirus (VEB). Es uno de los sistemas de Expresión eucariótico más poderosos y versátiles disponibles en la actualidad, que usa baculovirus recombinantes para expresar una amplia gama de genes

heterólogos de diferentes fuentes incluyendo virus, bacterias, hongos, plantas en células de insecto.

Vector viral. Actualmente son las herramientas más prometedoras para introducir directamente un gen exógeno a una célula. Entre los virus más utilizados con este fin están los virus del herpes simple (VHS), los adenovirus, lentivirus y surgiendo con gran auge, los virus adeno-asociados (VAA).

VI. RESUMEN

La hiperamonemia es una condición presente en los pacientes con desórdenes del ciclo de la urea o algún tipo de falla hepática, la cual puede causar complicaciones neuro-psiquiátricas que se conocen como encefalopatía hepática, que en el peor de los casos resulta en daño cerebral, coma o muerte. Existen diversos tratamientos para la hiperamonemia pero tienen una eficiencia limitada, efectos adversos y costos elevados. Por ello, la terapia génica es una alternativa prometedora que exploramos a lo largo de este trabajo. A través de vectores de virus adenoasociados (vVAA) buscamos entregar el gen de la glutamina sintetasa (GS), una de las principales enzimas involucradas en el manejo del amonio, hacia el músculo esquelético y usar este órgano como plataforma de expresión de la GS. Los vVAA de los serotipos 1 y 8 portando el gen de la GS (vVAA1 GS+ y vVAA8 GS+), se produjeron a través del sistema células de insecto-baculovirus (SCI-BV), se caracterizaron y se probaron tanto *in vitro* como *in vivo*. Para evaluar los vVAA *in vitro*, se diferenciaron parcialmente células mioblásticas hacia miotubos. La transducción de los miotubos con los vVAA GS+, tanto del serotipo 1 como del 8, generó la sobre expresión de la GS. Para evaluar los vVAA GS+ *in vivo*, se generó un modelo en rata de hiperamonemia crónica a través de la ligadura doble del conducto biliar (LCB). Las ratas fueron transducidas con los vVAA mediante la inyección intramuscular de los vectores. Se observó una tendencia a la disminución del amonio en aquellas ratas transducidas con los vVAA GS+ tanto del serotipo 1 como del serotipo 8. Estos resultados muestran que la entrega génica para sobre expresar la GS en tejido muscular es una alternativa prometedora para el tratamiento de la hiperamonemia crónica. Como resultado de este trabajo, se publicó un artículo en una revista internacional indexada que se incluye en la sección de apéndices.

1. INTRODUCCIÓN

El amonio es un compuesto tóxico que se genera de forma natural en nuestro organismo, a partir del metabolismo de compuestos nitrogenados como los aminoácidos y los nucleótidos. El hígado es el principal órgano encargado de la detoxificación de este compuesto. Sin embargo, cuando existe alguna falla hepática, los niveles de amonio comienzan a incrementarse en la sangre. El amonio excedente puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, en donde sus efectos neurotóxicos desencadenan un conjunto de síntomas neuropsiquiátricos y motores conocidos como encefalopatía hepática (EH).

La EH representa un serio problema de salud que va en aumento. Tan sólo en EU, entre los años 2005 y 2009, se reportaron más de 23 000 casos/año de EH considerada como severa y que requirieron hospitalización para su tratamiento (Stepanova *et al.*, 2012). En nuestro país, un análisis sobre la tendencia de las enfermedades hepáticas ha previsto que para el año 2020 existirán alrededor de 1.5 millones de casos de hepatopatías crónicas susceptibles de padecer EH (Méndez-Sánchez *et al.*, 2005). Las personas con este padecimiento presentan trastornos de atención y concentración, afectaciones psicomotoras, deterioro de la memoria y del aprendizaje, limitándolos para realizar cualquier tipo de trabajo que requiera de una destreza manual e intelectual. Todo ello afecta no sólo su calidad de vida, sino también su nivel socioeconómico y su ambiente familiar, pues además de no contar con un ingreso económico estable, consumen buena parte del presupuesto familiar al requerir de medicamentos y cuidados especiales. Cabe mencionar que, en los casos más severos de EH, el paciente puede llegar a morir.

Actualmente no existe cura para la EH, principalmente porque resulta ser una enfermedad multifactorial. No obstante, se considera al amonio como el principal factor precipitante de este padecimiento; por ello, muchos de los tratamientos actuales buscan disminuir los niveles de amonio plasmático y cerebral, con el propósito de mermar los síntomas y el riesgo de muerte asociados a este padecimiento. Sin embargo, estos tratamientos resultan ser costosos y no evitan las recaídas de los pacientes o bien, les generan efectos

secundarios. Por lo tanto, existe una ineficacia en los tratamientos de esta enfermedad. Una alternativa a este padecimiento es el trasplante hepático. Sin embargo, esta opción está limitada por la disponibilidad de donadores; además, trae consigo riesgos de morbilidad y mortalidad. Por ello, es evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que ofrezcan mejores opciones a los pacientes. Una de estas alternativas es el uso de la terapia génica.

En este trabajo buscamos generar las bases para un tratamiento novedoso de la hiperamonemia crónica en falla hepática a través de la terapia génica. Esencialmente, queremos entregar a través de un **vector viral**, el gen terapéutico de la glutamina sintetasa (GS) hacia el músculo esquelético. Debido a la gran extensión de este tejido, a su fácil accesibilidad y porque contiene las proteínas accesorias necesarias, es que proponemos usarlo como una plataforma de expresión de la GS, enzima encargada de convertir el amonio en glutamina (Gln), el principal aminoácido para el manejo del amonio dentro del organismo. La elección de este tejido también se hizo pensando que en los pacientes con EH, el hígado ya no es un órgano funcional, por lo cual no tendría sentido usarlo como órgano blanco para la terapia. Además, se ha reportado en pacientes con hiperamonemia crónica, que el amonio se metaboliza eficientemente en el músculo, aunque de manera insuficiente. En cierta medida, buscamos potenciar la capacidad detoxificadora del músculo.

Para lograr la entrega del gen de la GS al músculo esquelético, elegimos serotipos específicos de los virus adenoasociados (VAA) que presentan un **tropismo** hacia este tejido. Asimismo, se ha reportado que los genes entregados por los vectores de VAA, permanecen transcripcionalmente activos por varios meses e incluso años, lo que nos favorecería para tratar una hiperamonemia crónica. Una vez en las células musculares, esperamos que el **transgen** logre una sobre-expresión de la GS y así, los niveles de amonio en la circulación y por consecuencia en el cerebro, se vean reducidos significativamente. De esta forma, consideramos que si logramos potenciar la función detoxificadora del amonio por parte del músculo utilizando los VAA recombinantes con el gen de la GS, entonces podríamos presentar esta terapia génica como una alternativa prometedora para el manejo de la hiperamonemia crónica.

2. ANTECEDENTES

2.1 EL amonio y su metabolismo

El amonio (NH_4^+) es un compuesto tóxico. La toxicidad del amonio no está totalmente entendida; sin embargo, se sabe que tiene efectos adversos a nivel celular y sistémico. Algunas de las teorías más aceptadas indican que a nivel celular, este compuesto altera el pH e interfiere con las funciones de transporte de las membranas celulares; genera alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos y el energético, principalmente porque el metabolismo del amonio agota intermediarios del ciclo de Krebs y al NADH, lo cual conduce a un déficit de ATP (Felipo & Butterworth, 2002). A nivel sistémico, el amonio genera anomalías en el metabolismo de diversos neurotransmisores, induce estrés oxidante e inflamación, afectando a diversos órganos como el cerebro, músculo, riñón, hígado, pulmón y corazón (Dasarathy *et al.*, 2016).

El amonio se origina a partir de varias fuentes en el organismo. El 60% proviene del metabolismo de la glutamina (Gln) y la **transaminación** de otros aminoácidos; así como de la degradación de nucleótidos; por tanto, se produce de forma natural en todos los tejidos. El 40% restante se genera a partir de varias fuentes: 1) el intestino, por medio de la degradación de sustancias proteicas provenientes de la dieta; 2) la acción de las glutaminasas ya sean intestinales, renales o hepáticas y 3) la acción de ureasas bacterianas, presentes en la microbiota colónica (Figura 1), (Córdoba & Mínguez, 2008; Lemberg & Fernández, 2009; Andeva *et al.*, 2012).

Para poder ser eliminado en condiciones normales, el amonio es transportado a través de la circulación portal hacia el hígado, en donde el 80% de este compuesto es detoxificado a través del ciclo de la urea por los hepatocitos periportales. Finalmente, la urea es canalizada al riñón, donde se excreta del organismo a través de la orina (Figura 1). El 20% del amonio remanente que escapó de los hepatocitos periportales, es convertido a Gln por la actividad de la glutamina sintetasa (GS), que se expresa en los hepatocitos perivenosos. Por consiguiente, para una completa remoción del amonio se requieren ambos sistemas, que funcionan anatómicamente y funcionalmente en secuencia en el hígado (Häussinger, 1990). Sin embargo, cuando existen lesiones hepáticas agudas o crónicas inducidas por una infección viral, la acumulación de grasa o

la ingesta de alcohol; que conducen al desarrollo de hepatopatías como hepatitis, cirrosis hepática o hepatocarcinoma, los niveles de amonio en sangre comienzan a incrementarse, debido a la falla del hígado para llevar a cabo una correcta detoxificación.

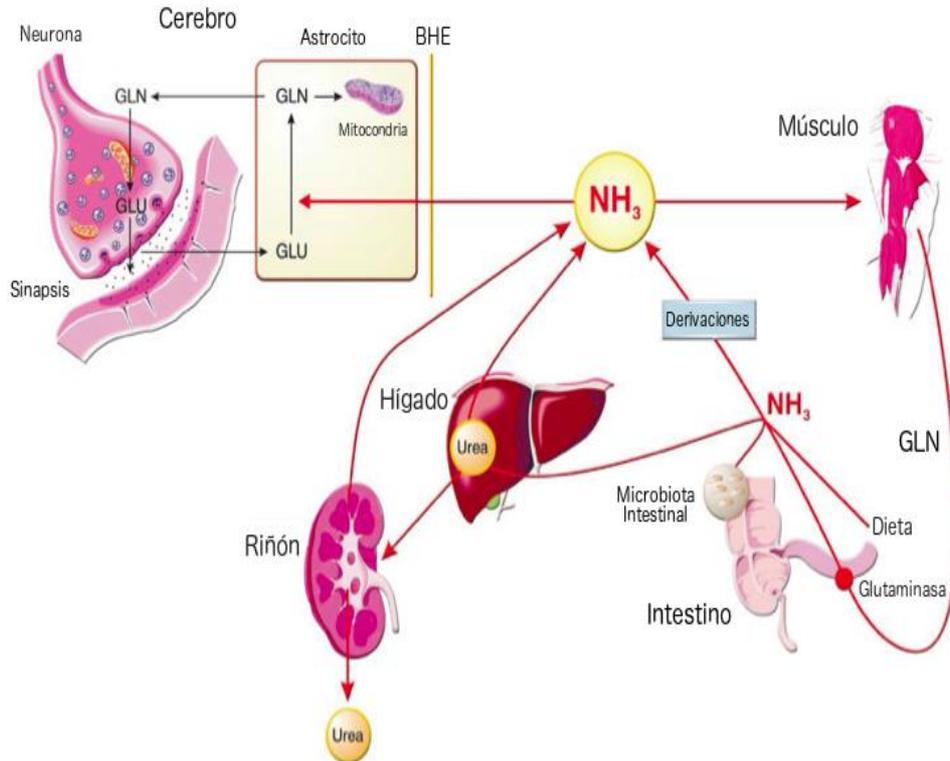


Figura 1. Metabolismo y tráfico inter órgano del amonio. Existe un complejo entramado de órganos encargados de mantener un equilibrio entre la producción y la eliminación del amonio. Cuando esta homeostasis se ve alterada, el amonio comienza a incrementarse en sangre y puede generar daños irreversibles en el organismo. El cerebro es uno de los principales órganos dañados por este compuesto, ya que el amonio logra atravesar la barrera hematoencefálica y genera daños en los astrocitos y en la comunicación neuronal. GLN: Glutamina, GLU: Glutamato, BHE: Barrera Hematoencefálica. Tomado de Córdoba y Mínguez, 2008.

2.2 Glutamina sintetasa (GS)

La glutamina sintetasa (GS; E.C. 6.1.3.2, también conocida como γ -glutamil: amonio ligasa), es una enzima citosólica que se encuentra presente en todos los organismos y, en todos ellos, juega un papel relevante en el manejo del amonio. La GS humana está conformada por dos anillos pentaméricos, apilados uno sobre otro (Figura 2a). Dentro de cada anillo pentamérico (Figura 2b), una subunidad interactúa con la subunidad adyacente y la interfaz que se forma entre ellas conforman un centro catalítico, integrando un total de 10 centros catalíticos por molécula de GS (Krajewski *et al.*, 2008).

La GS cataliza la conversión de glutamato y amonio hacia glutamina, de forma dependiente de ATP, reacción que tiene lugar en dos pasos. En el primer paso, el ATP se une a la GS, induciendo un cambio conformacional que permite que el glutamato se una. Una vez que está unido el Glu, el ATP reacciona con el Glu para formar ADP y el intermediario γ - glutamil-fosfato. En un segundo paso, se une un ion de amonio y reacciona con el γ -glutamil-fosfato para producir glutamina y fosfato inorgánico (Figura 2c) (Meister, 1985).

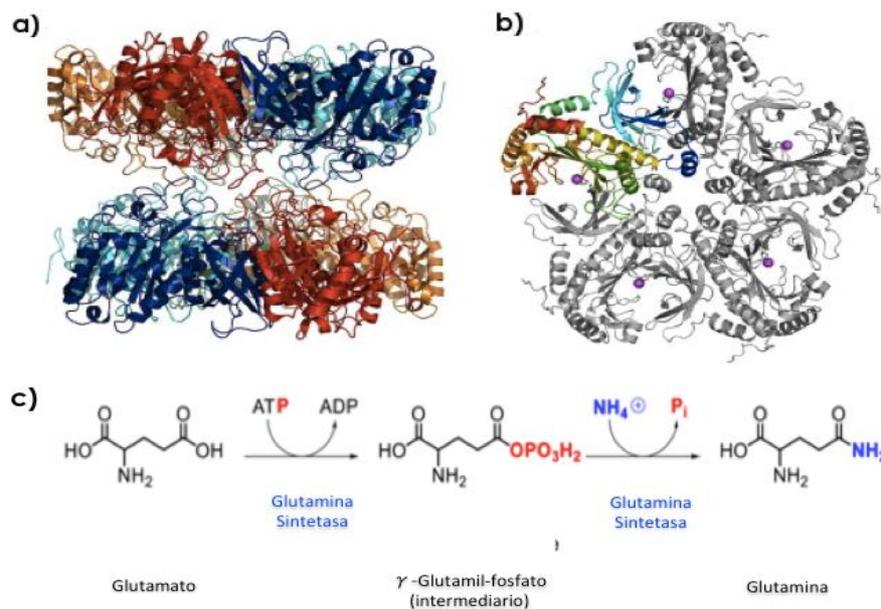


Figura 2. Estructura de la glutamina sintetasa (GS) humana y la reacción que cataliza. La GS humana es una proteína homodecamérica conformada por 2 anillos pentaméricos. a) Vista lateral, las 10 subunidades son idénticas, cada una se muestra de un color diferente para facilitar su distinción. b) Vista Superior. Muestra el re-arreglo entre los monómeros para formar un anillo pentamérico. Las esferas rosas representan un ion de magnesio unido a cada sitio activo. c) Reacción catalizada por la GS, en la que se condensa glutamato con amonio para formar glutamina. Tomado de Krajewski *et al.*, 2008.

La deficiencia en la expresión de la GS, tanto en modelos animales como en pacientes, lleva al desarrollo de una hiperamonemia, lo que confirma el papel central de la GS en la detoxificación del amonio (Spodenkiewicz *et al.*, 2016). Durante los episodios de hiperamonemia, la concentración de amonio en sangre puede pasar de 11-50 μM a 100-500 μM , o más alta en algunos pacientes con falla hepática aguda (Couce *et al.*, 2009). La hiperamonemia puede ser aguda si las elevadas concentraciones de amonio duran un corto período de tiempo; o bien si las altas concentraciones de amonio persisten por largos períodos de tiempo generan una hiperamonemia crónica. La hiperamonemia

producida por alguna falla hepática genera diferentes síntomas neuropsiquiátricos y motores que se conocen como encefalopatía hepática.

2.3 Encefalopatía hepática (EH)

La EH es una complicación neuropsiquiátrica que se observa en pacientes con insuficiencia hepática aguda o crónica (Ferenci *et al.*, 2002). Los síntomas de este padecimiento pueden ir desde cambios sutiles en la personalidad, inversión del ciclo sueño-vigilia, disfunción de la memoria, desorientación y confusión, hasta **letargia**, **estupor**, coma y en última instancia la muerte (Felipo, 2013). Diversos estudios indican que estos síntomas se deben a la presencia anormal de sustancias en el cerebro, principalmente amonio y factores precipitantes, como moléculas inflamatorias, aminoácidos y neurotransmisores, como la serotonina, el glutamato, la glutamina, así como otros intermediarios metabólicos, que desencadenan alteraciones de los astrocitos, edema cerebral, estrés oxidante y alteraciones en la comunicación neuronal (Figura 1) (Jones & Mullen, 2012).

Diversos tratamientos, como el uso de disacáridos (lactulosa y lactitol), antibióticos (rifaximina, neomicina, paranomicina, metronidazol) y aminoácidos (L-ornitina L-aspartato, L-carnitina), se han utilizado para disminuir las concentraciones de amonio (Morgan *et al.*, 2007; Torre, 2008; Rose, 2012). No obstante, estos tratamientos resultan muy costosos, además de que en algunos casos no previenen las recaídas o bien, causan efectos adversos como dolor de cabeza, náuseas, vómito, constipación intestinal, dolor abdominal, anorexia, pérdida de la audición, toxicidad renal, por mencionar algunos (Huang *et al.*, 2007; Phongsamran *et al.*, 2010). Por otro lado, puede considerarse el trasplante de hígado, aunque esta posibilidad está limitada por la disponibilidad de donadores y los riesgos de compatibilidad. Por tales motivos es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ofrezcan alternativas prometedoras a los pacientes con hiperamonemia y EH, como la terapia génica.

2.4 Terapia génica

En las últimas décadas, la terapia génica ha logrado incrementar su potencialidad en el tratamiento de diversas enfermedades. Según las definiciones de la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos, USA) y la

EMA (Agencia Europea de Medicamentos), la terapia génica consiste en la introducción de material genético (DNA ó RNA) a una célula eucarionte con el fin de regular, reparar, reemplazar, adicionar o eliminar alguna secuencia génica y así poder modificar la expresión de proteínas y el curso de alguna enfermedad. Actualmente, los virus son los vehículos de entrega génica más usados, pues son entidades de replicación intracelular obligada que tienen la capacidad de transferir su propio material genético a la célula huésped, siendo capaces de infectar células con una gran especificidad y eficiencia (Wirth *et al.*, 2013). Dentro de los vectores virales, los virus adenoasociados se encuentran entre los más utilizados (Figura 3).

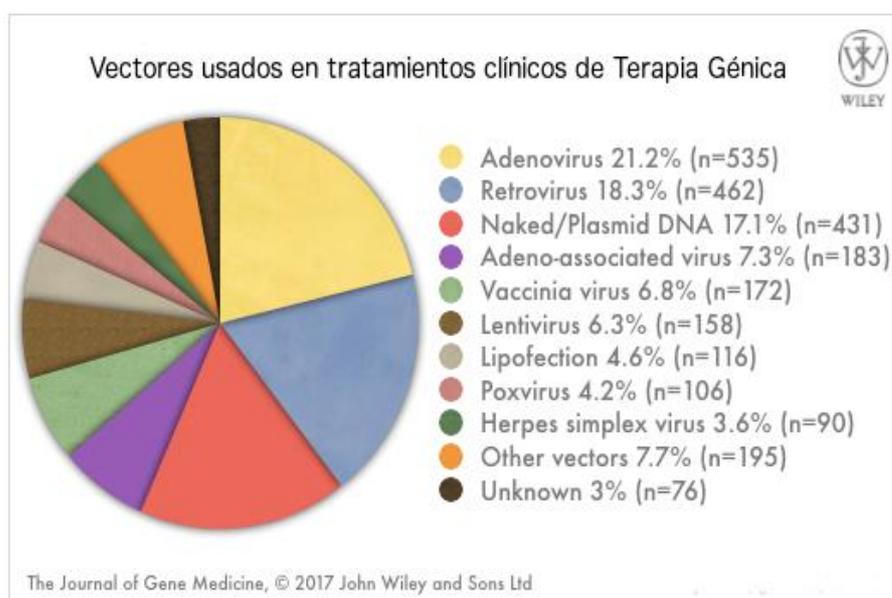


Figura 3. Tipos de Vectores usados en tratamientos clínicos de Terapia Génica. Según datos de The Journal of Gene Medicine, los VAA están aumentando como vectores de entrega génica. Actualmente se tienen registrados al menos 183 protocolos clínicos aprobados a nivel mundial en los que se utilizan VAA, que corresponden al 7.3% del total de vectores utilizados. Tomado de <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>

2.5 Virus Adeno-Asociados (VAA)

Los VAA son virus icosaédricos no envueltos, relativamente pequeños, de 20 a 25 nm de diámetro (Figura 4). Infectan a animales vertebrados, sin embargo, no se han reportado enfermedades producidas por estos virus en sus hospederos. Pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, debido a que para la replicación y la expresión de su genoma necesitan de un virus auxiliar, generalmente un adenovirus o un herpesvirus. En ausencia de un virus auxiliar, los VAA permanecen de forma latente en la célula.

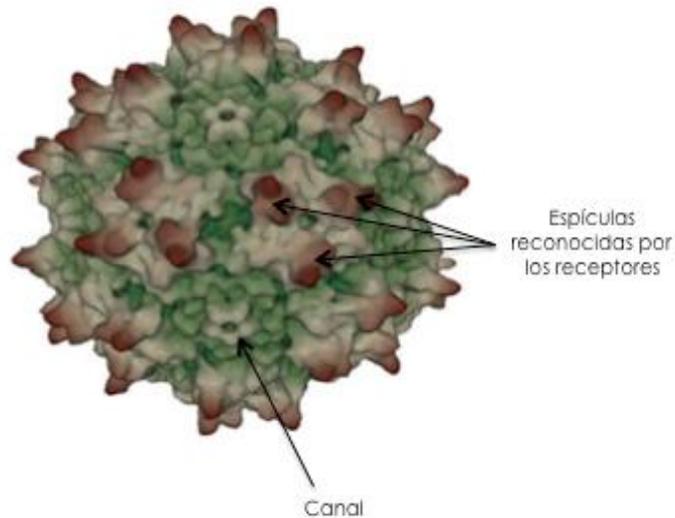


Figura 4. Representación de la cápside de un VAA. Imagen de la superficie externa de un VAA obtenida mediante la reconstrucción de microscopía crió-electrónica. Se observan en café oscuro las tres espículas responsables de la unión a los distintos receptores celulares. También se observan los canales a través de los cuales el extremo N-terminal de VP1 se expone a la superficie de la cápside y mediante los cuales ocurre el proceso de empaquetamiento del DNA, proceso auxiliado por las proteínas virales Rep52/40 (Tomado de O'Doneell *et al.*, 2009).

2.5.1 Genoma de los VAA

Los VAA tienen un genoma lineal de DNA de cadena sencilla de 4.7 kb, que contiene 3 marcos de lectura abiertos (ORFs) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITRs). El gen *rep* (Replicación) contiene un ORF, que codifica para cuatro proteínas no estructurales (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40). Las proteínas Rep más grandes (Rep78 y Rep68) se transcriben a partir del promotor *p5*; mientras que las proteínas Rep más pequeñas (Rep52 y Rep40) se transcriben a partir del promotor *p19*. El gen *cap* (cápside) contiene 2 ORFs, el ORF1 codifica para las tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3), cuya expresión está controlada por el promotor *p40*. El ORF2 codifica para la proteína activadora del ensamblaje (AAP), necesaria para el ensamblaje de la cápside (Sonntag *et al.*, 2011; Naumer *et al.*, 2012) (Figura 5a). Las ITRs constan de 145 nucleótidos, los primeros 125 nucleótidos constituyen un palíndromo que se dobla sobre sí mismo para formar una estructura de horquilla en forma de T, mientras que las otras 20 bases permanecen de forma desapareada y conforman lo que se conoce como estructura D. Localizadas dentro de las ITR se encuentran los elementos de unión a las proteínas Rep (RBE) y un sitio de resolución terminal (TRS), que es una secuencia sensible a la actividad

endonucleasa de las proteínas Rep (Figura 5b). Las ITRs desempeñan un papel fundamental en la replicación del DNA vírico, pues funcionan como el origen de replicación y sirven como primer durante la síntesis de DNA por la DNA polimerasa. Las ITRs también son esenciales para el empaquetamiento del genoma de los VAA, la transcripción, la regulación negativa en condiciones no favorables y la integración sitio específica.

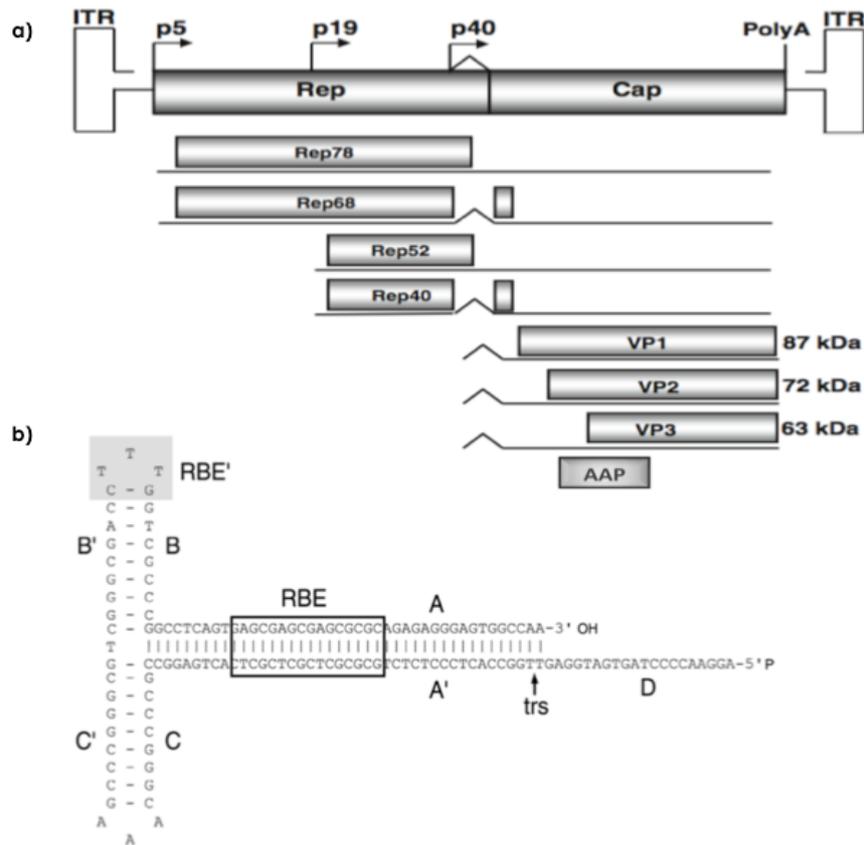


Figura 5. Genoma de DNA de cadena sencilla de un VAA. a) Los genes *rep* y *cap* son flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR). El gen *rep* codifica cuatro proteínas no estructurales Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. El gen *cap* codifica 3 proteínas estructurales, VP1, VP2 y VP3, así como la proteína activadora del ensamblaje (AAP). La ubicación de los promotores *p5*, *p19* y *p40* están representados mediante flechas. b) Estructura secundaria de las ITRs de un VAA2. A-A', B-B' y C-C' representan brazos autocomplementarios de las ITR. El recuadro señalado como RBE indica la secuencia correspondiente al elemento de unión a proteínas Rep. La zona sombreada y señalada como RBE' indica una secuencia de estabilización para la unión de proteínas Rep. El sitio de resolución terminal (*trs*) está indicado con una flecha. Modificado de Van Vliet *et al.*, 2008 y Gonçalves, 2005.

2.5.2 Proteínas estructurales de los VAA

Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 conforman la cápside del virus en una relación estequiométrica 1:1:10. VP1 (87 kDa) es la proteína más grande que conforma las cápsides; en su secuencia amino terminal contiene un dominio

único con actividad fosfolipasa A2 (PLA2) y una señal de localización nuclear (NLS), que le permite ser transportada desde el citoplasma hacia el núcleo para llevar a cabo el ensamblaje de las cápsides. VP2 (72 kDa) también posee NLS, parece ser importante para transportar a VP3 hacia el núcleo (Grieger *et al.*, 2006). VP3 (62 kDa) es la proteína más pequeña y la más abundante en la cápside viral.

2.5.3 Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 están implicadas en la replicación del genoma viral, el control de la transcripción y el empaquetamiento del DNA hacia el interior de las cápsides. Las proteínas Rep78 y Rep68 son importantes en la regulación de la expresión y la replicación génica. Las proteínas Rep52 y Rep40 inducen la encapsidación de los genomas, pero sólo las Rep78 y Rep68 poseen actividad endonucleasa en un dominio de su extremo aminoterminal.

2.5.4 Ciclo infeccioso de los VAA

La infección de una célula blanco inicia cuando un VAA se une a un receptor de membrana específico, después de múltiples contactos con la célula. Se ha visto que la interacción con diversas moléculas co-receptoras permite la internalización eficiente del virus, al desencadenar vías de señalización como las de Rac1 y fosfoinositol 3-cinasa. Se ha sugerido que estas vías median los procesos de endocitosis de los VAA a través de vesículas dependientes de clatrina y dinamina. Hasta la fecha, se han identificado varios receptores y co-receptores para los diferentes serotipos de VAA (Tabla 1).

Tabla 1. Moléculas receptoras y co receptoras implicadas en el reconocimiento y la endocitosis de los diferentes serotipos de VAA

Serotipo de VAA	Principal Receptor	Co-receptores	Órganos blanco
VAA 1	α 2-3N/ α 2-6 N-ácido siálico	No descrito	Músculo, hígado, SNC
VAA 2	HSPG	FGFR1, HGFR, integrinas, LamR 37/67 kDa	SNC, hígado
VAA 3	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR 37/67 kDa	Hígado
VAA 4	α 2-3 O-ácido siálico	No descrito	Pulmón, células endodimales
VAA 5	α 2-3/ α 2-6 N-ácido siálico	PDGFR	Músculo, hígado, CNS, retina
VAA 6	HSPG, α 2-3/ α 2-6 N-ácido siálico	EGFR	Músculo, hígado, médula espinal
VAA 7	N-ácido siálico	PDGFR	Músculo, hígado
VAA 8	No descrito	LamR 37/67 kDa	Músculo, hígado, retina
VAA 9	N-galactosa	LamR 37/67 kDa	CNS, corazón, músculo, hígado
VAA 10	No descrito	No descrito	CNS, músculo, hígado
VAA 11	No descrito	No descrito	Desconocido
VAA 12	No descrito	No descrito	Desconocido

HSPG: Proteoglicano de heparán sulfato, PDGR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, FGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de fibroblastos, LamR: Receptor de laminina. EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal. SNC: Sistema Nervioso Central. Modificado de Miyake *et al.*, 2012.

Posteriores rearrreglos en las proteínas del citoesqueleto, como tubulina y microtubulina, permiten el movimiento de los endosomas que contienen a los VAA desde el citoplasma hacia la región perinuclear. La acidificación que ocurre en los endosomas tardíos origina un rearrreglo de la estructura de la cápside, permitiendo la exposición del motivo con actividad de PLA2 de VP1, el cual hidroliza los fosfolípidos del endosoma, permitiendo la salida de la cápside al región perinuclear. Finalmente, la cápside intacta atraviesa el complejo del poro nuclear y el genoma se libera (Figura 6). Una vez en el núcleo, la presencia o ausencia de coinfección con un virus auxiliar determina si el VAA es integrado al genoma del hospedero (infección latente), o bien si entra en un ciclo productivo de replicación de su genoma (infección productiva).

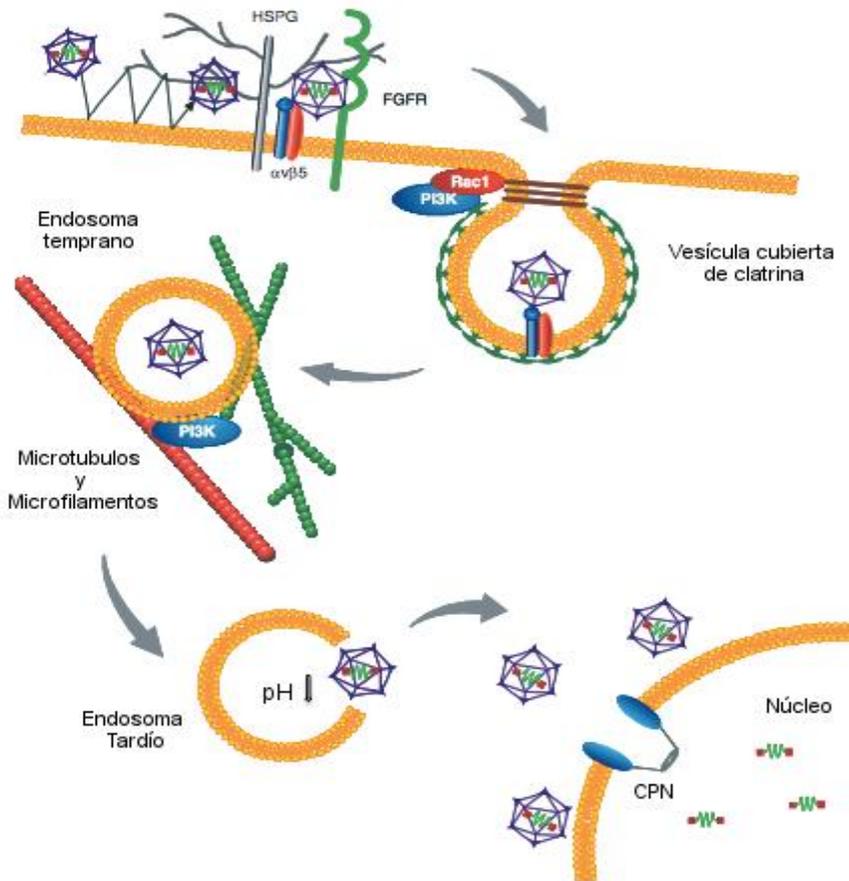


Figura 6. Principales eventos en la infección productiva de un VAA. Los VAA entran en contacto con los receptores y co-receptores de las células blanco, desencadenando un conjunto de cascadas de señalización para endocitar a los VAA a través de vesículas recubiertas de clatrina. Mediante el tráfico vesicular, en el que se da un re-arreglo constante del citoesqueleto, los VAA logran alcanzar el núcleo de la célula, en donde las cápsides sufren cambios conformacionales para liberar el genoma de los VAA. Una vez en el núcleo el DNA podrá replicarse (infección productiva) o bien, se integrará en el genoma del hospedero (infección latente). CPN: Complejo del poro nuclear, FGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de fibroblastos, HSPG: Proteoglicano de heparán sulfato, PI3K: fosoinositol 3-cinasa (Tomado de Büning *et al.*, 2008).

En ausencia de un virus auxiliar, los VAA generan una infección latente, y pueden persistir en forma episomal como **concatámeros** de DNA, o pueden integrarse en un locus específico del cromosoma 19 humano (q13.4), el AAVS1. Antes de la integración se sintetiza la cadena complementaria del DNA viral y se activa la expresión basal de las proteínas Rep. Las proteínas Rep se unen al genoma viral en los RBS (Figura 5b), hallados dentro de las ITRs y a secuencias homólogas localizadas en el locus AAVS1, mediando la integración. Los provirus integrados pueden ser rescatados por la co-infección de la célula hospedera por un virus auxiliar, donde la expresión génica y la replicación de los VAA ocurre inmediatamente. Las proteínas adenovirales E1a, E1b, E2a, E4 y las del

herpes virus UL5, UL9, UL29 y UL52 se han identificado como las responsables de proporcionar las funciones auxiliares.

2.5.5 Replicación y expresión del genoma

Un modelo aceptado para la replicación del genoma de los VAA es el mecanismo de horquilla rodante. En este modelo, las ITRs, debido a su naturaleza de auto-complementariedad, se pliegan sobre si mismas para formar una estructura secundaria en forma de T, dejando un grupo hidroxilo 3' libre (Figura 5b). Así, este extremo de la ITR actúa como "**primer**" para la DNA polimerasa del hospedero. El "**primer**" de la ITR en el extremo 3' es elongado y desplazado hacia el extremo de la ITR 5'. Esto lleva a la síntesis unidireccional de la segunda hebra, lo cual se cree que ocurre usando la maquinaria de replicación celular. Este dúplex de DNA es transcrito y a partir de la traducción de los mensajeros se producen todas las proteínas de los VAA. La replicación del genoma es completada por las proteínas Rep78 y Rep68, que poseen actividad enzimática de ATPasa, helicasa y endonucleasa. Estas proteínas se unen al RBS dentro de la ITR, y con su actividad de helicasa separan las hebras del dúplex y con su actividad de endonucleasa realizan un corte sitio específico dentro de los sitios de resolución terminal (trs) de la ITR, regenerando el grupo 3'-OH. Este proceso íntegro genera tanto intermediarios de doble cadena o de una sola hebra con la longitud completa del genoma del VAA. En síntesis, la función primaria de Rep78 y Rep68 es resolver el extremo de la ITR cerrado covalentemente para obtener 2 hebras de DNA que sirvan de templado para posteriores ciclos de replicación y producir genomas monoméricos disponibles para su empaquetamiento (Figura 7). Se ha descrito que Rep52 y Rep40 con su actividad de helicasas, también desenrollan la doble cadena de DNA, al mismo tiempo que introducen una de las cadenas a través de los poros de las cápsides pre-ensambladas durante el empaquetamiento.

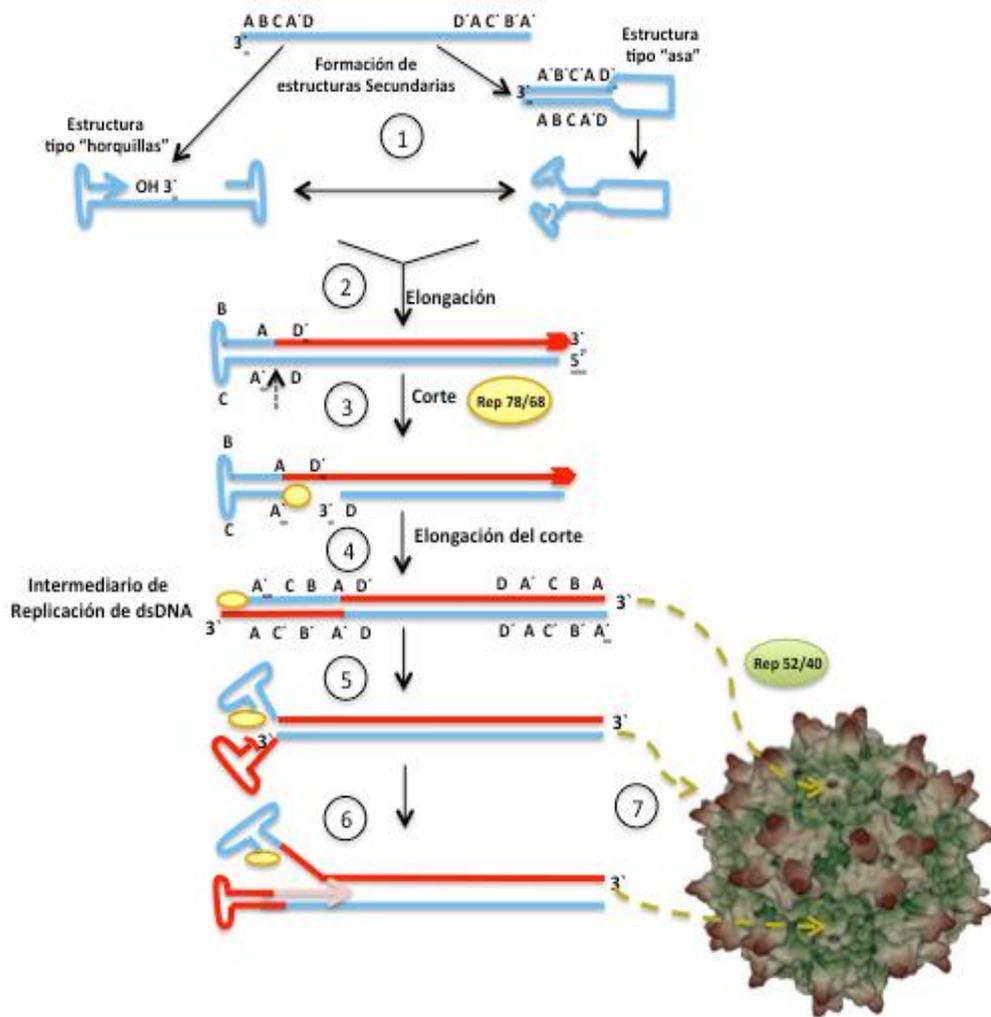


Figura 7. Esquema de la replicación del genoma y empaquetamiento de un VAA. En el genoma lineal de DNA de los VAA, las regiones ITRs están representadas por 3'-ABCA'D-5' y 5'-A'B'CAD'-3'. La auto complementariedad de estas regiones permite la formación de una estructura en forma de horquilla, proporcionando en el extremo 3'-terminal un "Primer" para el inicio de la replicación ((1), lado izquierdo). Es posible que las ITRs se emparejen entre ellas formando una estructura tipo asa ((1), lado izquierdo), que quizá sirva para reparar una mutación en alguna de las ITRs. (2) En cualquiera de los casos, la elongación del extremo 3'-OH de la horquilla permite la síntesis continua (línea roja) hacia el extremo 5' de la hebra parental. (3) Para completar el copiado de la hebra parental, se realiza un corte por las proteínas virales Rep78/68, para generar un nuevo 3'-OH en el TRS, marcado con la flecha negra discontinua. (4) Se da la elongación del corte, dando como resultado la copia completa de la ITR, y un intermediario de replicación de doble cadena (dsDNA). (5) El extremo 3' de la hebra hija se puede formar la misma estructura de horquilla terminal, para iniciar un nuevo ciclo de síntesis de DNA (paso 6), con el desplazamiento de una de las moléculas de DNA genómico monocatenario. (7) Las diferentes moléculas de ssDNA pueden ser empaquetadas en las cápsidas preensambladas, sin importar la polaridad de las mismas, auxiliadas por las proteínas virales Rep52/40.

2.6 Los VAA y su utilización en la terapia génica

Los VAA se encuentran entre los vectores virales más utilizados en la terapia génica, principalmente porque presentan características que los hacen

atractivos para este fin. Algunas de estas características son: 1) Seguridad, puesto que no se conoce ninguna enfermedad en humanos causada por el VAA silvestre, por lo que no es patogénico. 2) Su habilidad para transducir tanto células en división como células quiescentes. 3) El DNA de un VAA recombinante difícilmente se integra al genoma de la célula hospedera, sino más bien permanece de forma episomal. 4) En células que no se encuentran en división, el vector puede permanecer transcripcionalmente activo durante un largo período de tiempo. 5) El virión presenta estabilidad y resistencia a solventes, cambios en el pH y la temperatura. 6) El hospedero no presenta una respuesta inmune significativa. 7) Los diferentes serotipos presentan tropismo hacia tejidos específicos. Hasta hoy se conocen 12 serotipos (Tabla 1) (Miyake *et al.*, 2012; Drouin y Agbandje-McKenna, 2012).

2.7 Producción de los vectores de VAA (vVAA)

Para producir un vVAA es necesario generar la cápside viral, el genoma recombinante y las proteínas involucradas en su replicación y empaquetamiento. Para obtener un genoma recombinante "**gutless**", es decir, carente de los marcos de lectura para las proteínas de VAA, se debe de diseñar y construir un plásmido con un casete de expresión que contenga por lo menos un potenciador, un promotor, el gen de interés y un terminador; todos estos elementos deben ir flanqueados por las ITRs de un VAA (Figura 8). Las ITR son las únicas secuencias de este virus que se requieren entregar en **cis** a las células productoras del vector; pues median el rescate, la replicación y el empaquetamiento del transgen a través de las proteínas Rep y diversos factores celulares. Por otro lado, los genes *rep* y *cap* se proporcionan en **trans** por medio de las construcciones plasmídicas que los codifican; o bien por medio de baculovirus recombinantes.



Figura 8. Representación esquemática de los componentes básicos presentes en un inserto genético empaquetado dentro de los vectores de VAA.

Actualmente, los vVAA se pueden producir utilizando dos estrategias. En la estrategia tradicional, se transfectan células de mamífero como HEK293 o HeLa,

con 3 plásmidos diferentes (Potter *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 1998, 2003; Miyake *et al.*, 2012; Burger & Nash, 2016). Un primer plásmido contiene la construcción con el gen de interés; un segundo plásmido contiene los genes *rep* y *cap* de los VAA; y un tercer plásmido contiene los genes auxiliares de un adenovirus o un herpes virus. Aunque este sistema presenta una alta eficiencia en cuanto a la producción de proteína y ensamblaje del vector, presenta desventajas en el escalamiento del proceso, además puede presentar elementos contaminantes de los virus auxiliares. En la estrategia alternativa, se emplea el sistema células de insecto-baculovirus. En este sistema, los elementos necesarios para la producción de los vVAA se introducen a las células de insecto mediante la co-infección con varios baculovirus recombinantes (Urabe *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2009). En versiones más recientes de ambos sistemas, se han integrado uno o más componentes genéticos para la fabricación de vVAA al genoma de las líneas celulares tanto de mamíferos como de insectos, generando líneas productoras estables; y disminuyendo así el número de plásmidos o baculovirus recombinantes necesarios (Aslanidi *et al.*, 2009; Mietzsch *et al.*, 2014).

Debido a las limitaciones que presenta la producción de vVAA utilizando células de mamífero, en este trabajo se utilizó el SCI-BV. Algunas de las características que hacen atractivo este sistema para la producción de vectores virales son: 1) las células de insecto se pueden cultivar e infectar en suspensión, facilitando el escalamiento del proceso; 2) éstas células realizan modificaciones postraduccionales similares a las que realizan las células de mamífero, de manera que las proteínas expresadas pueden conservar su funcionalidad biológica; 3) es posible expresar simultáneamente varios genes recombinantes de alto peso molecular; 4) los niveles de expresión que se obtienen son altos en comparación con otros sistemas de expresión de eucariontes superiores, puesto que los genes recombinantes contenidos en los baculovirus se encuentran generalmente bajo promotores fuertes, como el de poliedrina (*polh*) o el *p10*; 5) se pueden utilizar líneas celulares adaptadas a crecer sin suero, lo que reduce los costos de producción; 6) Se puede coinfectar un cultivo celular con varios baculovirus, cada uno portando genes diferentes; 7) El número de partículas de vVAA que se generan por célula con capacidad para transducir es 20 veces mayor cuando el virus se produce en células de insecto que en células de mamífero (Urabe *et al.*, 2002; Palomares *et al.*, 2006).

2.7.1 Componentes del sistema células de insecto-baculovirus (SCI-BV)

Este sistema básicamente consiste en utilizar **baculovirus** recombinantes como vectores de expresión (VEB), los cuales infectan células de insecto y utilizan la maquinaria celular para replicarse y expresar los genes de interés. Generalmente, el baculovirus más utilizado como BEV es el nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). El AcMNPV es un virus de DNA de doble cadena, capaz de infectar una gran variedad de insectos **lepidópteros**. Su cápside tiene forma de bastón con un diámetro de 30-60 nm y una longitud de 250-300 nm. Durante su ciclo de vida, este baculovirus genera dos tipos de partículas virales, los viriones ocluidos y los viriones gemados. Los viriones ocluidos se encuentran embebidos dentro de una matriz cristalina conformada por la proteína poliedrina. La función de estos cuerpos de oclusión es proteger a los viriones del medio ambiente. La poliedrina solamente es solubilizada por un pH alto, similar al que se presenta en el tracto intestinal de las larvas hospederas. El segundo tipo de partícula viral, los virus gemados, se encuentran envueltos por una membrana de la célula hospedera, que adquieren en la última fase de su ciclo de vida (Rohrmann, 2008, Palomares *et al.*, 2015) (Figura 9).

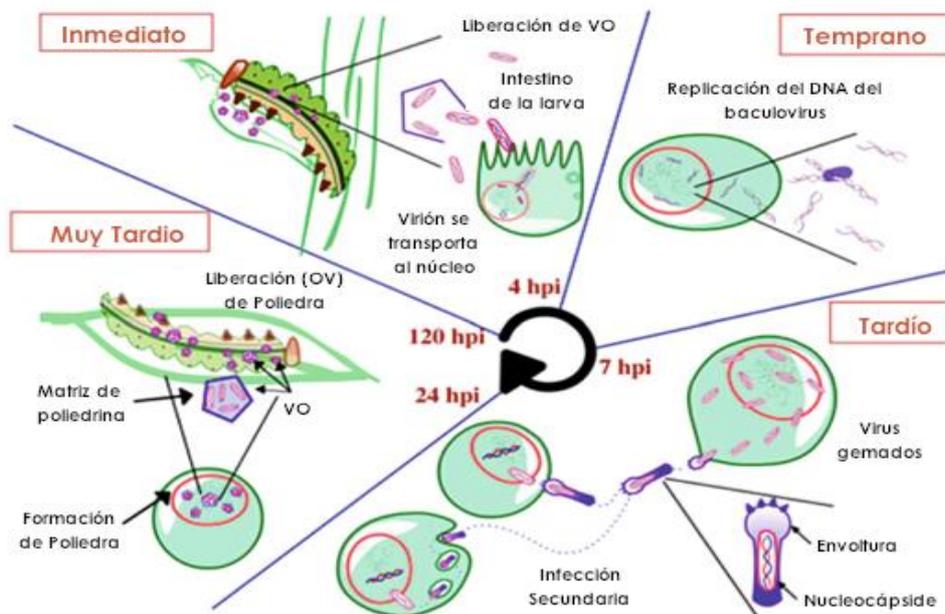


Figura 9. Ciclo de vida de un baculovirus. En la fase inmediata a que los baculovirus son ingeridos por larvas de insectos, se solubiliza la matriz de poliedrina en el intestino liberando a los virus ocluidos (VO). Estos alcanzan a las células epiteliales en donde se transportan al núcleo. En la fase temprana ocurre la replicación del DNA del baculovirus, utilizando la maquinaria celular del hospedero. En la fase tardía ocurre el ensamblaje de la nucleocápside y la liberación de los viriones, los cuales al salir de las células adquieren una envoltura de membrana celular. Los virus liberados infectan nuevas células hospederas, generando una infección secundaria. En la fase muy tardía se expresa la poliedrina, se da la formación de poliedros y la oclusión de los viriones en los mismos. Finalmente, los virus ocluidos son liberados por las larvas para dar inicio a un nuevo

ciclo. Imagen realizada por el Lic. Enrique-Paz del laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología, IBT. (Palomares *et al.*, 2015).

Cuando se trabaja con los baculovirus *in vitro*, éstos no necesitan la protección de la poliedrina, además de que los viriones ocluidos no son infecciosos. Por lo tanto, en los sistemas de expresión recombinantes, se reemplaza el gen de la poliedrina por el gen de interés y se aprovecha este promotor (*polh*), pues se encuentra dentro de los de mayor fuerza. Otros promotores presentes en el genoma del baculovirus que también son utilizados ampliamente para la expresión de proteínas recombinantes son el *p10*, *gp64* y los *ie*. (Palomares *et al.*, 2006)

En cuanto a las célula de insecto, actualmente ya existen líneas celulares bien establecidas que han sido asiladas a partir de varios tejidos de insectos en diferentes estadíos de su ciclo de vida. Entre las líneas celulares más utilizadas están la Sf21 y la Sf9, que son células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*, y la TBI-Tn5B1-4 conocida comercialmente como High Five, que son oocitos de *Trichoplusia ni*. Estas líneas celulares han sido adaptadas para crecer en suspensión y en medios de cultivo libres de suero. (van Oers *et al.*, 2015).

2.7.2 Producción de vVAA en el SCI-BV

Para generar los baculovirus recombinantes que fungen como vectores de expresión (VEB) utilizando el sistema bac to bac (Invitrogen) se llevan a cabo los siguientes pasos: 1) Clonación del gen de interés en un plásmido de transferencia; 2) Generación de los bácmidos recombinantes a través de un proceso de transposición en bacterias; 3) Generación de las partículas de baculovirus recombinantes a través de la transfección de los bácmidos recombinantes aislados en células de insecto; 4) Evaluación de los baculovirus recombinantes resultantes y 5) Titulación y elaboración del stock viral. Cada uno de estos pasos se resumen en la figura 10, y se detallan más adelante en la sección de materiales y métodos. Una vez que se tienen los diferentes baculovirus recombinantes con los genes de interés (los genes *rep* y *cap* de los VAA y el gen terapéutico), éstos se usan para co-infectar a las células de insecto. De esta forma, se entregan a las células todos los elementos necesarios para la fabricación de los vectores de VAA (Figura 10).

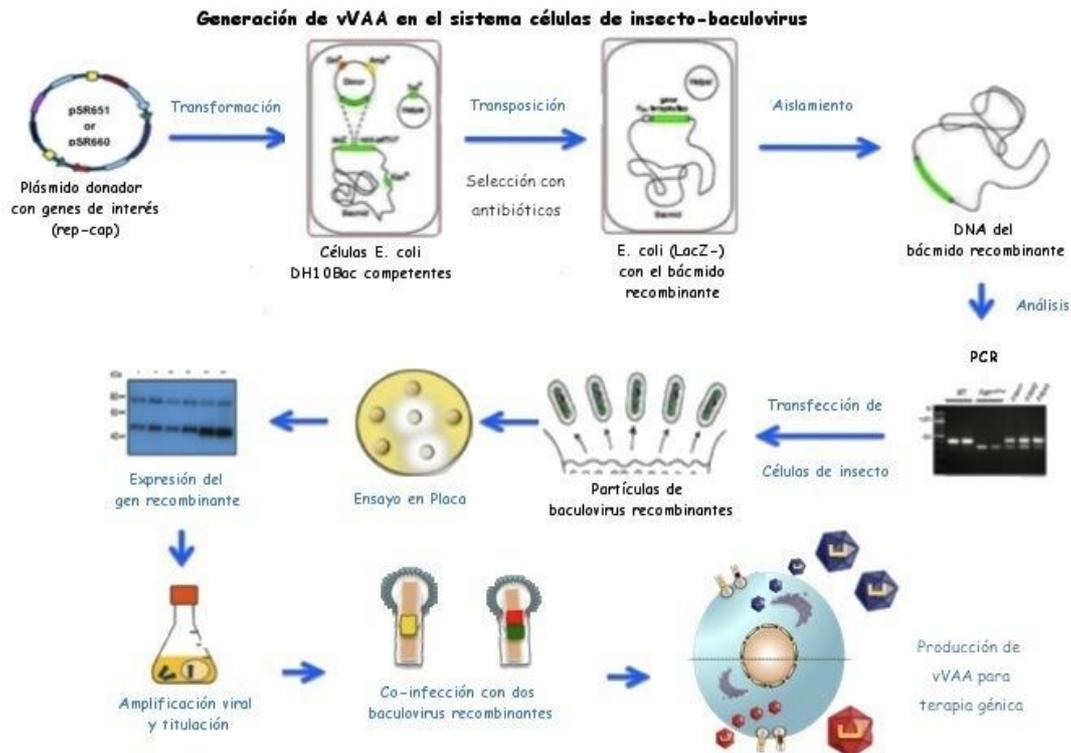


Figura 10. Esquema de la producción de vVAA usando el sistema Bac to Bac (Invitrogen). En este trabajo se utilizaron dos baculovirus recombinantes, uno denominado Bac Rep-Cap y otro baculovirus con el gen de la GS, denominado BacGS+, para generar los vectores de VAAGS+ del serotipo 1 y 8. Modificado del manual Bac to Bac, Invitrogen 2009.

La estrategia original de producción de vVAA utilizando este sistema consta de 3 baculovirus recombinantes (Urabe *et al.*, 2002). BacCap contiene el casete para la expresión de las proteínas estructurales del VAA, bajo el control transcripcional del promotor *polh*. BacRep codifica para 2 de las proteínas implicadas en la replicación y empaquetamiento del genoma recombinante, Rep78 y Rep52, bajo el control de los promotores *ie1* y *polh*, respectivamente. Un tercer baculovirus recombinante contiene el gen de interés flaqueado por las ITRs del VAA2. El ensamblaje de los vVAA utilizando este sistema requiere que una misma célula sea infectada con los 3 baculovirus recombinantes a la vez, para que se expresen todos los componentes del vector. La producción de los vVAA comienza inmediatamente después de la coinfección con los baculovirus recombinantes (entre las 0-6 hpi), momento en el que se activa el promotor *ie1* (promotor que se expresa temprano en el ciclo infeccioso de los baculovirus) permitiendo la expresión de la proteína Rep78. Rep78 es transportada al núcleo de la célula, en donde ocurre la replicación del DNA del baculovirus y con él, la replicación del genoma recombinante, entre las 6-18hpi. Por medio de la actividad de endonucleasa de Rep78, se escinden los genomas recombinantes

de VAA del genoma del baculovirus; permitiendo su replicación independiente. A partir de las 18 hpi, el promotor *ie1* se inactiva y cesa la expresión de Rep78. Por otra parte, se activan los promotores *polh* y *p10*, con lo cual inicia la expresión de Rep52 y de las proteínas de las cápside de los VAA. Posteriormente, estas proteínas son exportadas al núcleo de la célula para que se lleve a cabo el ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del DNA recombinante. Los genomas resueltos por las Rep78 en forma monomérica, se empaquetan dentro de las cápsides ensambladas por acción de la proteína Rep52. A pesar de que este sistema resulta ser eficaz, el Bac-Rep presenta inestabilidad genética tras el pasaje serial debido a la duplicación en tándem de las regiones homólogas de los genes *rep78* y *rep52*, lo cual dificulta el escalamiento del proceso.

Más adelante Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2009) hicieron mejoras a este sistema. Modificaron genéticamente el gen *rep* para permitir la expresión de Rep78 y Rep52 a partir de un mismo mRNA. Además, combinaron en un solo plásmido los casetes de expresión de los genes *rep* y *cap*, lo que permitió su expresión a partir de un solo baculovirus (BacRep-Cap dual). De esta forma, se redujo el número de baculovirus requeridos para la producción de los vVAA de 3 a 2 baculovirus recombinantes. Dicha reducción aumentó el número de partículas de vVAA conteniendo el genoma recombinante, pues existe mayor probabilidad de que una célula sea infectada por 2 baculovirus recombinantes al mismo tiempo, en lugar de 3. Con tales mejoras, lograron la expresión estable de las proteínas Rep y Cap hasta el pase serial 7 de dicho baculovirus, lo que permite una plataforma de producción escalable de los vVAA. Así pues, en este trabajo usaremos estas mejoras para la producción de nuestros vVAA. Generaremos dos baculovirus recombinantes duales denominados Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8. Los dos expresarán las proteínas Rep78 y Rep52 del VAA2, sin embargo, el primero expresará las VPs del VAA1, mientras que el segundo expresará las VPs del VAA8. Además, utilizaremos un tercer baculovirus recombinante conteniendo el gen de la GS. Con ellos, realizaremos las coinfecciones pertinentes en células de insecto para generar los vVAA de los serotipos 1 y 8 que contengan el gen terapéutico de la GS, los VAA1GS+ y VAA8GS+ (Figura 10).

2.8 vVAA y su uso en tratamientos de terapia génica

La terapia génica con base en VAA ha experimentado un notable desarrollo. Desde que se demostró por primera vez su utilidad como vector de transferencia génica en 1984 (Hermonat *et al.*, 1984), a la fecha se han llevado a cabo un gran número de estudios preclínicos para tratar enfermedades tanto monogénicas como trastornos más complejos. Dichos estudios han arrojado resultados alentadores, a tal punto que desde hace algunos años se inició el uso de estas terapias en humanos. Actualmente, existen registrados alrededor de 180 protocolos clínicos a nivel mundial. Estos estudios se encuentran en diferentes fases de desarrollo (Fases I-IV) y buscan tratar diversas enfermedades, como desordenes oculares que causan ceguera como la amaurosis congénita de Leber, desordenes hematológicos hereditarios como la hemofilia B, desordenes metabólicos como la deficiencia de la alfa-1-antitripsina y las hiperlipoproteinemias, así como enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Canavan y Parkinson; enfermedades musculares como la distrofia muscular de Duchenne y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, entre otras.

Considerando todos estos esfuerzos, podemos señalar que la terapia génica con VAA ya es una realidad. De hecho en el 2012, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó para su comercialización el primer medicamento de terapia génica a base de VAA, el Alipogén tiparvovec (Glybera®). Este medicamento, por medio de un VAA1 recombinante, entrega el gen de la lipoproteína lipasa (LPL) hacia el músculo esquelético, para tratar la hipertrigliceridemia hereditaria causada por la deficiencia en esta enzima. Recientemente, en diciembre del 2017, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América, aprobó el primer medicamento de terapia génica en este país, el Voretigene neparvovec (Luxturna®). Este medicamento, con base en un VAA recombinante, entrega a las células retinianas copias normales del gen RPE65, con el fin de restaurar la producción normal de esta enzima y así tratar la distrofia retiniana, que puede causar ceguera total. Y aunque aún queda mucho trabajo por hacer y muchas preguntas por responder, no queda más que sumar esfuerzos por hacer de la terapia génica una realidad.

2.9 Terapia génica en el tratamiento de hiperamonemias

En lo referente a la terapia génica para el manejo del amonio, se han usado VAA en modelos animales con desórdenes del ciclo de la urea (DCU). En estos estudios se trataron deficiencias letales de algunas de las enzimas involucradas en el ciclo de la urea, tales como la Ornitina transcarbamilasa (Cunningham *et al.*, 2009), la Arginasa I (Lee *et al.*, 2012) y la Arginosuccinato Sintetasa (Kok *et al.*, 2013). Los resultados fueron alentadores, pues en todos ellos hubo una transducción hepática eficiente, lo que llevó a un aumento significativo en la expresión de las enzimas entregadas y por consiguiente, una disminución relevante en los niveles de amonio. Inclusive la tasa de sobrevivencia de los animales tratados fue mayor. Cabe recalcar la letalidad de estos desórdenes, por lo que en muchos casos los fetos no llegan a término o fallecen a los pocos días de nacimiento. Sin embargo, el principal reto a vencer en estos trabajos es la alta tasa de recambio celular en el hígado pre y neonatal; debido a ello, las células transducidas con vVAA fueron rápidamente removidas.

En contraste con las referencias anteriores, en este trabajo buscamos que la terapia génica pueda ser dirigida a pacientes con episodios de hiperamonemia desencadenados por alguna falla hepática desarrollada a lo largo de su vida, como resultado de enfermedades como hepatitis, cirrosis, hígado graso o algún hepatocarcinoma. En una primera aproximación de tratamiento de la hiperamonemia y la EH a través de terapia génica, se realizó una colaboración entre los grupos de la Dra. Palomares (IBT-UNAM) y del Dr. Torres-Vega (INCMNSZ), en donde se generó un vector de baculovirus para la entrega del gen de la GS hacia el músculo esquelético, el bacGS (Torres-Vega *et al.*, 2015). En este estudio se demostró que el bacGS transdujo eficientemente células L6 (mioblastos) y células MA104 (células epiteliales de riñón), generando una sobreexpresión de la proteína GS; y con ello se obtuvo una disminución de casi el 50% en los niveles de amonio en el medio de cultivo hiperamonémico de estas células. Interesantemente, cuando el bacGS se evaluó *in vivo*, en un modelo animal de hiperamonemia aguda, los niveles de amonio en sangre también se redujeron significativamente. Por ello, se planteó al bacGS como un vector prometedor para la terapia génica de la hiperamonemia aguda.

Sin embargo, se ha descrito otro grupo de pacientes en los que la hiperamonemia llega a ser crónica, generando daños aún más severos. Desafortunadamente, se ha reportado que la expresión *in vivo* de los transgenes entregados por un baculovirus es temporal, motivo por el que sería necesaria una re-administración del virus recombinante. Además, se sabe que el baculovirus desencadena la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, provocando una reducción de la expresión del transgen después de una segunda administración del vector (Pieroni *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2013). Por tales motivos, este tipo de vector no podría ser utilizado en el tratamiento de una hiperamonemia crónica.

Con la finalidad de establecer una terapia génica para tratar la hiperamonemia crónica en pacientes con EH, en este trabajo planteamos el uso de vectores de VAA con tropismo hacia el músculo esquelético, para la entrega del gen de la GS hacia este órgano, con la finalidad de lograr una sobreexpresión prolongada de la GS. De esta forma, este órgano auxiliará en la detoxificación del amonio excedente. Esta terapia génica también podría ser utilizada en el tratamiento de pacientes con desórdenes del ciclo de la urea y en hiperamonemias producidas por otros factores no relacionados con una falla hepática.

3. HIPÓTESIS

La aplicación en el músculo esquelético de los vectores de VAA1 y VAA8 portando el gen terapéutico de la GS inducirá una sobre expresión de la GS y por ende, una disminución de los niveles de amonio en un modelo de hiperamonemia crónica en rata.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer un modelo de terapia génica con los vectores de VAA1 y VAA8 portando el gen de la GS para el tratamiento de una hiperamonemia crónica experimental.

4.2 Objetivos particulares

1. Generar los baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8, que contendrán los genes *rep* del serotipo 2 de VAA y *cap* de los VAAs de los serotipos 1 y 8 respectivamente, ambos con un tropismo hacia músculo esquelético.
2. Producir los vectores VAA1 y VAA8 mediante el sistema células de insecto-baculovirus, por co-infección de los baculovirus duales Bac Rep-Cap y Bac GS+, Bac GS- ó Bac GFP.
3. Purificar, caracterizar, cuantificar y evaluar la formación de partículas de vVAA generadas en el sistema de células de insecto-baculovirus.
4. Evaluar *in vitro* la capacidad de los vectores VAA1GS+ y VAA8GS+ de mediar la sobre expresión de la proteína terapéutica GS.
5. Generar un modelo *in vivo* de hiperamonemia crónica.
6. Determinar en el modelo *in vivo* de hiperamonemia crónica la capacidad de los vVAA1GS+ y vVAA8GS+ de disminuir los niveles de amonio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Estrategia experimental

El presente trabajo se realizó con la finalidad de desarrollar una terapia génica para tratar la hiperamonemia crónica. La estrategia experimental que se siguió la dividimos en 3 etapas:

- I) Generación de vectores de expresión de baculovirus (VEB), portando los genes de las proteínas Rep y Cap de VAA de los serotipos 1 y 8.
- II) Con los VEB, se produjeron en el sistema células de insecto-baculovirus los vectores de VAA conteniendo el gen de interés, asimismo se llevó a cabo la purificación, la caracterización y la cuantificación de los mismos.
- III) Evaluación de los vectores de VAA tanto *in vitro* como *in vivo*.

La figura 11 resume los principales pasos que se desarrollaron en cada una de las etapas.

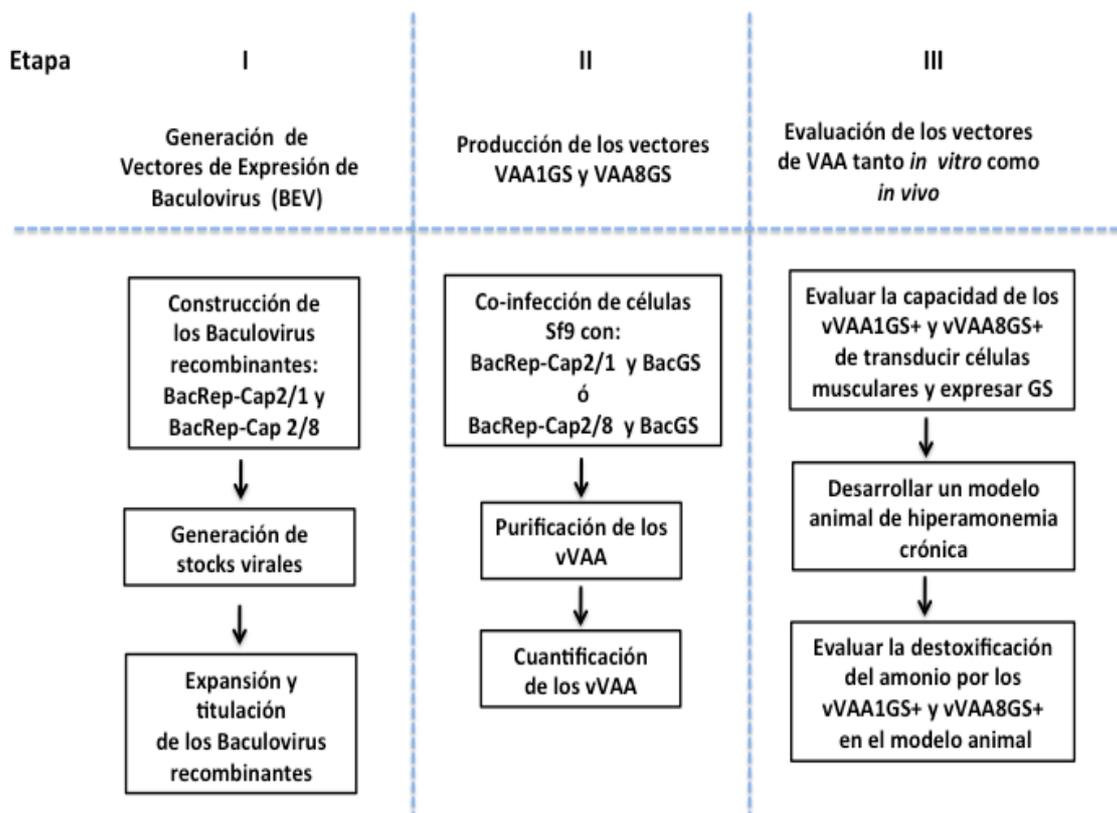


Figura 11. Estrategia experimental del proyecto. Se resumen las 3 etapas y algunas de las metodologías empleadas para el desarrollo del proyecto.

A continuación se detalla la metodología seguida en cada una de las etapas del proyecto.

5.1 Construcción de vectores de expresión de baculovirus (VEB)

5.1.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron construidos por diferentes grupos de investigación y nos fueron amablemente donados. Los plásmidos pSR651, pSR660 y pFBGR fueron construidos por el grupo del Dr. Robert Kotin (NIH, EUA). Los plásmidos pFBCGS-C2 y el pFBSGS-C2 fueron construidos por el grupo del Dr. Torres-Vega y se detallan en Torres-Vega *et al* (2005); mientras que el plásmido pFBGR fue modificado por la Dra. Gallo-Ramírez y se detalla en Gallo-Ramírez (2012). La característica que tienen en común estos plásmidos es que sus casetes de expresión se encuentran clonados en un vector de transferencia pFastBac (Invitrogen™). Los plásmidos pFastBac contienen alguno de los promotores del baculovirus AcNPV, el promotor de poliedrina (*polh*) o el *p10*, que controlan la expresión del gen recombinante, y de un gen de resistencia a gentamicina, así como una señal de poliadenilación del virus SV40, todos estos elementos están flanqueados por brazos del transposón Tn7, conformando así un miniTn7.

pSR651 y pSR660. Están clonados dentro de un pFastBac dual, que contiene tanto el promotor *polh* como el *p10*, por lo que pueden expresar dos genes a la vez. Bajo el control transcripcional del promotor *polh* está la secuencia del gen *rep* del VAA-2, que codifica para las proteínas Rep78 y Rep52, mientras que bajo el control transcripcional del promotor *p10* se encuentra la secuencia del gen *cap* que codifica para las proteínas VPs del VAA1 en el caso de pSR651 (Apéndice I, Figura 32a) o para las VPs del VAA8 en el caso de pSR660 (Apéndice I, Figura 32 b); estos elementos se encuentran flanqueados por elementos de transposición miniTn7. Dichos plásmidos se utilizaron en este trabajo para llevar a cabo mediante la transposición de los casetes con las secuencias génicas de *rep* y *cap*, la generación de los bácmidos y los baculovirus recombinantes *bac rep-cap 2/1* y *bac rep-cap 2/8*, mediante el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

pFBCGS. Contiene el casete de expresión con la secuencia del gen de la GS de hígado de rata, bajo el promotor de CMV para su expresión en células de mamífero; una secuencia del intrón de la β globina de pollo, y una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano, estos elementos se

encuentran flanqueados por las ITRs del VAA-2 (Apéndice I, figura 33a). **pFBSGS**. Contiene la misma construcción que el pFBCGS, pero carece de la secuencia codificante para la GS, de tal forma que se usó para la generación de los bácmidos, los baculovirus recombinantes y los vVAA que fungieron como controles negativos, pues en ninguno de ellos codificaba para la GS (Apéndice I, Figura 33b). Cada plásmido por separado fue clonado en el pFastBac (Invitrogen™).

pFBGR. El casete está clonado en el plásmido pFastBac (Invitrogen™), contiene el gen de la proteína GFP bajo el promotor de *p10* para su expresión en células de insecto y bajo el promotor de CMV para su expresión en células de mamífero y se encuentra flanqueado por las ITR del VAA-2 (Apéndice I, Figura 33c).

5. 1. 2 Generación de los bácmidos recombinantes

Se adicionaron 250 ng y 1 µg de los plásmidos pSR651 y pSR660 a 100 µL de células *E. coli* DH10Bac quimiocompetentes, que contienen un bácmido silvestre. Se incubaron en hielo por 30 minutos y luego se sometieron a choque térmico por 1 minuto a 42°C, regresándolas inmediatamente al hielo. Se agregaron 900 µL de medio SOC previamente precalentado a 37°C y se incubaron a 37°C por 4h a 250 rpm. Pasado este tiempo, se sembraron 100 µL de las células en cajas de cultivo con medio LB-agar con 50 µg/µL de kanamicina, 7 µg/µL de gentamicina, 10 µg/µL de tetraciclina, 100 µg/µL de X-Gal y 40 µg/µL de IPTG. Las cajas se incubaron durante 48h a 37°C. Las colonias transformadas que contienen el bácmido recombinante deben presentar un fenotipo blanco, ya que la transposición del transgen interrumpe el gen de la β-galactosidasa, mientras que las colonias no transformadas presentarán un fenotipo azul.

Para confirmar el fenotipo recombinante de las colonias blancas, se eligieron y picaron al menos 10 colonias de cada transformación y se re estriaron en placas nuevas de LB-agar con los antibióticos de selección, así como con X gal e IPTG. Se dejaron incubando toda la noche a 37°C. De aquellas transformaciones de las cuales se confirmó un fenotipo blanco, se tomó una colonia y se inoculó en 5 ml de medio LB + antibióticos de selección (50 µg/µl de kanamicina, 7 µg/µl de gentamicina, 10 µg/µl de tetraciclina). Se dejaron incubando a 37°C en agitación a 250 rpm durante 16-20 h. Posteriormente, los bácmidos se purificaron

utilizando el kit QIAprep miniprep de QIAGEN (QIAprep Miniprep, 2006), siguiendo las especificaciones del proveedor. Finalmente se cuantificó la concentración de los bácmidos mediante un nanodrop y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5. 1. 3 Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR punto final

Para analizar y confirmar el éxito de la transposición de los genes *rep-cap 2/1* y *rep-cap 2/8*, se analizó el DNA de los bácmidos recombinantes mediante PCR punto final, usando combinaciones de oligonucleótidos específicos, que reconocieron diferentes regiones de los genes *rep*, *cap1* y *cap8*. (Tabla 2). Las PCRs se realizaron en un volumen final de 25 µL; usando 1.5 µl de cada oligo (10 uM), 2.5 µl del buffer de la Taq polimerasa (10X), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/µl), 17.5 µl de agua y 1 µl del DNA templado. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 1 ciclo de pre incubación de 3 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 95°C para la desnaturalización, 45 segundos a 55-68°C, según la T_m de los oligos para la hibridación de los oligos a su secuencia blanco, 30 segundos por 3 min (según el tamaño del amplicón) a 68°C para la extensión del amplicón; 1 ciclo a 68°C de 5 min para una extensión final. En el caso de la PCR, para amplificar los fragmentos transpuestos de ambos genes, *rep* y *cap*, con un tamaño de 6989 pb, se usó 1 µl tanto de dNTPs como de enzima Taq DNA polimerasa (5U/µl), aumentando al doble la concentración de los mismos, con respecto a la reacción original. Finalmente, los productos de las PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8-1.2%, para confirmar que tuvieran el tamaño esperado. Los oligos utilizados para estos análisis se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para amplificar diferentes regiones de los genes *rep2*, *cap1* y *cap8* a través de PCR punto final.

Gen a amplificar	Identificación (ID)	Nombre del Oligo	Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3')	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
<i>cap 1</i>	a	M13F:	5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'	66	2 300
		4904AAV1CapR:	5' GCT TCA AAC ACT GCA TTG G 3'		
<i>cap 8</i>	b	M13F:	5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'	66	2 300
		4903AA8VCapR:	5' AGA GAC AAT GCG GAT TAC AG 3'		
<i>cap 1</i>	c	5576AAV1CapF:	5' TTG TGA CGC CAT CAT TCG 3'	60	1 043
		6619Duap10R:	5' TTT ACA ATC ACT CGA CG 3'		
<i>cap 8</i>	d	5578AAV8CapF:	5' CTT GGT GCC TTC ATT CTG C 3'	59	1 041
		6619Duap10R:	5' TTT ACA ATC ACT CGA CG 3'		
<i>cap 1</i>	e	4811AAV1CapF:	5' TGC TCT GGA AAT TGA CTG CC 3'	61	878
		5689AAVCapR:	5' TTC CAC TGC CAC TTT TCA CC 3'		
<i>cap 8</i>	f	4811AAV8CapF:	5' TGC TGC TGC AAG TTA TCT GC 3'	60	878
		5689AAVCapR:	5' TTC CAC TGC CAC TTT TCA CC 3'		
<i>cap 1</i>	g	4811AAV1CapF:	5' TGC TCT GGA AAT TGA CTG CC 3'	61	105
		4904AAV1CapR:	5' GCT TCA AAC ACT GCA TTG G 3'		
<i>cap 8</i>	h	4811AAV8CapF:	5' TGC TGC TGC AAG TTA TCT GC 3'	60	106
		4903AAV8CapR:	5' AGA GAC AAT GCG GAT TAC AG 3'		
<i>rep 2</i>	i	RT-Rep5F	5' ACT CAC GGA CAG AAA GAC TGT TTA G 3'	72	787
		M13R	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'		
<i>rep 2</i>	j	Polh:	5' CCG GAT TAT TCA TAC CGT CC 3'	60	2 512
		M13R:	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'		
<i>rep2-cap1</i> ó <i>rep2-cap8</i>	k	M13F:	5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'	66	6 968
		M13R:	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'		

El nombre de los oligonucleótidos indican la posición en la que hibridan con su respectivo gen. Los oligos universales M13 hibridan en regiones que flanquean a cada uno de los sitios de transposición mini attT_{N7} del báculo recombinante. Tm: temperatura de fusión, F: forward, R: reverse.

5. 1. 4 Cultivo de células Sf9

La línea celular Sf9 son células provenientes de ovario de pupa de la especie *Spodoptera frugiperda*. Estas células se cultivaron en suspensión en medio SF900-II (Invitrogen, USA) libre de suero a 27°C en agitación constante a 110 rpm. La concentración celular se determinó usando un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics Inc. USA), mientras que la viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión con azul tripano, usando una cámara de Neubauer.

5. 1. 5 Transfección de células de insecto con los báculos recombinantes

A partir de los báculos recombinantes se produjeron las partículas de baculovirus Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8. Para ello, en cajas de cultivo de 6 pozos se sembraron 2x10⁶ cél/pozo, en 2 ml de medio TNMF-H sin SFB (Gibco, Invitrogen) y se dejaron adherir por 1 h. Se preparó la solución de transfección: 1 µg de DNA del báculo (*bac rep-cap 2/1* ó *bac rep-cap 2/8*),

20 μ l de lipofectamina y 1 ml de medio TNMF-H libre de SFB y sin antibióticos. Pasado el tiempo de adherencia de las células, se les añadió la mezcla de transfección y se incubaron por 4 h en agitación constante a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se les añadió 1 ml de medio TNMF-H y 10 μ l de antibiótico/antimicótico (Sigma). Las células se dejaron incubando a 27°C durante 96 h en un ambiente húmedo. Las células transfectadas fueron monitoreadas utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300) para detectar efectos citopáticos como una consecuencia de la replicación viral. Al finalizar el periodo de incubación se recuperaron los sobrenadantes, se les agregó SFB al 2% y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente, estos sobrenadantes se utilizaron para realizar un ensayo en placa.

5. 1. 6 Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales

Se sembraron células Sf9 (con una viabilidad mayor al 95%) en cajas de 6 pozos a una densidad de 1.5×10^6 células/pozo en un volumen de 2 ml de medio de Grace sin SFB. Las células se dejaron incubando durante 1 h a 27°C para permitir que se adhirieran. Se prepararon diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} de los stocks virales en medio de Grace. Una vez adheridas las células, se les retiró el medio y se les agregó 0.9 ml de las diluciones virales y se dejaron incubando por 4 h a temperatura ambiente. A continuación se retiró el inóculo y se añadió una capa de 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión (1 volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 3%, 0.8 volumen de medio Grace 2X, 0.2 volumen de SFB) a una temperatura de 37°C. Las cajas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo por 96 h. Pasado este tiempo, a cada pozo se le añadió 2 ml de una segunda capa de agarosa (1 volumen de agarosa al 1.2%, 0.8 volumen de medio de Grace 2X, 0.2 volumen de SFB, 0.02 volumen de rojo neutro al 1%) y se incubaron a 27°C por 4 h en un ambiente húmedo. Posteriormente, se identificaron las placas virales por la formación de halos incoloros. Dichos halos indican que las células de esa zona están muertas, presumiblemente a causa de la infección por el baculovirus, por lo que son incapaces de retener el colorante. Las placas seleccionadas se colectaron picando el agar con una punta estéril y se re suspendieron en 1 ml de medio Grace 1X con 0.5% de SFB. Las placas virales seleccionadas se sometieron a un primer ciclo de amplificación, con la finalidad de incrementar el número de baculovirus e

identificar cuál de las placas aisladas produce una mayor cantidad de proteína recombinante. Esta determinación se realizó mediante Western Blot.

5. 1. 7 Propagación de stocks virales a partir de placas aisladas

Una vez que se tuvo identificado al baculovirus que fue capaz de generar la mayor cantidad de proteína recombinante, se procedió a generar los stocks virales del mismo. Para ello, se infectaron 30 ml de células Sf9 en medio SF-900 II a una concentración de 1×10^6 cél/ml con 100 μ l del sobrenadante recuperado de la infección de células Sf9 en cajas de 6 pozos. A las 96 hpi, los cultivos se cosecharon y centrifugaron a 1000 xg. El sobrenadante se colectó y almacenó cubierto de la luz a 4°C añadiendo 2% SFB. A estos stocks virales se les denominó stock pase 1 (P1). La propagación de los posteriores stocks virales se realizó infectando cultivos de células Sf9 en medio SF-900II a una concentración de 1×10^6 cél/ml usando una MDI de 0.1 ufp/cél.

5. 1. 8 Determinación de títulos virales para baculovirus

La titulación de los baculovirus recombinantes se realizó mediante la metodología desarrollada por Mena *et al.* (2003) y que a continuación se describe. Para estos ensayos se utilizaron cultivos de células Sf9 con una viabilidad mayor al 95%. Se inocularon cajas de 96 pozos de fondo plano (Corning) con 0.8×10^6 células/pozo en 50 μ l de medio SF900-II libre de suero. En medio SF900-II se prepararon diluciones seriales desde 10^{-1} a 10^{-10} de los stocks virales. Las células fueron infectadas con 10 μ l/pozo de cada una de las diluciones virales, se incluyeron 16 pozos por cada dilución. Adicionalmente, se incluyeron 16 pozos control de células no infectadas, a las cuales se le añadieron 10 μ l/pozo de medio SF900II sin virus. Las placas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo durante 6 días. Transcurridos los 6 días post-infección se añadieron 10 μ l/pozo de una solución de bromuro de 3-(4,6-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/ml y se incubaron durante 2 h. Para precipitar los cristales de MTT formados, las cajas se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min y se retiró el sobrenadante. Los cristales de MTT se solubilizaron con 50 μ l de DMSO. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG, Labtech). Los datos de absorbancia se ajustaron a la ecuación 1 utilizando el paquete Sigmaplot (SPSS, Chicago IL, USA).

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde **Y** es la absorbancia, **Y₀** es la absorbancia mínima (concentración celular viable mínima detectada, 100% de respuesta), **a** es la absorbancia máxima (0% de respuesta), **D** es la dilución, **D₀** es la dilución a la cual la respuesta fue del 50% (1/TCLD₅₀) y **b** es la pendiente. A partir de la ecuación 2 se calculó la dosis letal media del cultivo (TCLD₅₀/ml), donde **V** es el volumen de dilución viral añadida a cada pozo.

$$TCLD_{50} / ml = \frac{1}{D_0 V} \quad (\text{Ecuación 2})$$

La relación entre la TCLD₅₀/ml y la dosis infecciosa media (TCID₅₀/ml) fue determinada por Mena y colaboradores y está determinada por la ecuación 3.

$$\text{LogTCID}_{50}/ml = 0.912(\text{LogTCLD}_{50} / ml) + 1.674 \quad (\text{Ecuación 3})$$

El valor de TCID₅₀/ml obtenido a partir de la ecuación 3 se utilizó para calcular el título viral de las muestras en unidades formadoras de placa (ufp/ml), mediante la ecuación 4.

$$\text{ufp} / ml = TCID_{50} / ml \times 0.69 \quad (\text{Ecuación 4})$$

5. 1. 9 Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de la proteína total se colocaron por triplicado 150 µl de una dilución 1:100 de cada una de las muestras en cajas de 96 pozos y se les adicionó 50 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se preparó una curva estándar a partir de una solución de albúmina bovina (2mg/ml), haciendo diluciones en un rango de 5 a 80 µg/ml, por triplicado. Las muestras se incubaron por 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG, Labtech).

5. 1. 10 Western Blot

Se mezclaron 20 µg de proteína total con buffer de carga 4X (1 ml 0.5 mM Tris pH 6.8, 1.6 ml SDS al 10%, 200 µl azul de bromofenol al 0.2% m/v, 800 µl glicerol y

400 μ l de mercaptoetanol) y se hirvieron 10 min. Estas preparaciones se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% usando buffer Tris-glicina (24.8 mM Tris, 0.192 mM glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF en sistema semi-húmedo a corriente constante de 250 mA durante 1 h usando buffer de glicina (192 mM glicina, 25 M Tris, 20% etanol). Después, las membranas se incubaron 2 h en solución de bloqueo (PBS-T, PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevaron a cabo 3 lavados de 5 min cada uno con buffer PBS-Tween 20 al 0.1%. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Para la detección de las VPs de los VAA se utilizó el anticuerpo comercial Fitzgerald 10R-A114a (1:2500). Para detectar GS se usó anti-GS (1:1000, MAB302 Millipore) y para Actina se usó anti- β -actina (Dil 1:2000, Santa Cruz). Pasado el tiempo de incubación, se repitió el lavado de las membranas con PBS-T. Posteriormente, se incubaron por 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo marcados con peroxidada), preparados a una dilución 1:5000 en PBS-T. Se lavaron las membranas como ya se ha descrito y se revelaron con una solución de carbazol (4.9 ml de carbazol a 8 mg/ml, 12 ml de buffer de acetatos 0.05M pH 5.5, 30 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%), o bien con un sustrato quimioluminiscente (Pierce Thermo). La visualización de las imágenes se llevó a cabo con el equipo ChemiDoc XRS-Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mientras que los análisis densitométricos fueron realizados con el software Image Lab™ 6.0.1 de BioRad.

5. 1. 11 Dot Blot

La presencia de partículas de VAA ensambladas fue determinada mediante la técnica de Dot-Blot, usando un anticuerpo monoclonal específico para epítomos conformacionales presentes solo en las partículas de VAA completas (A20 Progen, Biotechnik, No. Cat. 61055). Se tomó un volumen de 5 μ l de las muestras a analizar y se realizó una dilución 1:20 en PBS-MK. Las muestras fueron pipeteadas sobre una membrana de nitrocelulosa montada en un equipo Bio-Dot SF (Biorad, USA) conectado a una bomba de vacío. Se aplicó vacío hasta que las muestras fueron completamente filtradas a través de la membrana. Las membranas se bloquearon con PBS-T y 5% de leche durante 1 h y posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS-T. Las membranas se incubaron

toda la noche a 4°C con el anticuerpo A20 preparado en PBS-T a una dilución 1:1000. Al final de la incubación se hicieron tres lavados con PBS-T y se incubó durante 1 h con el anticuerpo anti Ig-G de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas fueron reveladas usando solución de carbazol. La visualización de las imágenes fue realizado con el equipo ChemiDoc XRS-Imaging System (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

5. 2 Producción, purificación y cuantificación de vVAA

5. 2 .1 Producción de vectores de VAA (vVAA)

Para llevar a cabo la producción de vVAA portando los genes GS ó GFP, se co-infectaron cultivos celulares de Sf9 con los baculovirus Bac RepCap 2/1 ó Bac RepCap 2/8 y los baculovirus BacGS+, BacGs- ó BacGFP, utilizando una MDI de 5 ufp/célula de cada uno de los baculovirus. Dichos cultivos se dejaron incubando a 27°C en agitación constante durante 72 h o bien, hasta que la viabilidad celular fue menor al 30%. Pasado este tiempo, el cultivo celular infectado fue recuperado y centrifugado a 2000 rpm, durante 10 min. Finalmente, se recuperó el pellet celular y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

5. 2. 2 Recuperación de cápsides de vVAA

Para la recuperación de las cápsides de los vVAA, se utilizó el método reportado por Chahal *et al.* (2007), que a continuación se describe brevemente. El pellet celular proveniente de un cultivo co infectado, se resuspendió a una concentración de 10×10^6 cél/ml en buffer de lisis (Tris-base 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM y benzona 5U/ 1×10^6 cél, pH 7.5). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadió 1/10 volumen de $MgSO_4$ 375 mM para alcanzar una concentración final de 37.5 mM y se incubó nuevamente por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de congelado-descongelado utilizando hielo seco-baño María a 37°C. Las muestras se centrifugaron a 625 xg durante 15 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C, para posteriormente usarlos para la purificación de las cápsides de los vVAA.

5. 2. 3 Purificación de cápsides de VAA por gradientes de Iodixanol

La purificación de las cápsides de VAA se llevó a cabo mediante gradientes de iodixanol, siguiendo la metodología propuesta por Zolotukhin *et al.* (1999). Para

ello, se colocaron en tubos Quick Seal de 39 ml (Beckman, No. Catálogo 342414) de forma ascendente, 14 ml de los sobrenadantes provenientes de la sección 6.3, seguidos de 9 ml de iodixanol al 15%, 6 ml de iodixanol al 25 %, 5 ml de iodixanol al 40% y 5 ml de iodixanol al 60%. Los gradientes fueron centrifugados a 63 000 rpm durante 2 h a 18°C, utilizando un rotor 70Ti de ángulo fijo (Beckman) y una ultracentrífuga (Beckman, modelo XL-90). Para colectar las cápsides se insertó una jeringa con una aguja calibre 18G x 1 ½ pulgadas en la interfase que se formó entre las fracciones de iodixanol 40-60% y se recuperó un volumen de alrededor de 4 ml. A las muestras recolectadas se les intercambié el iodixanol por PBS-MK y se concentraron. Para ello, se llevaron a un volumen final de 15 ml agregando PBS-MK, se colocaron en tubos Corning Spin-X UF 20 (100 KDa) y se centrifugaron a 2000 rpm hasta alcanzar un volumen de 1 ml, se reajustó nuevamente a un volumen de 15 ml y se repitió el proceso de intercambio de buffer/concentración durante 4 ciclos más. Finalmente, se recuperaron las muestras, se les agregó ázida de sodio al 0.05% y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5. 2. 4 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para determinar la formación de las cápsides de los vVAA se utilizó MET. Se realizaron diluciones de las muestras con PBS-MK a una concentración de proteína total de 30 µg/ml. De estas diluciones se depositaron 10 µl en la superficie de una rejilla de cobre cubierta de formvar y carbón. Las muestras se dejaron fijar durante 5 min, se retiró el exceso de muestra y se adicionaron 10 µl de una solución de acetato de uranilo al 2% para teñir la muestra negativamente durante 3 min. Se enjuagó el exceso de uranilo con 10 µl de agua milliQ y se permitió que las muestras se secarán. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM900 (Göttingen, Germany), usando un voltaje de 80 kV, con la ayuda de la Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopía Electrónica del IBT, UNAM.

5. 2. 5 Cuantificación de genomas encapsidados

La cuantificación de los genomas de DNA contenidos dentro de los vVAA se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real. Para eliminar el DNA no encapsidado, antes de las qPCR se incubaron 2 µl de las muestras con 50 unidades de DNasa I (Roche Diagnostic) a 37°C por 30 min. Posteriormente, se

incubaron a 95°C durante 10 min, con la finalidad de inactivar a la DNasa y al mismo tiempo desestabilizar las cápsides y así, permitir la liberación del DNA de los vectores. Finalmente, las muestras se colocaron en hielo por 5 min. Los genomas virales encapsidados, se cuantificaron usando el sistema de PCR tiempo real 480 LightCycler de Roche (Roche, Mannheim, Germany). Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de secciones específicas de los genes *gs*, *egfp* y para el promotor de CMV; asimismo se diseñaron pruebas de hidrólisis que se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos y de las sondas empleados para la determinación de genomas encapsidados a través de qPCR tiempo real.

Secuencia blanco	ID	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Amplificación (pb)
Fragmento del promotor de CMV	CMV-F	5'- GCA GAG CTC GTT TAG TGA ACC -3'	52	62 nt
	CMV-R	5'- GAG GTC AAA ACA GCG TGG AT -3'	50	
	CMV-P	5'- CCT GGA GA -3'		
Fragmento del gen <i>gs</i>	GS-F	5'-AGT CTG AAG GCT CCA ACA GC -3'	59	61 nt
	GS-R	5'- AAG GGG TCT CGA AAC ATG G -3'	59	
	GS-P	5'- CTCCATCC-3'		
Fragmento del gen <i>gfp</i>	GFP-F	5'- CCA TGC CGA GAG TGA TCC -3'	61	62 nt
	GFP-R	5'- GAA GCG CGA TCA CAT GGT -3'	56	
	GFP-P	5'- CTC CAG CA -3'		

ID: Identificación, CMV: Citomegalovirus, GS: Glutamina sintetasa, GFP: Proteína verde fluorescente, Tm: Temperatura de fusión, F: forward, R: reverse, P: pruebas de hidrólisis, marcadas con 6-FAM en el extremo 5' y con TAMRA en el extremo 3'. Cada una de las prueba de hidrólisis o también llamadas sondas, así como los oligos fueron diseñadas en https://lifescience.roche.com/en_mx/brands/universal-probe-library.html CMV-P corresponde a la sonda #80 (No. Cat. 04689038001), GS-P corresponde a la sonda # 58 (No. Cat. 04688554001) y GFP-P corresponda a la Sonda #67 (No. Cat. 04688660001). Todas las sondas pertenecen a la biblioteca universal de sondas para otros organismos.

Los análisis de qPCR se realizaron usando el Master Mix de PCR TaqMan Universal (Roche Diagnostic) con un paso de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95°C por 10 segundos, 72°C por 30 segundos y 40°C por 30 segundos en un termociclador (Light Cycler 2.0, Roche). La determinación del número de genomas encapsidados se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta empleando curvas estándar desarrolladas utilizando como DNA templado secuencias específicas de los plásmidos pFBGR, pFBCGSC2 y pFBSGS. Para ello, cada uno de los plásmidos fue digerido con la enzima de restricción *NotI*, de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante (New England BioLabs, Ipiwich, MA). Posteriormente, se corrieron en un gel de agarosa, de donde se purificaron los fragmentos de interés con el kit de QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La

concentración y pureza de estos segmentos, fueron determinados por un análisis espectrofotométrico con un NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y con esos datos se realizó el cálculo del número de copias de DNA/ μ l.

5. 3 Evaluación *in vitro* e *in vivo* de los vVAA

5. 3. 1 Cultivo de células H9c2

Las células H9C2 son mioblastos derivados de tejido cardiaco de embrión de rata (Kimes & Brandt, 1976). Estas células se cultivaron de forma adherente en medio DMEN suplementado con 10% SFB, 100U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para inducir la diferenciación de estas células hacia miotubos, se permitió que las células alcanzaran una confluencia del 70-80%, llegado este punto se les cambió el medio de cultivo por DMEM suplementado con 1% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin y se permitió que la diferenciación ocurriera a lo largo de 14 días.

5. 3. 2 Transducción de miotubos con los vVAA

Se sembraron células H9C2 en cajas de 6 pozos a una densidad de 7.5×10^4 células/pozo y se permitió que se diferenciaron hacia miotubos. La transducción celular con lo vVAA se llevó a cabo una vez que el tiempo de diferenciación de los cultivos celulares había transcurrido. Se les retiró el medio a las células y se les agregó 750 μ l de medio DMEM libre de SFB y antibióticos. Se agregaron 50 μ l de los vectores de VAA correspondientes (vVAA1GS+, vVAA1GS-, vVAAGFP; vVAA8GS+, vVAA8GS- o vVAA8GFP). Las cajas fueron centrifugadas a 600 xg por 1 h a 26°C. Después de la incubación, el medio fue reemplazado con medio DMEM con 1% SBF y antibióticos. Después de 14 días postransducción, se evaluó la fluorescencia de las células transducidas con los vVAAGFP. Posteriormente, todas las células fueron lisadas para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes por Western blot.

5. 3. 3 Manejo de animales de laboratorio

Todos los experimentos *in vivo* fueron hechos en ratas Wistar macho, con una masa corporal inicial entre 180-200 g. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente controlada (21-22°C), con ciclos controlados de 12 h de

luz/oscuridad, el alimento y el agua se les administró **ad libitum**. Todos los procedimientos realizados a los animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del INCMNSZ a través del protocolo CINVA 267.

5. 3. 4 Transducción *in vivo* con los vVAA

La entrega de los vectores de VAA-1 ó VAA-8 hacia el músculo estriado de las ratas Wistar fue realizada 2 semanas antes de que a los animales se les indujera hiperamonemia por medio de la ligación del conducto biliar. El procedimiento se realizó como se describe en Torres-Vega et al. (2015). Brevemente, 40 µl de los vectores (VAAGS+,VAAGS- ó VAAGFP) de los serotipos 1 u 8, se inyectaron de forma intramuscular en cada uno de los músculos gastrocnemios de las ratas Wistar. Para ello los animales fueron anestesiadas intraperitonealmente con una mezcla de Ketamina (75 mg/kg)/Xilacina (10mg/kg). La entrega del vector fue hecha usando una microbomba de infusión (KdScientific, modelo 200) a una tasa de flujo de 7 µl/min.

5. 3. 5 Ligadura del conducto biliar (LCB)

Los animales fueron asignados aleatoriamente a alguno de los siguientes grupos experimentales: 1) grupo de ligadura del conducto biliar (LCB); 2) grupo "sham", a las ratas de este grupo se les realizó la intervención quirúrgica pero no la LCB y 3) grupo control, sin intervención quirúrgica. Cada grupo estuvo conformado originalmente por una "n" de 7 animales. La hiperamonemia crónica fue inducida en ratas Wistar a través de la ligadura doble del conducto biliar (LCB), procedimiento que se describe brevemente a continuación.

Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con una mezcla de Ketamina (75 mg/kg) (Vetoquinol)/Xilacina (10mg/kg) (Aranda, Lab). Una vez anestesiadas, se rasuró la zona abdominal de las ratas y se les realizó una limpieza aséptica de la zona. Posteriormente, se realizó una incisión ventral de 2-3 cm siguiendo la línea alba. Se identificó el conducto biliar y se realizaron tres ligaduras con material de sutura no reabsorbible 4-0 (Ethicon). Dos de las ligaduras se realizaron en la zona más proximal al duodeno, separadas entre ellas por ~10 mm. La tercer ligadura se realizó por encima de las dos primeras ramificaciones del conducto biliar, en la zona más proximal al hilio hepático. El conducto biliar fue cortado entre las ligaduras proximales al duodeno (Figura

12). A los animales Sham, se les realizó la incisión y se localizó el conducto biliar, pero éste no fue ligado ni cortado. La capa muscular y la piel fueron suturadas con hilo de sutura reabsorbible 3-0 (Ethicon). Se permitió que los animales se recuperaran. Para evitar alguna infección, se les administró antibiótico durante 3 días post-operatorios.

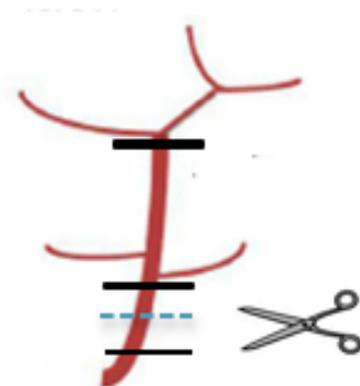


Figura 12. Ligadura doble del conducto biliar. En rojo se muestra el conducto biliar común y sus 5 ramificaciones. Las ligaduras están esquematizadas por las líneas negras. El corte del conducto se realizó entre las dos ligaduras inferiores, representado por la línea discontinua azul.

5. 3. 6 Toma de muestras sanguíneas a ratas Wistar

Las muestras de sangre de las ratas fueron obtenidas a partir de la vena de la cola a la tercer, cuarta y quinta semana después de la transducción de las ratas. Las ratas recibieron anestesia local con lidocaína (15 mg/Kg); posteriormente se les realizó una pequeña incisión en la parte posterior de la cola y así se obtuvo alrededor de 1 ml de sangre. La sangre se colectó en tubos BD Vacutainer con K2-EDTA y se mantuvieron en hielo todo el tiempo. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el plasma de las muestras y se almacenó a -70°C hasta su uso.

5. 3. 7 Desproteinización del plasma sanguíneo

Se trabajó con un volumen fijo de sangre para todas las muestras analizadas. A todas las muestras se les agregó ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$) al 6% en una relación 1:1, se homogenizaron y se mantuvieron en hielo por 15 minutos. Pasado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes, se neutralizaron con bicarbonato de potasio ($KHCO_3$) 2M y se centrifugaron bajo las condiciones

antes mencionadas. Se recuperaron los sobrenadantes y éstos fueron usados para las determinaciones de amonio.

5.3.8 Determinación de amonio

La determinación de amonio se llevó a cabo utilizando el método del indofenol, propuesto por Kaplan (1965). El método consiste en transformar el amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito de sodio. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona. Este método fue adaptado para poder detectar concentraciones de amonio menores a 1.6 mM.

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: Fenol 0.106 M, nitroprusiano de sodio 0.17 M

Solución B: NaOH 0.125 N, hipoclorito de sodio 11 mM

Se preparó una curva estándar antes de cada nueva determinación con NH_4Cl (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM). Para la lectura de los estándares, así como de las muestras a analizar, en tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 12.5 μl de cada uno de ellos. A cada tubo se le agregó 500 μl de la solución A y se mezcló perfectamente. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 500 μl de la solución B y se mezclaron perfectamente. Se dejaron incubando por 30 min a temperatura ambiente, tiempo en el que se permitió que se desarrollara el color azul característico. Se tomaron alícuotas de 250 μl de cada una de las muestras y se colocaron en una placa de 96 pozos. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Epoch 2 (BioTek, USA) a una longitud de onda de 635 nm. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

5.4 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos en los que se realizaron los análisis estadísticos son expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Las comparaciones entre grupos se realizaron a través de un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey; o bien, mediante una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn, cuando se consideró que los grupos no seguían una distribución paramétrica. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas

cuando los valores de p fueron menores a 0.05 ($p < 0.05$) y fueron indicadas con un *. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.0a para Mac Os X, GraphPad Software, San Diego California, USA.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.1 Generación de los bácmidos recombinantes bac rep-cap 2/1 y bac rep-cap 2/8

Los bácmidos se generaron a partir de los plásmidos pSR651 y pSR660, respectivamente, usando el sistema de expresión de baculovirus, bac to bac (Invitrogen™). Como se esperaba, fue posible la distinción de las colonias con el bácmido recombinante (blancas) de las colonias con bácmido no recombinante (azules) usando X-gal como marcador de selección (Figura 13).

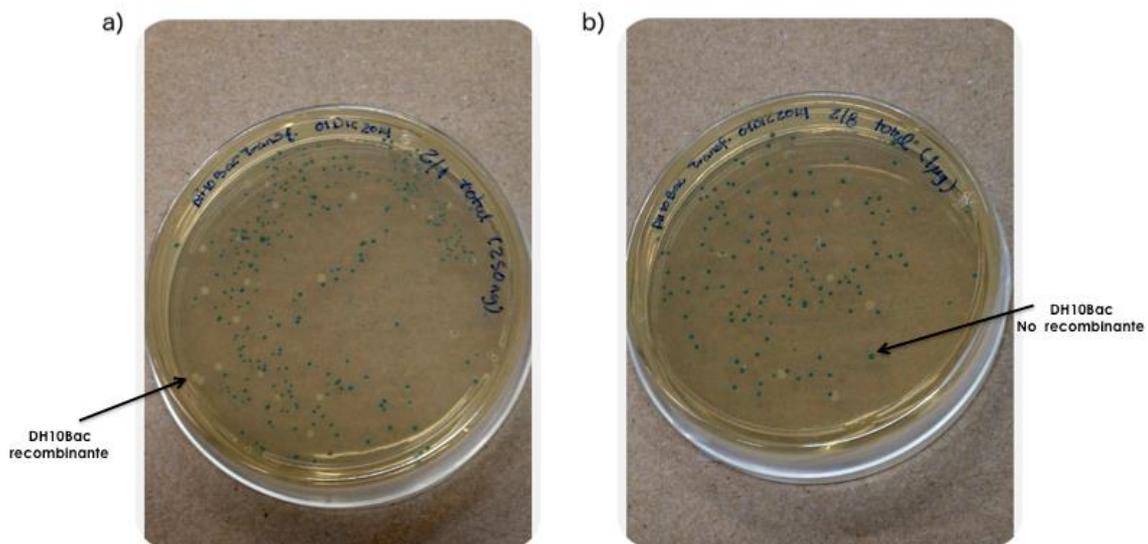


Figura 13. Colonias bacterianas DH10Bac transformadas con: a) pSR651 y b) pSR660. Las colonias blancas probablemente contienen el bácmido recombinante, mientras que las colonias azules no contienen el bácmido recombinante.

Para confirmar el fenotipo de las colonias blancas, se eligieron y picaron algunas de estas colonias para ser re-estriadas en placas nuevas de LB-agar con los antibióticos de selección, X gal e IPTG. Se observó que dichas colonias mantuvieron su fenotipo blanco. Por lo que se seleccionaron al menos cinco colonias bacterianas recombinantes candidatas.

6.1.2 Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR punto final

Las colonias bacterianas recombinantes seleccionadas se analizaron por PCR de colonia para determinar la presencia del inserto que contiene los genes *rep2* y *cap1* ó *cap8*. Para ello se eligió un par de oligos (aa') para amplificar una región específica del gen *cap1* y *cap8* (bb)' así como un par de oligos (ii') para amplificar una región específica del gen *rep2* y así confirmar su presencia. En la

figura 14, podemos observar las colonias que presentaron los amplicones en el tamaño esperado, 2.3 kb para los genes *cap1* y *cap 8*, y 787 pb para el gen *rep2*.

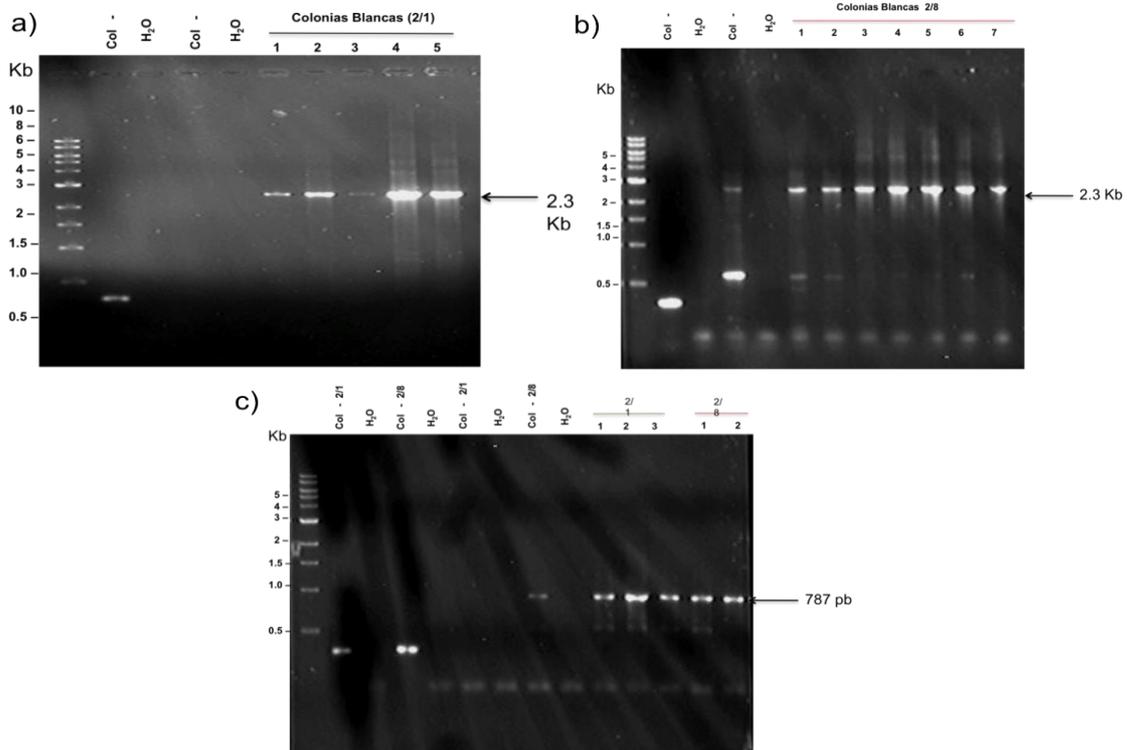


Figura 14. Amplificación por PCRs de colonia en DH10Bac transformadas con pSR651 y pSR660. Se utilizaron pares de oligos específicos para amplificar secciones del a) gen *cap1*, b) del gen *cap8* y c) del gen *rep2*. Se seleccionaron colonias blancas candidatas a contener el b́acmido recombinante de inteŕs y colonias azules como control negativo, en donde no ocurrí ninǵn evento de transposicín. Las secuencias de los pares de oligos (aa'), (bb') y (ii') se referencian en la tabla 2 en la seccín de materiales y ḿtodos.

Los b́acmidos recombinantes fueron purificados a partir de estas colonias. Sin embargo, debido a que dichos b́acmidos contienen insertos de gran tamańo (6,968 pb), cabe la posibilidad de que los genes de inteŕs no se hayan insertado correctamente, quiź por la **deleccín, inversín** o **translocacín** de alǵn fragmento de las secuencias. Por ello, resultó de inteŕs usar oligos anidados que reconocieron secciones espećficas ḿs pequeńas, tanto del gen *rep2* como de los genes *cap1* ó *cap8* (tabla 2), y sumando estos fragmentos se completó la amplificacín de ambos genes en su totalidad (Figura 15).

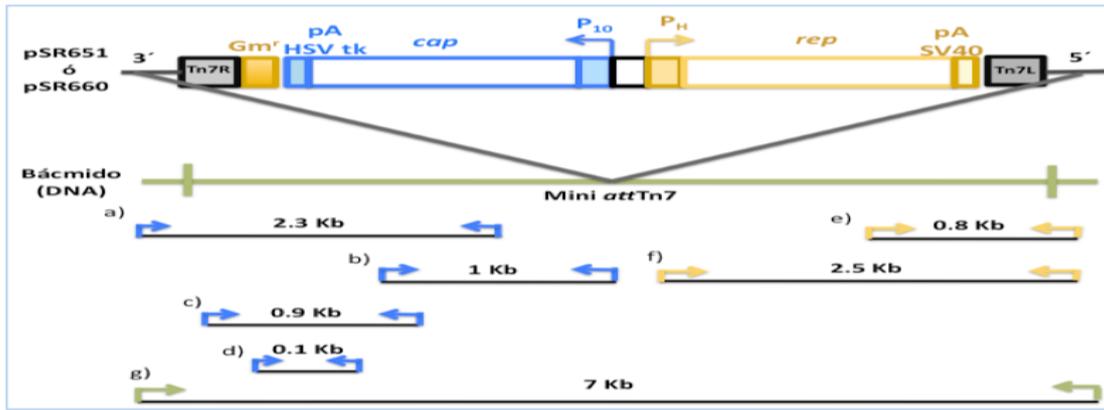


Figura 15. Región de transposición de los genes rep-cap. Esquema que indica las regiones reconocidas por los oligonucleótidos (representados como flechas) usados para amplificar secciones específicas del gen *rep2* y de los genes *cap 1* ó *cap 8* dentro de los báculos recombinantes. Se muestra el tamaño de los amplicones esperados. Kb: kilobases, pA HSV tk: Señal de poliadenilación de timidina cinasa de virus del herpes simple, pA SV40: Señal de poliadenilación del virus de simio (SV40), p10: promotor p10 de baculovirus, PH: promotor de polihedrina de baculovirus, Gmr: gen de resistencia a la gentamicina. Tn7L: elemento de transposición izquierdo, Tn7R: elemento de transposición derecho, *cap*: gen que codifica para las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 de los VAA1 ó VAA8, *rep*: gen que codifica para las proteínas no estructurales Rep78 y Rep52 del VAA2, DNA: ácido desoxirribonucleico, Mini attTn7: sitio diana para el transposón bacteriano Tn7.

Las reacciones de PCR realizadas para determinar regiones específicas del gen *rep2*, tanto en el báculo bac rep-cap 2/1 como en el bac rep-cap 2/8, mostraron que los dos fragmentos amplificados de este gen se encontraron en el tamaño esperado (0.8 y 2.5 Kb) (Figura 16 panel a y b). Asimismo, los cuatro fragmentos amplificados de los genes *cap-1* ó *cap-8* (Figura 17a-d) también estuvieron en los pesos moleculares esperados (2.3, 1.0, 0.9 y 0.1 Kb).

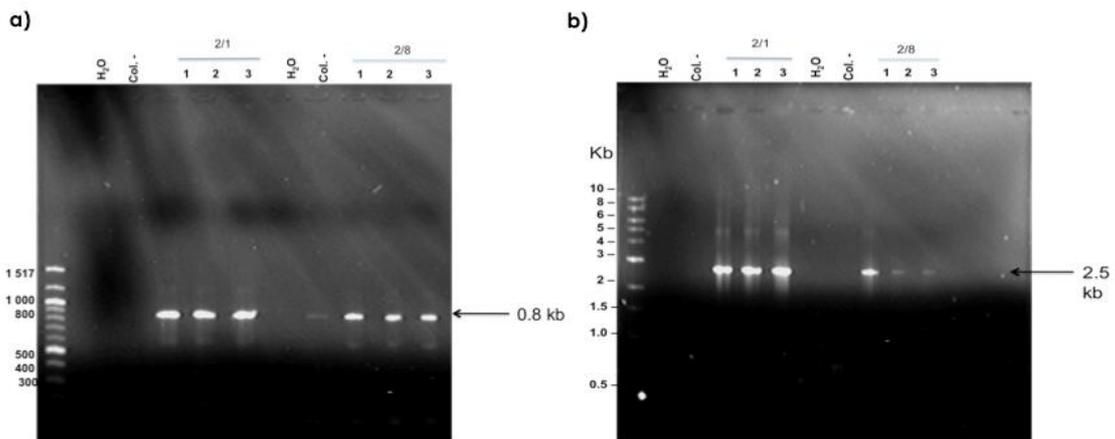


Figura 16. Amplificación por PCR del gen rep de los báculos bac rep-cap 2/1 y bac rep-cap 2/8. La amplificación se realizó usando los pares de oligos identificados como ii' y jj', que reconocen secciones específicas del gen *rep2*. La secuencia de los oligos utilizados para estas amplificaciones se encuentran referenciadas en la tabla 2, en la sección de materiales y métodos. El tamaño de los amplicones fueron 0.8 y 2.5 Kb, respectivamente.

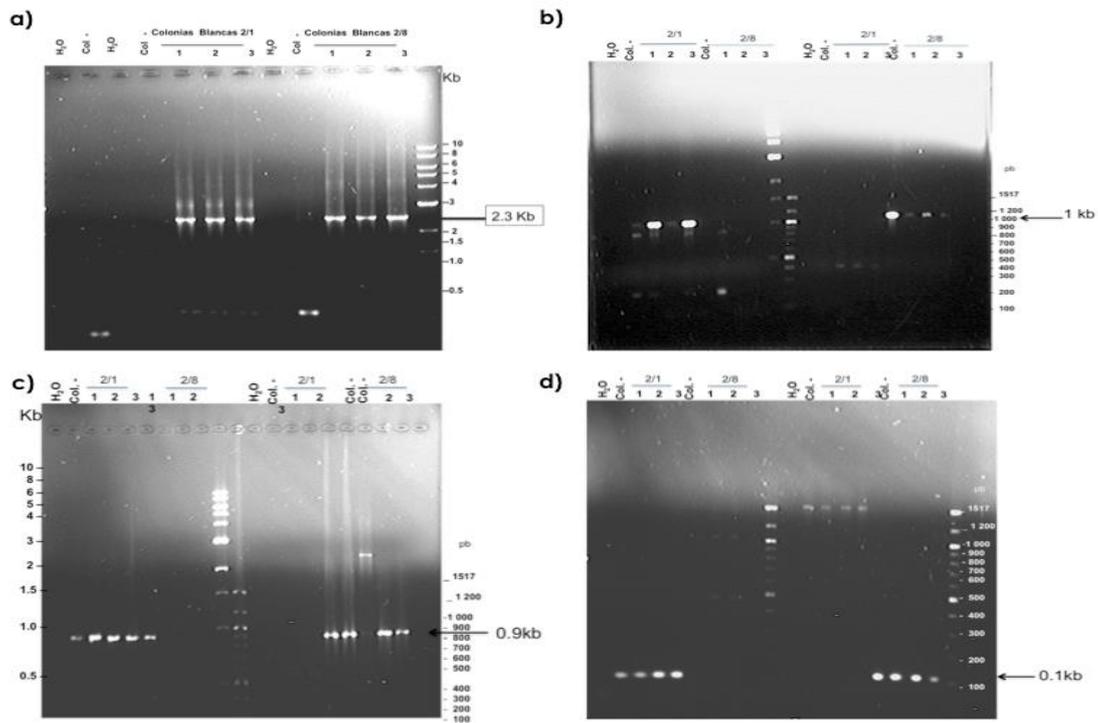


Figura 17. Amplificación por PCR de los genes *cap1* y *cap8* presentes en los b́acmidos *bac rep-cap 2/1* y *bac rep-cap 2/8*. La amplificación se realiz3 usando oligos que reconocen secciones específicas de los genes *cap1* y *cap8*. Las secuencias de los oligos utilizados para estas amplificaciones se encuentran referenciadas en la tabla 2, en la secci3n de materiales y m3todos. Los pares de oligos utilizados en cada panel son: aa 'y bb', cc' y dd', ee'y ff', gg'y hh', referenciadas en la tabla 2 de la secci3n de materiales y m3todos. Los tamaños de los amplicones fueron de 2.5, 1.0, 0.9 y 0.1 Kb, respectivamente.

Finalmente, para confirmar la presencia del inserto completo, se realiz3 una PCR utilizando los oligos universales M13 F y M13 R, los cuales hibridan en regiones que flanquean a cada uno de los sitios de transposici3n miniattTN7 del b́acmido (Figura 15). Utilizando estos oligos se pueden obtener al menos dos productos de amplificaci3n. El b́acmido que no ha sufrido transposici3n con el casete de inter3s genera un producto de 300 pb. El b́acmido que ha sufrido transposici3n con el casete de inter3s genera un producto cuya longitud es igual a 2.3 kb + la longitud de los genes recombinantes. En este caso, la longitud del casete de expresi3n que contiene los genes *rep-cap* es de 4 668 pb, por lo que el producto de amplificaci3n deber3a ser de 6, 968 pb.

Mediante el an3lisis de PCR con los oligos M13F y M13R se corrobor3 la presencia del inserto completo con los genes *rep* y *cap*, al obtener productos de amplificaci3n de alrededor de 7 kb tanto para las colonias transformadas con el pl3smido pSR651 usado para generar el b́acmido *bac rep-cap 2/1*, como

para las colonias transformadas con el plásmido pSR660 usado para generar el báculo *bac rep-cap 2/8*, (Figura 18).

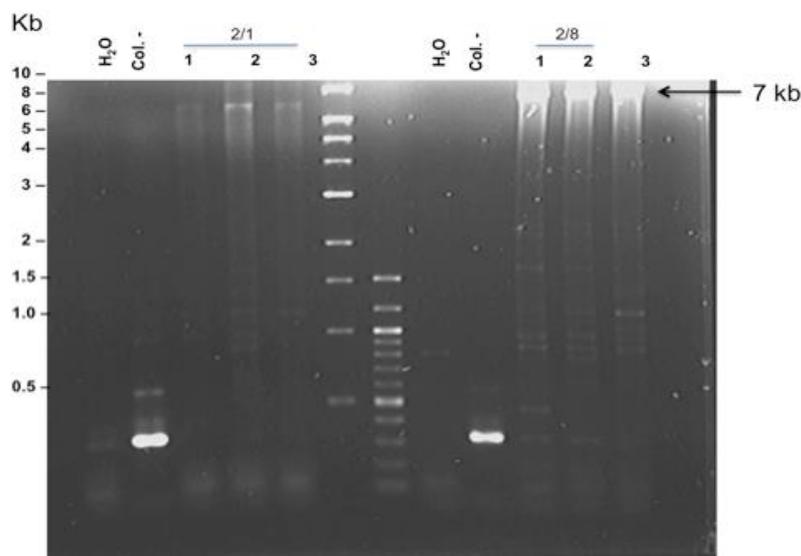


Figura 18. Amplificación por PCR de colonias DH10Bac transformadas con los plásmidos pSR651 ó pSR660. La amplificación se realizó usando los oligos universales M13F y M13R, con los que se amplificaron los insertos completos con un tamaño aproximado de 7 kb. El número de carril indica el número de colonia asignado a cada colonia bacteriana. Col (-): Colonia no recombinante.

6.1.3 Generación de los baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8

Una vez que se confirmó la presencia íntegra de los genes *rep2* y *cap1* ó *cap8* en los báculos recombinantes aislados (*bac rep-cap 2/1* y *bac rep-cap 2/8*), se eligieron los báculos cuyos análisis de PCR resultaron en los tamaños de amplicones esperados. Con estos báculos se **transfectaron** células de insecto Sf9 y de esta forma se generaron las partículas de baculovirus recombinantes respectivas. Resultó fácil identificar a través de un microscopio invertido, aquellas células en donde se estaban produciendo los baculovirus, pues éstas presentaron signos citopáticos generados ante una infección viral. Algunos de estos signos son aumento en el diámetro celular, así como en el tamaño del núcleo celular, apariencia granular, arresto del crecimiento, desprendimiento y lisis celular (Williams *et al.*, 1997; Palomares *et al.*, 2001).

Los baculovirus son virus líticos, por ello 72 hpi se pudo recoger la primera generación de baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8, directamente de los sobrenadantes de las células transfectadas. A dichos baculovirus se les denominó pase 0 (P0), y con ellos se realizaron ensayos en

placa para asilar placas virales, que nos dio la posibilidad de obtener baculovirus recombinantes provenientes de una sola clona viral. A partir de estas placas virales se determinó mediante WB, cuál de ellas fue la mejor productora de proteína recombinante, en este caso de las VPs de los VAA1 y VAA8. Para ello se usó el anticuerpo monoclonal Fitzgerald 10R-A114a, que reconoce a las 3 VPs de los VAA, mediante la unión a un **epítopo** en su extremo C-terminal (aa 726-733) (Wobus *et al.*, 2000). Se observó que todas las placas virales de los baculovirus Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8 seleccionadas, produjeron las proteínas VPs de los VAA, tanto del serotipo 1 como del 8. Sin embargo, la placa 6 del Bac Rep-Cap 2/1, así como la placa 6 del Bac Rep-Cap 2/8, presentaron los mayores niveles de producción de VPs (Figura 19, panel a). Por tal motivo, estas placas fueron seleccionadas para amplificarlas y así obtener los stocks virales (P1 y P2) de dichos baculovirus recombinantes. En estas nuevas amplificaciones se evaluó la producción de baculovirus recombinantes, a partir de la expresión de la proteína gp64 (Figura 19, panel b). Gp64 es una glicoproteína del baculovirus que se expresa en la etapa tardía de la infección viral, pues es la responsable de reconocer el receptor de las células diana y así poder extender la infección viral. Es por ello, que esta proteína se usa como un marcador de la producción de baculovirus. Además se volvió a evaluar la expresión de las proteínas recombinantes VPs de los VAA1 y VAA8, pero esta vez en las amplificaciones de los stocks de los baculovirus recombinantes que fueron utilizados más adelante para la producción de los vectores de VAA (Figura 19, panel c).

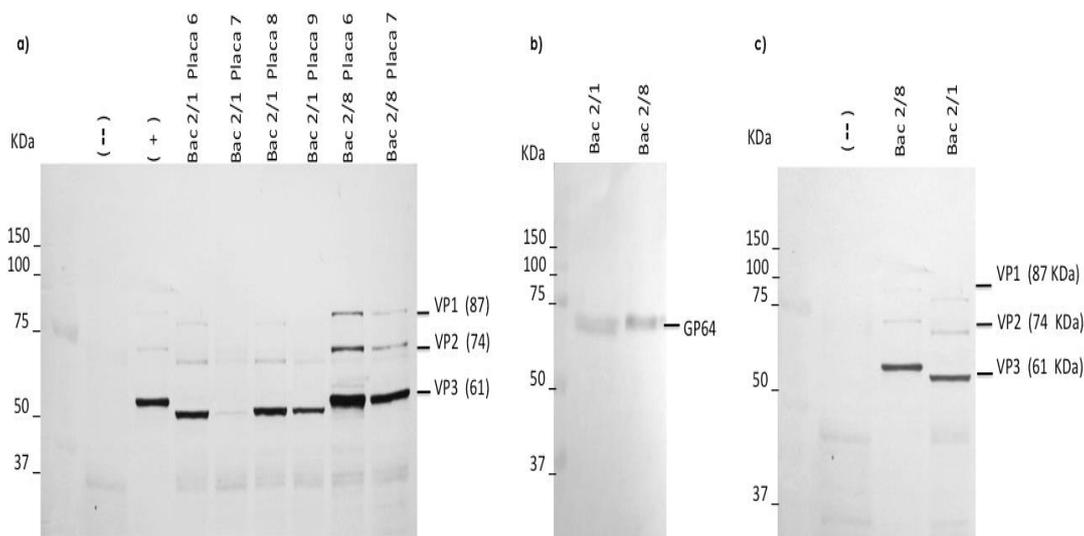


Figura 19. Análisis por Western Blot de los baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap 2/8. Para corroborar la expresión de las proteínas: a) VPs de los VAA a partir de los extractos de células Sf9 infectadas con diferentes placas virales. b) Identificación de la proteína GP64 del baculovirus en amplificaciones secundarias de los baculovirus recombinantes (P1). c) VPs de los VAA en stocks de baculovirus recombinantes P1. El control (-) corresponde a células Sf9 sin infectar; mientras que el control (+) corresponde a células infectadas con un baculovirus Bac Rep-Cap2/8 probado con anterioridad.

Estos stocks de baculovirus recién generados, junto con los stocks de baculovirus Bac GS+ (P1), Bac GS- (P1) y Bac GFP (P2), previamente producidos en nuestro laboratorio, fueron amplificados y titulados mediante un ensayo de viabilidad, siguiendo la metodología propuesta por Mena *et al* (2003). En la tabla 4 se muestra el número de pase y los títulos de los stocks de los baculovirus recombinantes utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Baculovirus recombinantes utilizados en este trabajo y su título viral.

Baculovirus recombinante	# Pase	Título viral (ufp/ml)
Bac Rep-Cap 2/1	P2	1.23×10^8
Bac Rep-Cap 2/8	P2	2.72×10^8
Bac GFP	P3	6.57×10^8
Bac GS+	P2	1.07×10^8
Bac GS-	P2	2.39×10^8

Bac Rep-Cap 2/1: baculovirus que contiene las secuencias génicas de las proteínas Rep78 y 52 del VAA2 y Cap del VAA1; Bac Rep-Cap 2/8: baculovirus que contiene las secuencias génicas de las proteínas Rep78 y 52 del VAA2 y Cap del VAA8; Bac GFP: Baculovirus que contiene la secuencia génica de la proteína verde fluorescente; Bac GS+: Baculovirus que contiene la secuencia génica de la enzima GS; Baculovirus Bac GS-: Baculovirus sin la secuencia génica de GS; ufp: unidades formadoras de placa.

Uno de los factores importantes a considerar en la producción de proteínas recombinantes por medio de los VEB, es el número de pase de los baculovirus (Palomares *et al.*, 2015). Generalmente, se recomienda mantener el número de pase de los stocks de baculovirus lo más bajo posible, preferentemente por debajo de un pase 6, pues en cada pase los baculovirus pueden ir adquiriendo mutaciones y propiciar la aparición de partículas deletéreas interferentes (Negrete *et al.*, 2008; Palomares *et al.*, 2015). Es por ello que aquí trabajamos con número de pases bajos (P2 y P3) y el título de los mismos se encuentra dentro del rango aceptable para estos números de pase ($1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ ufp/mL) (O'Reilly *et al.*, 1994) según se puede apreciar en la Tabla 4.

En este punto del trabajo, la infección de las células Sf9 con los VEB Bac Rep-Cap 2/1 ó Bac Rep-Cap 2/8, podría estar generando no sólo la presencia de las proteínas VPs (Figura 18c) sino además el ensamble de las mismas. Inclusive al no haber un corrimiento en el marco de lectura para el gen *cap*, también se debe estar expresando la proteína activadora del ensamblaje (AAP) (Sonntag *et al.*, 2010; Sonntag *et al.*, 2011). Por ello, para determinar si después de la infección de las células Sf9 con los baculovirus Bac Rep-Cap 2/1 ó Bac Rep-Cap 2/8 existía la presencia de partículas de VAA ensambladas, se realizó un ensayo de Dot blot, en el cual a diferencia de un Western blot, las proteínas a evaluar no son desnaturizadas. En este ensayo se utilizó el anticuerpo monoclonal A20 para lograr el reconocimiento de las cápsides ensambladas. El anticuerpo A20 presenta reactividad con las cápsides ensambladas de los VAA de los serotipos 1, 2, 6, 8 y 9, al reconocer los **epítomos** conformacionales que se establecen al ensamblarse dichas cápsides (Wobus *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2007). En la figura 20b estos epítomos están representados en color verde y azul turquesa. En el panel superior de la figura 20a se observa el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal A20 de las cápsides ensambladas, tanto en las células que fueron infectadas con el baculovirus Bac Rep-Cap 2/1 como con el Bac Rep-Cap 2/8, pero sólo en los casos en donde la proteína se mantuvo en forma nativa. En los casos en donde las proteínas fueron desnaturizadas por calor a 99°C, no hubo reconocimiento por parte del anticuerpo A20. Este resultado concuerda con el reportado por Chávez-Peña (2011), quien vio una pérdida de los epítomos del anticuerpo A20 por desnaturización de la cápside viral, a partir de los 75°C. La desaparición de este epítomo indica que la cápside ha

perdido su estructura tridimensional, lo que se traduce en un desensamblaje de la misma. Además, como era de esperarse no hubo reconocimiento por parte del anticuerpo A20 en el caso de las células Sf9 que no fueron infectadas con ningún de estos baculovirus. El panel inferior de la figura 20a, muestra la imagen de la membrana teñida con el colorante rojo Ponceau, mismo que se usó para visualizar la presencia de proteína en todos los pocillos analizados.

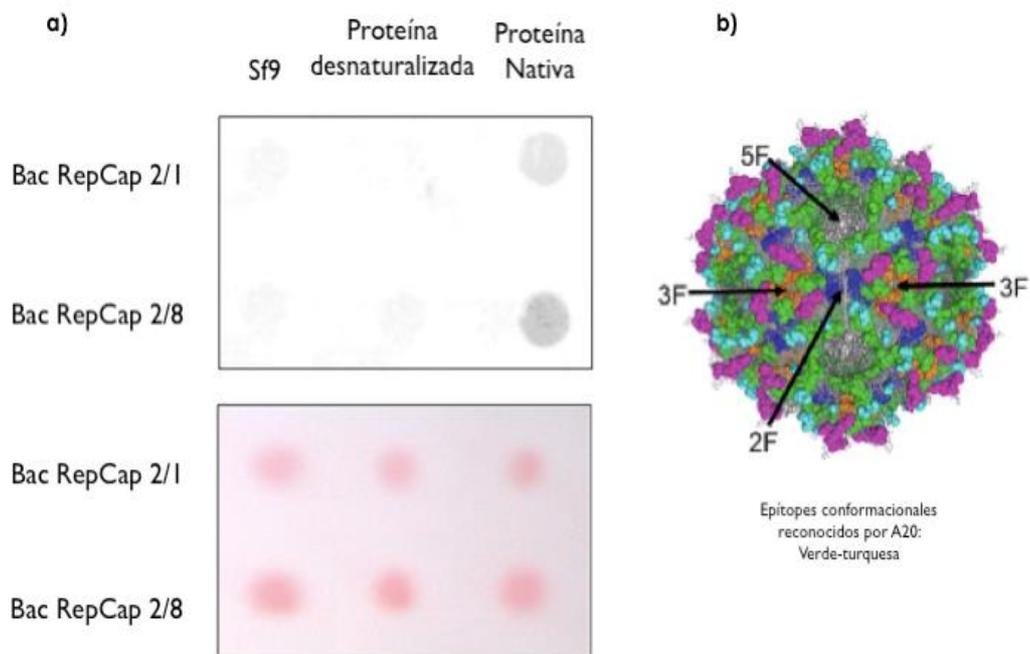


Figura 20. Presencia de cápsides de VAA ensambladas. La presencia de cápsides ensambladas se determine mediante la técnica de Dot blot. a) Presencia de cápsides ensambladas de los VAA1 y VAA8 en los extractos de células infectadas con los baculovirus Bac Rep2-Cap1 ó Bac Rep2-Cap8, determinada por la técnica de Dot -blot, utilizando el anticuerpo A20. b) Representación de la estructura de la cápside de un VAA, en color verde y turquesa se muestran los epítomos conformacionales reconocidos por el anticuerpo A20. Las flechas negras muestran diferentes ejes de simetría de las cápsides de VAA: doble (2F), triple (3F) y quintuple (5F). Imagen tomada de Agbandje-McKenna & Kleinschmidt, 2011.

Estos resultados demuestran que a partir de una infección con los baculovirus recombinantes Bac Rep-Cap 2/1 y Bac Rep-Cap2/8, sí se obtuvieron cápsides de VAA.

6. 2. 1 Producción de vVAA

Las diferentes coinfecciones con los baculovirus recombinantes realizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5. Coinfecciones de células Sf9 con los diferentes baculovirus recombinantes para la producción de los vectores de VAA1 y VAA8

Vector a producir	Baculovirus recombinantes utilizados para la coinfección	
vVAA1 GS+	Bac Rep-Cap 2/1	Bac GS+
vVAA1 GS-	Bac Rep-Cap 2/1	Bac GS-
vVAA1 GFP	Bac Rep-Cap 2/1	Bac GFP
vVAA8 GS+	Bac Rep-Cap 2/8	Bac GS+
vVAA8 GS-	Bac Rep-Cap 2/8	Bac GS-
vVAA8 GFP	Bac Rep-Cap 2/8	Bac GFP

Cada uno de los baculovirus recombinantes se agregó al cultivo celular a una MDI de 5 ufp/célula, dando una MDI total de 10 ufp/célula; la concentración celular al momento de la infección (CCI) fue de 1×10^6 células/mL y el tiempo de cosecha (TDC) de los vVAA se realizó cuando la viabilidad celular fue menor al 30%. Los vectores VAA1 corresponden a VAA del serotipo 1; mientras que los vVAA8 corresponden a VAA del serotipo 8.

Los vectores virales, tanto de baculovirus (bac) como de virus adeno-asociados (VAA) etiquetados con GS+ contienen la secuencia génica de la GS y por ende, pueden mediar la expresión de esta enzima; por el contrario, los marcados con GS- no contienen la secuencia génica de la GS; y los marcados con GFP, contienen la secuencia génica de la proteína reportera verde fluorescente. Así pues, tanto los vectores GS- como los de GFP fueron usados en su momento como controles negativos de la expresión de la GS.

En el SCI-BV existen diferentes variables relacionadas con el proceso de infección, que deben considerarse si se desea obtener mayores cantidades de proteínas recombinantes (Palomares 1999; Palomares *et al.*, 2002), o bien, de partículas de VAA ensambladas correctamente (Gallo-Ramírez, 2002). Algunas de estas variables son la multiplicidad de infección (**MDI**), el tiempo de infección (**TDI**) y el tiempo de cosecha (**TDC**); todas ellas se interrelacionan, se manipulan fácilmente y tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos. En este trabajo, cada una de estas variables se definió con base en reportes previos, que a continuación se discuten brevemente.

La multiplicidad de infección (**MDI**) se refiere al número de partículas virales infecciosas agregadas por cada célula presente en el cultivo, y se expresa como unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula). Para las co infecciones realizadas en este trabajo, se empleó una MDI de 5 ufp/célula para cada uno de los baculovirus utilizados, dando una MDI final de 10 ufp/célula. La

elección de esta MDI se hizo tomando en cuenta que la infección de un cultivo de células de insecto por baculovirus sigue una distribución probabilística de Poisson (de Gooijer *et al.*, 1989). Por lo tanto, es posible predecir el porcentaje de células que será infectado inicialmente en un cultivo, de acuerdo con la MDI utilizada, si se supone que la infección por cada virus es un evento independiente y que la infección primaria es simultánea (Palomares & Ramírez, 1998). Así pues, la probabilidad de que una célula sea infectada por “x” virus está dada por la siguiente ecuación: $P(x) = \frac{(MDI)^x}{x!} e^{-MDI}$. Utilizando dicha ecuación, observamos que el porcentaje de células que sería infectada por al menos 2 virus al momento de la infección, usando una MDI de 5 ufp/cél sería del 91%, mientras que con 10 ufp/cél el 99% de las células estaría infectada por al menos 2 baculovirus. Una ventaja de utilizar el sistema de segunda generación en lugar del de primera generación es que solo se requiere que una célula sea infectada simultáneamente con sólo dos baculovirus diferentes (el BacRep-Cap y el Bac con el transgen de interés) en lugar de tres, para así producir vVAA. Esta reducción disminuye la carga impuesta por la presencia de un mayor número de partículas de baculovirus necesarias para asegurar la expresión en cada célula de todos los elementos necesarios para la producción de vVAA.

Otra de las variables importantes es el tiempo de infección (**TDI**), que suele ser expresado como la concentración celular del cultivo al tiempo de la infección (CCI). Gallo reportó que la mayor productividad de partículas de VAA en el SCI-BV la obtuvo al infectar células de insecto a una concentración de **1x10⁶ células/mL** (Gallo-Ramírez, 2002). Por otro lado, el **TDC** de los vVAA se realizó cuando la viabilidad celular de los cultivos infectados cayó por debajo del 30%, pues se ha reportado que cuando esto sucede ya no hay un incremento significativo en la producción de vVAA (Negrete *et al.*, 2007).

6.2.2 Recuperación y purificación de las cápsides de los vVAA

Uno de los principales desafíos en la producción de vVAA es su recuperación y purificación de todos los demás componentes celulares, VP no ensambladas, baculovirus recombinantes y genomas no encapsidados presentes en el medio, sin que se vea afectada la integridad física y biológica de los vectores. Los vectores de VAA se pueden obtener tanto del sobrenadante de los cultivos celulares como de los extractos celulares (Chávez-Peña, 2011; Doria *et al.*, 2013).

Sin embargo, se prefiere la obtención de los vVAA a partir de los extractos celulares más que de los sobrenadantes, porque en estos últimos se acumula la mayor cantidad de baculovirus, por lo que se hace difícil separar las cápsides de los VAA de estos componentes. Además, los extractos celulares permiten obtener mejores resultados en los procesos de purificación. Para producciones pequeñas, el proceso comienza con la ruptura celular y la liberación de los vVAA; el método más conveniente para ello, es realizar 3 ciclos de congelado-descongelado a -70°C y 37°C respectivamente. Posterior a esto, viene la purificación de los vVAA, proceso que puede llevarse a cabo por varios métodos como gradientes de cloruro de cesio (Negrete *et al.*, 2007), gradientes de iodixanol (Hermes *et al.*, 1999; Zolotukhin *et al.*, 1999), o bien, purificaciones por cromatografías de afinidad, hidrofóbicas o de intercambio iónico (Auricchio *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2002; Zolotukhin *et al.*, 2002).

En este trabajo se realizó la purificación de los vVAA mediante la ultracentrifugación con gradientes discontinuos de iodixanol, pues se ha reportado que este método produce resultados consistentes en varios de los serotipos de los vVAA (Zolotukhin *et al.*, 1999). El iodixanol es una sustancia desarrollada inicialmente como medio de contraste para estudios de rayos X. Su uso como medio para la formación de gradientes en centrifugación se propuso en 1994 (Ford *et al.*, 1994). Gracias a sus propiedades (baja toxicidad, carácter no iónico, isosmótico a concentraciones de trabajo), ha ganado terreno frente a otras sustancias para su uso en la purificación de componentes biológicos. Al finalizar las ultracentrifugaciones, se obtuvieron las diferentes fracciones de los gradientes de iodixanol y se calculó la densidad de cada una de ellas a través del índice de refracción (IR), según se describe en Zolotukhin *et al.* (1999) para así poder determinar en cuál de las diferentes fracciones de los gradientes se encontraban las cápsides vacías y las cápsides con genoma. Se ha reportado que después de la purificación de las cápsides de vVAA por este método, las cápsides vacías presentan una densidad de 1.13 g/ml (Chávez-Peña, 2011), mientras que la densidad de las cápsides llenas es de 1.26 g/ml, sin variar significativamente por el tamaño del transgen (Hermes *et al.*, 1999; Zolotukhin *et al.*, 1999; 2002). Con base en estos antecedentes, se obtuvieron las fracciones de los gradientes que presentaron la densidad correspondiente a las cápsides

llenas y se prosiguió al análisis de dichas fracciones a través de un gel SDS-PAGE, con la finalidad de determinar la pureza de las fracciones recuperadas.

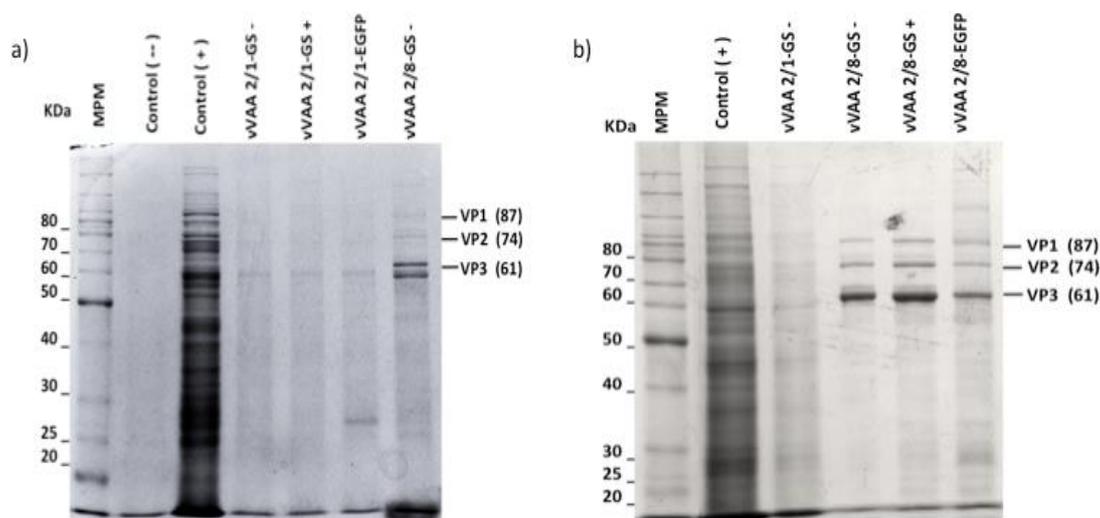


Figura 21. Caracterización de los vVAA1 y vVAA8 purificados por gradientes discontinuos de iodixanol. Análisis en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, a) muestras de los vVAA del serotipo 1 y b) muestras de los vVAA del serotipo 8. MPM: Marcador de peso molecular. Control (-) corresponde a células Sf9 sin infectar. Control (+) corresponde a una muestra de los vVAA antes de someterlas al gradiente de iodixanol.

Los geles de SDS-PAGE (Figura 21 a y b) revelaron que en las muestras sometidas a la purificación por gradientes de iodixanol, los contaminantes proteicos disminuyeron considerablemente, a diferencia de las muestras sin purificar. Las proteínas contaminantes que aún pueden verse en los geles, quizá correspondan a fragmentos de las proteínas VPs degradadas, o bien a proteínas celulares que estén implicadas en la interacción de células-VAA, como las reportadas por Strobel *et al.*, 2015; aunque esto se tendría que determinar en estudios posteriores.

A pesar de que el iodixanol es un agente de contraste clínicamente aprobado y que se ha demostrado que se comporta de forma inerte en roedores y perros (Larsen *et al.*, 1995; Hermens *et al.*, 1999), es recomendable que se lleve a cabo la eliminación eficiente de este compuesto de las preparaciones de los vVAA que serán aplicadas *in vivo*, pues la viscosidad del iodixanol podría disminuir la transducción de los vVAA. Con la finalidad de remover el iodixanol de los vVAA, las muestras se diafiltraron utilizando los dispositivos Amicon Ultra-15 con un MWCO de 100 KDa. Se ha reportado que este método tiene una alta eficiencia

en la recuperación de partículas (>90%) así como en la remoción del iodixanol en donde pasó de un 40%, que es la fracción en donde se recuperan las partículas de los vVAA, a una concentración menor al 0.5% (Strobel *et al.*, 2015).

6.2.3 Identificación de partículas de los vVAA a través de MET

Para verificar la presencia de partículas ensambladas previamente purificadas por los gradientes de iodixanol, se analizaron por MET muestras del gradiente cuya densidad fue de 1.26 g/ml, correspondiente a las cápsides llenas. Esta técnica permite diferenciar rápidamente cápsides empaquetadas de aquellas cápsides vacías. La figura 22 muestra un conjunto de micrografías de los vectores de VAA generados en este trabajo. En ellas, podemos observar la presencia de cápsides con forma icosaédrica, con un diámetro entre 20-25 nm, tamaño reportado para las cápsides de los VAA. Sin embargo, las micrografías también revelaron la presencia de cápsides vacías, las cuales se consideran como impurezas asociadas al producto y son generadas en un número significativo durante el proceso de biosíntesis. Para investigaciones a nivel de laboratorio, las preparaciones de vVAA con una relación de cápsides llenas/vacías de hasta 0.2 puede ser aceptable (Stroble *et al.*, 2015). Sin embargo, la presencia de cápsides vacías en los stocks de vVAA tanto para uso preclínico como clínico representa un problema, porque contribuyen a generar una gran cantidad de antígenos de VAA y por ende, a desencadenar una respuesta inmune innecesaria en animales y humanos. Por ello, es necesario obtener stocks con una menor cantidad de cápsides vacías para aplicaciones *in vivo* de los vVAA.

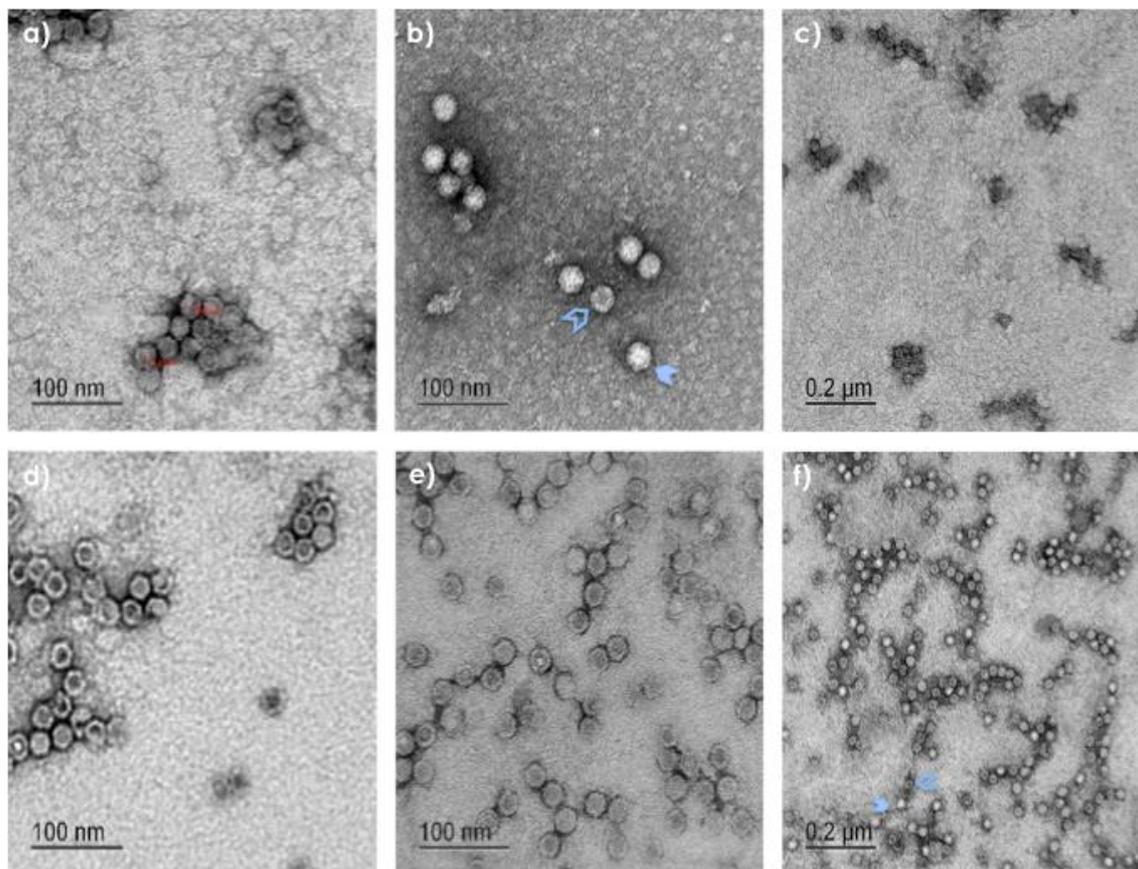


Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión de los vectores de VAA obtenidos en este trabajo. Las partículas recombinantes de VAA fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Los paneles a, b y c corresponden a vectores de VAA1 (GS-, GS+ y GFP, respectivamente); los paneles d, e y f corresponden a vectores de VAA8 (GS-, GS+ y GFP, respectivamente). Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM900 operado a 80 Kv a una amplificación de 50 000X (paneles a, b, d y e) y a 10 000X (paneles c y f). Un ejemplo de cápside vacía está indicado por ➡, un ejemplo de cápside llena está indicada por ➡.

Cabe señalar que en este trabajo los vVAA sólo se purificaron por gradientes de iodixanol. Este método tiene la ventaja de presentar un menor grado de impurezas y de ser más rápido en comparación con otros métodos, como la purificación por gradientes de CsCl (Zolotukin *et al.*, 1999; Strobel *et al.*, 2015). Se ha reportado que cuando los vVAA se purifican mediante una combinación de ultracentrifugación por gradientes de iodixanol y **cromatografía de columna de intercambio iónico**; los vectores no solo muestran menos contaminantes proteicos (Chávez-Peña en 2011); sino además se da un enriquecimiento de cápsides conteniendo el genoma del vector (Urabe *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007), logrando con ello un aumento en la infectividad de los vectores de hasta 100 veces (Zolotukhin *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2014). Así pues, sería conveniente considerar el enriquecimiento de partículas llenas en las muestras de los vVAA.

Entre algunas de las consideraciones metodológicas para esta parte del trabajo, sería conveniente lograr imágenes de MET con un mejor contraste, pues ello nos permitiría discernir mejor e inclusive tener una relación más certera de la proporción de cápsides llenas/vacías de los vVAA. Por lo que sería conveniente seguir algunas de las observaciones de Chávez-Peña, quien demostró que las imágenes de MET de las cápsides de VAA teñidas con acetato de uranilo se contrastaron mejor cuando estuvieron re-suspendidas en un buffer con pH ácido (3-4). Además, habría que encontrar una dilución correcta de las muestras en cuanto a la cantidad de proteína adecuada a agregar por rejilla, pues pareciera que en algunas de las micrografías se presenta un exceso de muestra, lo que impide un correcto recubrimiento de las cápsides con el acetato de uranilo y por ende no existió un buen contraste de las mismas. Por consiguiente, no se consideró el uso de estas micrografías para determinar la relación cápsides llenas/vacías. Sin embargo, es necesario tener una cuantificación de los vectores de VAA, pues es un paso fundamental dentro de la caracterización de los mismos, ya que a partir de estos datos se puede llevar a cabo una dosificación adecuada.

6.2.4 Cuantificación de genomas encapsidados

La cuantificación más aceptada actualmente de los vVAA es aquella que se basa en el número de genomas empaquetados dentro de las cápsides, pues es una medida clave y un indicador del efecto terapéutico (Potter *et al.*, 2002; Werling *et al.*, 2015). Para llevar a cabo la cuantificación absoluta de los genomas, se emplearon curvas estándar generadas a partir de fragmentos específicos de los plásmidos de DNA previamente utilizados para la generación de los bácmidos y baculovirus recombinantes. El pFBCGS (contiene la secuencia del gen de la GS); el pFBSGS (contiene la misma construcción que el plásmido pFBCGS, pero no contiene la secuencia del gen de la GS (por lo que se usó un fragmento del promotor de CMV para su cuantificación) y el pFBGR (contiene la secuencia del gen *gfp*). Para todas las curvas el intervalo de cuantificación que se consideró fue a partir de las diluciones 10^{-5} – 10^{-8} (Figura 23). A partir de las curvas estándares se calculó la concentración total de genomas del vector (gv) para cada uno de los vectores generados en este trabajo. La tabla 6 muestra un resumen de los gv obtenidos a lo largo de la producción de los vVAA.

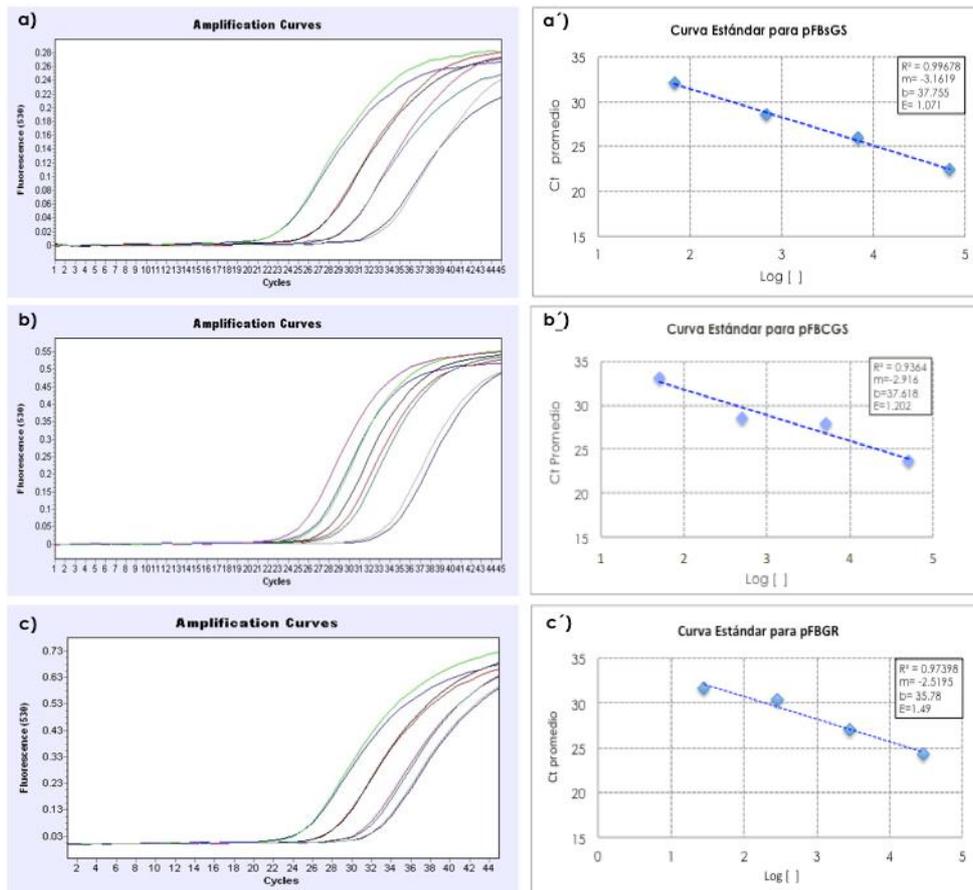


Figura 23. Perfiles de amplificación y curvas estándares de cuantificación absoluta para los vVAA. a, b, c) Perfiles de amplificación de fragmentos específicos de los pFBsGS, pFBCGS y pFBGR usados como estándares de referencia para generar las curvas de cuantificación para el promotor de CMV y los genes *gs*, *egfp*. a', b' y c') Curvas estándares para la cuantificación absoluta de los genomas encapsidados en los vVAAGS-, GS+ y GFP. Ct: = ciclo umbral.

Tabla 6. Resumen de la producción de los vectores de VAA del serotipo 1 y 8, cuantificados por número de genomas.

Serotipo	Transgen	Vol. cultivo (ml)	# células totales	gv total	gv/ml	gv/célula
VAA1	GS-	250	5×10^8	2.24×10^{12}	8.96×10^9	4,480
	GS+	250	5×10^8	5.16×10^{10}	2.06×10^8	103
	GFP	250	5×10^8	8.24×10^{10}	3.29×10^8	165
VAA8	GS-	250	5×10^8	1.43×10^{14}	5.72×10^{11}	286,000
	GS+	250	5×10^8	2.13×10^{13}	8.52×10^{10}	42,626
	GFP	250	5×10^8	1.09×10^{11}	4.36×10^8	219

gv: genomas de vector.

Los títulos de gv totales obtenidos en los vVAA van desde 4.36×10^8 hasta 5.72×10^{11} gv/ml. Si comparamos estos rendimientos de producción de vVAA con los obtenidos por otros autores utilizando el mismo SCI-BV, se está de 3-4 ordenes de magnitud por debajo de los reportados, los cuales van de $10^{12} - 10^{13}$ gv/ml (Negrete *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009). Habrá que revisar y determinar que

parte del proceso se puede mejorar para obtener un mayor rendimiento en cuanto a gv encapsidados se refiere.

La titulación por qPCR es una medida más adecuada del efecto terapéutico de los vVAA que la cuantificación del número de partículas físicas, como lo hacen las titulaciones a través de Dot Blot o ELISA. Adicionalmente, la capacidad transductora de las partículas de VAA puede variar enormemente. Se ha reportado que por cada 1000 vVAA sólo 1 es transductor (Zolotukhin *et al.*, 1999), por lo que este es un dato que debe considerarse en la determinación de las dosis a usar en los ensayo *in vivo*.

6.3.1 Diferenciación de mioblastos/miotubos murinos

En este trabajo se decidió evaluar los vectores de VAAGS+ de los serotipos 1 y 8 *in vitro*, en una línea celular que exhibiera características de miotubos debido a que posteriormente, estos mismos vectores serían entregados hacia el músculo esquelético de ratas para la expresión del gen *gs in vivo*. Por tal motivo, se eligió trabajar con las células H9c2, que son mioblastos mononucleados con capacidad de diferenciarse hacia miotubos al reducirles la concentración de suero en el medio de cultivo (Kimes & Brandt, 1976). Una de las variantes importantes que se debe considerar para permitir la diferenciación hacia miotubos es la densidad celular, de lo contrario las células pueden perder su capacidad para diferenciarse. Después de evaluar diferentes densidades celulares para encontrar aquella que permitiera la diferenciación celular y que permitiera que las células siguieran en condiciones óptimas para realizar los ensayos de transducción celular. Se determinó que la densidad celular de 7.5×10^4 células/pozo para una caja de 6 pozos, es una buena concentración para sembrar las células. Una vez sembradas las células, se permitió que alcanzarán una confluencia del 70-80% (Figura 24a), para posteriormente reducir el porcentaje de SFB de un 10 a un 1% y de esta forma inducir la diferenciación celular hacia miotubos. El suero contiene varios factores de crecimiento que permiten a los mioblastos proliferar sin diferenciarse, cuando estos factores se agotan, los mioblastos detienen su división y comienzan a diferenciarse.

Durante el proceso de diferenciación celular, las células H9c2 desarrollaron diferentes fenotipos. Inicialmente las células fueron planas y se adhirieron

fuertemente a la superficie de la caja. Conforme los cultivos maduraban, comenzaron a asumir diversas formas, pasando por formas poligonales (Figura 24b) que se fueron alineando de forma paralela y uniendo entre ellas, y fueron adoptando una forma alargada (Figura 24c). Cada vez, las células alargadas se hacían más delgadas (Figura 24d y 24e), e inclusive en este último estadio se pudo observar algunas células multinucleares; una de las principales características de los miotubos. Los cultivos de 3 semanas en adelante presentaron un fenotipo en forma de red (Figura 24e y 24f), y conforme los cultivos se hacían senescentes, los miotubos se observaron más brillantes (Figura 24f).

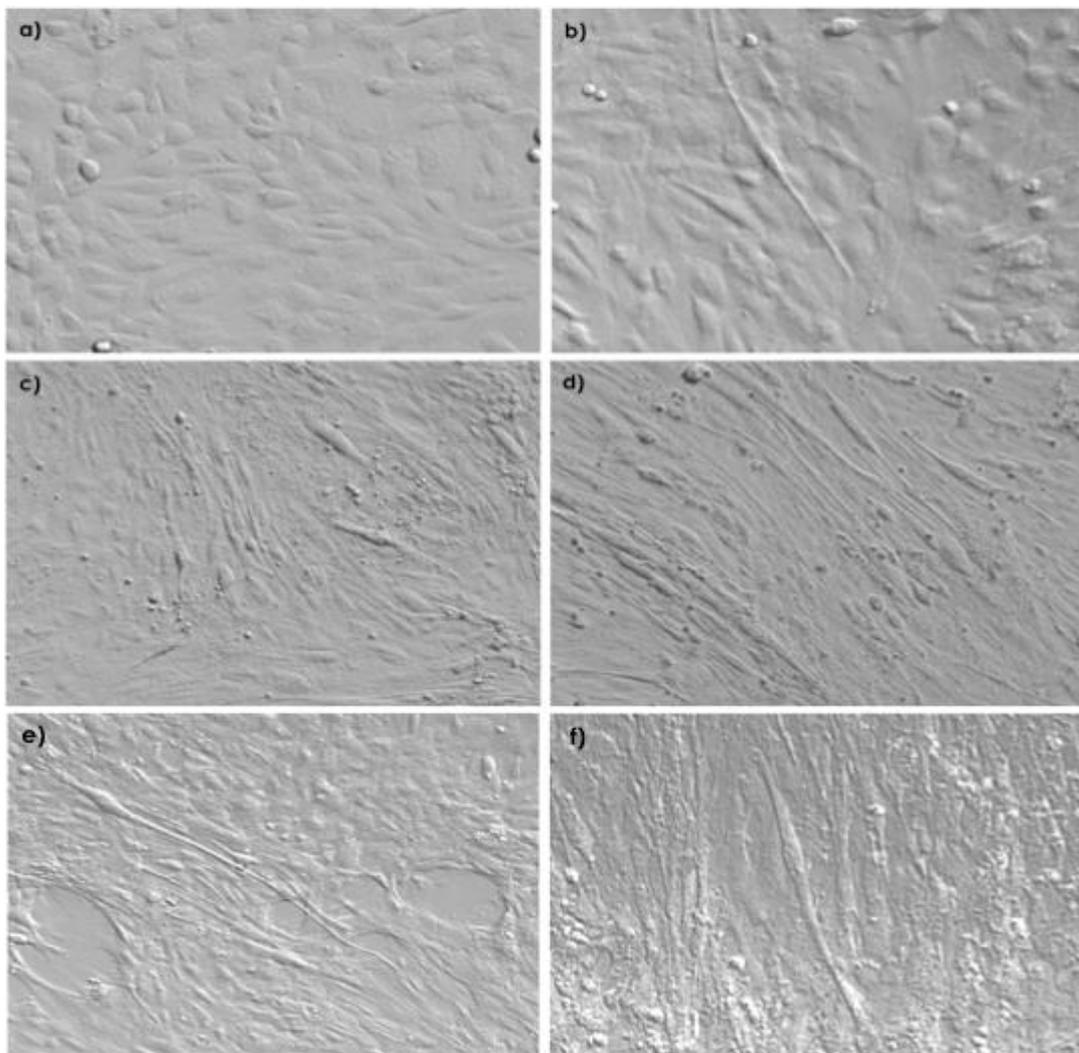


Figura 24. Diferenciación de células H9c2 (mioblastos/miotubos de rata). Las células fueron sembradas a una densidad celular de 7.5×10^4 células/pozo en medio DMEM con 10% SFB. A partir del día 4 (con una confluencia del 80%) y hasta el final de los experimentos, el porcentaje de suero se mantuvo al 1% para inducir la diferenciación celular. Las fotografías se capturaron con un microscopio Olympus IX71 en campo claro a un aumento de 10X. a) Día 4, b) Día 9, c) Día 12, d) Día 15 e) Día 28 y f) Día 35 después de sembradas.

Las transducciones celulares con los vVAA se realizaron cuando los cultivos de H9c2 presentaron un porcentaje de diferenciación entre el 30-40%, pues de lo contrario no alcanzaba el tiempo para lograr la expresión de las proteínas de interés, debido a que por la edad de los cultivos, éstos comenzaban a despegarse de las cajas. El porcentaje de diferenciación en esta línea celular fue de alrededor del 60% al final de los experimentos (5 semanas, Figura 24f). Este porcentaje de diferenciación resultó ser bueno comparado con el logrado en trabajos previos en nuestro laboratorio con la línea celular L6 (mioblastos/miotubos murinos), el cual fue menor al 20%, o bien comparado con el de la línea celular C₂C₁₂ (mioblastos/miotubos murinos), para el cual se ha reportado un 50% de diferenciación al reducirles el porcentaje de suero al 1% (Burattini *et al.*, 2004). Cabe señalar que en la línea celular H9c2, utilizando este mismo procedimiento de diferenciación se ha reportado hasta un 85% de diferenciación celular (Kimes & Brandt, 1976).

Una de las consideraciones metodológicas que se deben de tomar en cuenta en experimentos posteriores, es el reducir el tiempo (2-3 semanas) que tomó llevar a cabo la diferenciación celular (Kimes & Brandt, 1976), a través del uso de diversos factores reportados como reguladores positivos de la miogénesis, tales como el factor de crecimiento parecido a insulina 1 y 2 (IFG 1 y 2), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGF), con los cuales reportan una diferenciación celular de 3-5 días posteriores a que se agregan estos factores (Coolican *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999). Esta importante reducción en el tiempo de diferenciación permitiría ver una mayor expresión de nuestras proteínas de interés, así como una reducción en el tiempo de expresión de las proteínas, debido a que al momento de agregar los vectores, un porcentaje más alto de células debería estar en un estadio de miotubos, aumentando así la probabilidad de que un mayor número de células puedan ser transducidas por los vectores de VAA, pues como también se ha señalado en trabajos previos los vVAA no transducen con tanta eficiencia a los mioblastos *in vitro* (Arnett *et al.*, 2014); así como tampoco a las células satélite *in vivo*, en cambio transducen con mayor eficiencia miotubos y fibras musculares maduras (Pruchnic *et al.*, 2000). Por ello, una vez que se tuvo cierto grado de diferenciación celular, se llevaron a cabo las transducciones con los vVAA.

6.3.2 Transducción *in vitro* con los vectores de VAA

Para determinar el número de genomas a agregar a cada uno de los cultivos, se hizo un estimado del número de células por pozo que había al momento de hacer la transducción. Para ello, se consideraron los siguientes datos: 1) las células H9c2 tienen un tiempo de duplicación de alrededor de 30 h (Kimes & Brandt, 1976); 2) al inicio de los experimentos se sembraron 7.5×10^4 células/pozo y 3) las células permanecieron durante 4 días (96 h) con suero al 10%, tiempo en el que se duplicaron al menos 3.2 veces. Así pues, al momento de cambiar la concentración de suero del 10 al 1%, se calculó que se tenían $(3.2)(7.5 \times 10^4)$ células/pozo = 2.4×10^5 células/pozo. Asumiendo que después de agregar el medio de cultivo con 1% de suero, las células ya no se duplicaron, podemos calcular que las células H9c2 fueron transducidas con un rango de gv/cél entre 4.3×10^3 - 1.8×10^5 para el caso de los vVAA1; mientras que el rango de gv/cél para los vVAA8 estuvo entre 3.3×10^6 - 4.3×10^7 , según se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Número de genomas/célula (gv/cél) de cada uno de los vectores de VAA utilizados en los ensayos *in vitro*.

Vector	gv/célula
vVAA1 GS-	1.8×10^5
vVAA1 GS+	4.3×10^3
vVAA1 GFP	9.3×10^4
vVAA8 GS-	4.3×10^7
vVAA8 GS+	6.5×10^6
vVAA8 GFP	3.3×10^6

A pesar de que el número de gv/cél utilizado en los ensayos *in vitro* no fue el mismo para cada uno de los vectores, éstos rangos de gv/cél se encuentran dentro de los rangos reportados para transducciones *in vitro* con vVAA, 6×10^4 gv/cél (Arnett *et al.*, 2014).

Generalmente, el transgen puede expresarse en cultivos celulares a partir de los 3-5 días post-transducción (Quio *et al.*, 2008). La transducción de los mioblastos/miotubos se determinó a través de la expresión de la proteína reportera verde fluorescente (GFP). Como se esperaba, las células H9c2 transducidas con los vVAAGS- y vVAAGS+ de ambos serotipos no emitieron fluorescencia (Figura 25a-d y 26a-d); en cambio, en aquellas células transducidas con los vVAA1GFP y vVAA8GFP, se observaron células

fluorescentes (Figura 25f y 26f). En ambos casos, aunque hubo fluorescencia desde el día 5, fue hasta el día 14 en el que la fluorescencia fue mayor, principalmente en los ensayos con los vVAA8GFP (Figura 26f), en donde hubo un mayor número de células fluorescentes, comparado con los ensayos con los vVAA1GFP (Figura 25f). Estas diferencias en la expresión génica de GFP quizá se deban a dos factores importantes, el primero de ellos es el número de gv/cél, pues como se señala en la Tabla 7 se usaron ~35 veces más gv/cél de los vVAA8GFP que de los vVAA1GFP. Otro factor importante que determinó una mayor fluorescencia en las células transducidas con los vVAA8GFP fue el grado de diferenciación que presentaban las células al momento de la transducción. Mientras que las transducciones con los vVAA8 se realizaron cuando las células tenían 20 días de diferenciación y estaban diferenciadas en un ~40%, las transducciones con los vVAA1 se realizaron a los 10 días de diferenciación y con ~20% de diferenciación. Claramente las imágenes en campo claro de la Figura 26 muestran que las células transducidas con los vVAA8 presentaban un mayor grado de diferenciación que las células transducidas con los vVAA1 (Figura 25).

Para estos ensayos, una consideración metodológica que hay que tener en cuenta es que la evaluación del número de células fluorescentes se hizo sólo de manera cualitativa a través del microscopio Olympus IX71; sin embargo, en futuros experimentos se debería medir la fluorescencia a través del uso de un fluorímetro o bien cuantificar el número de células fluorescentes a través de un citómetro de flujo.

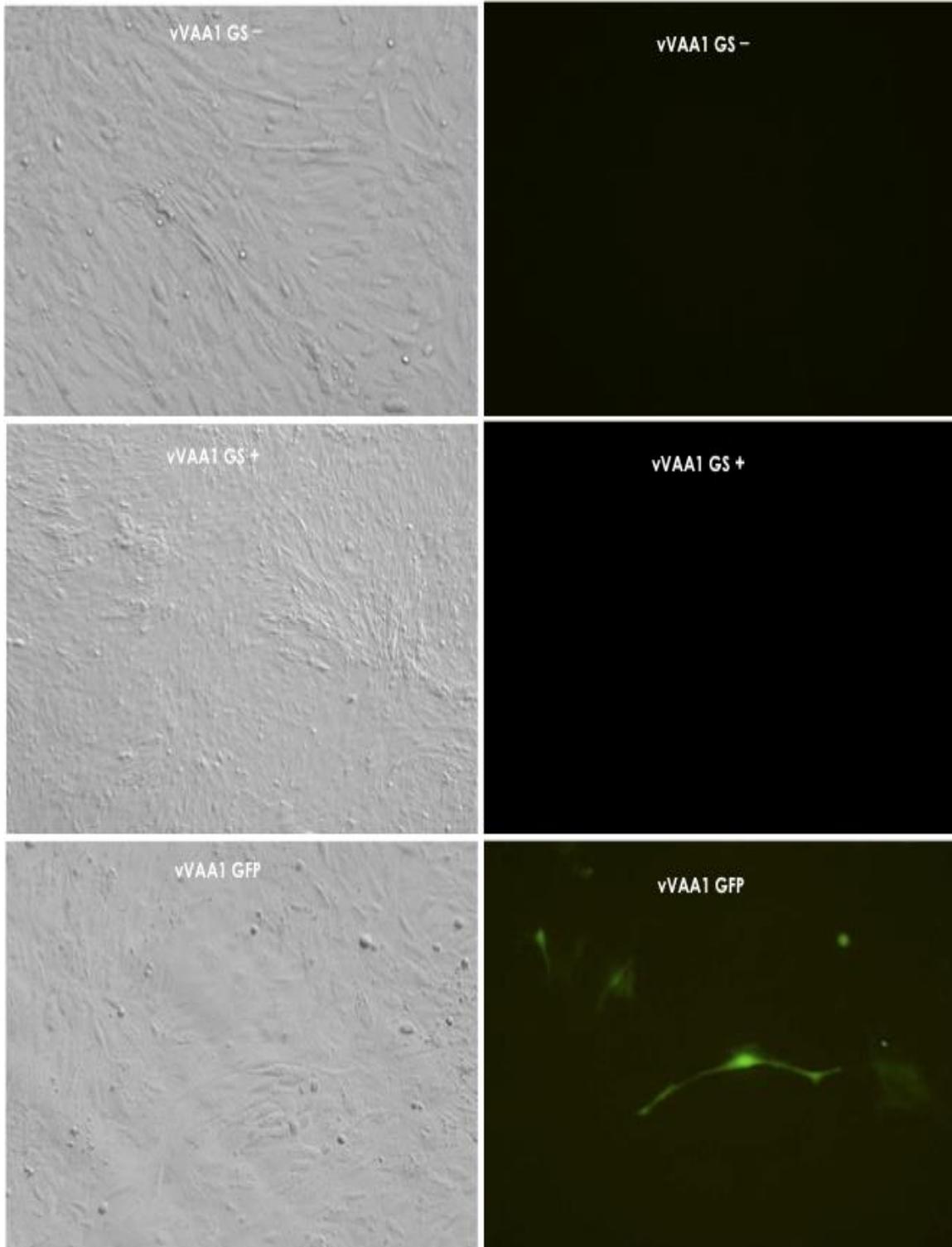


Figura 25. Expresión de GFP en células H9c2 diferenciadas parcialmente y transducidas con vVAA1-GFP. La fluorescencia de GFP fue visualizada a los 14 días postransducción con un microscopio Olympus IX71. Las imágenes del lado izquierdo fueron tomadas en campo claro; mientras que las del lado derecho fueron tomadas con un filtro de excitación de UV, ambas representan el mismo campo de visualización a un aumento de 10X.

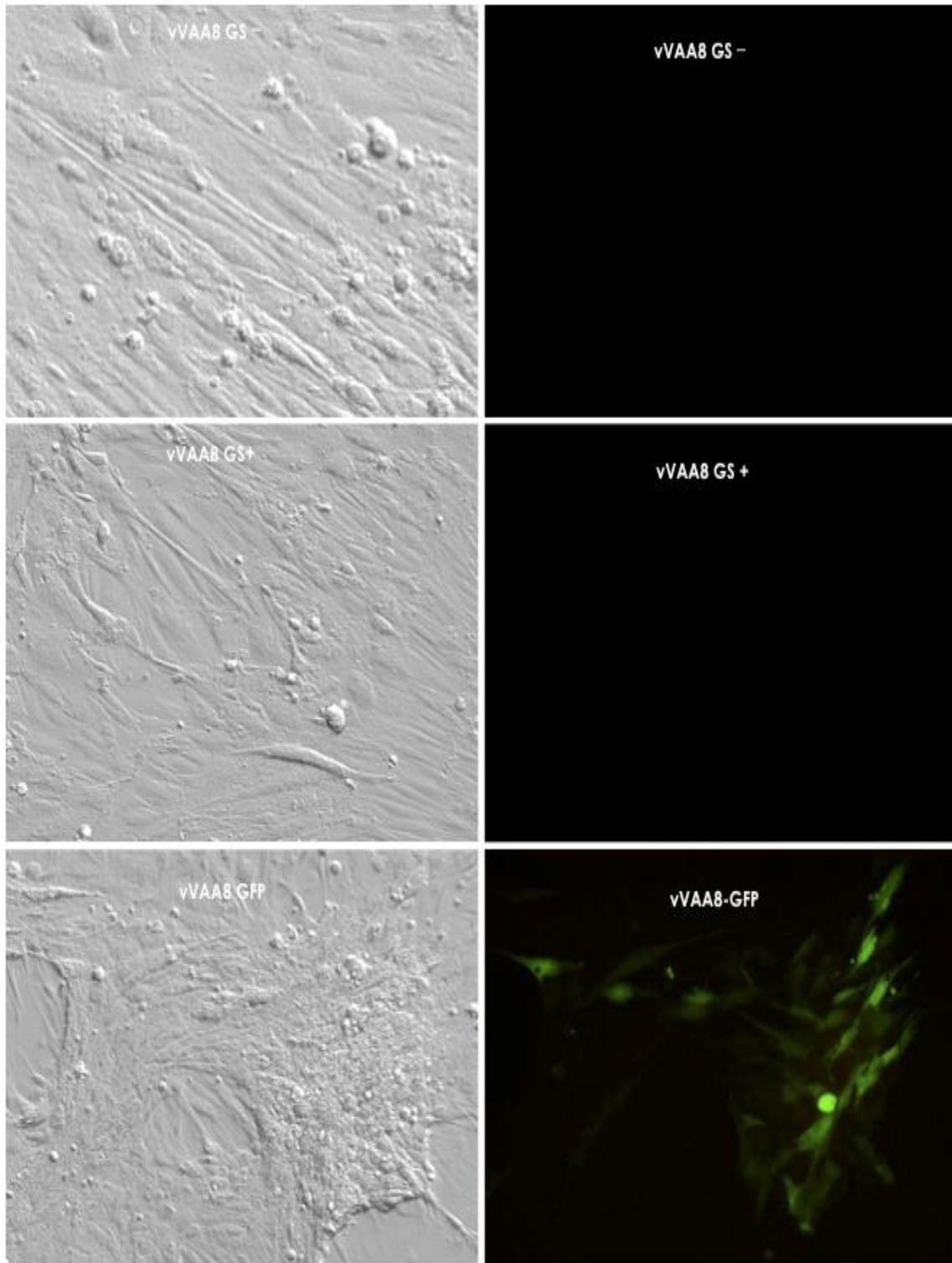


Figura 26. Expresión de GFP en células H9c2 diferenciadas y transducidas con vVAAB-GFP. La fluorescencia de GFP fue visualizada a los 14 días postransducción con un microscopio Olympus IX71. Las imágenes del lado izquierdo fueron tomadas en campo claro; mientras que las del lado derecho fueron tomadas con un filtro de excitación de UV, ambas representan el mismo campo de visual a un aumento de 10X.

6.3.3 Expresión de la GS en células transducidas con los vVAAGS

A diferencia de la proteína GFP, la expresión de la GS no se puede visualizar directamente, por lo que para poder comprobar si hubo una sobreexpresión de la GS en las células H9c2 después de la transducción con los vVAA1GS+ y vVAA8GS+, se realizó un análisis por Western blot empleando un anticuerpo anti-GS. Se utilizó como control de carga β -actina, para poder afirmar que las diferencias observadas fueron a causa de las diferencias en el nivel de expresión y no a la cantidad cargada de proteína. Además, tras la realización del Western blot se llevó a cabo un análisis densitométrico de las imágenes, y posteriormente un análisis estadístico para corroborar que las diferencias observadas en la expresión de la GS fueran estadísticamente significativas.

La figura 27 muestra la expresión de la GS en las células H9c2 diferenciadas parcialmente en miotubos. Las células transducidas con los vVAA1GS- presentan una leve expresión de la GS. Debido a que los vVAA1GS- no contienen la secuencia del gen *gs*, no pueden mediar la sobreexpresión de GS; por ende, podemos asumir que la señal que se aprecia en la imagen de Western blot en el carril de las células transducidas con esos vectores (figura 27a), corresponde a la GS endógena de estas células. Sin embargo, esta expresión es mucho menor que la expresión endógena de la GS en el hígado (control positivo), por lo que se denota una diferencia significativa (Figura 27 b) entre los niveles de expresión de estas muestras, resaltando que efectivamente existe una expresión diferencial de la enzima GS entre ambos tipos celulares. Por otro lado, aquellas células que fueron transducidas con los vVAA1GS+, mostraron un aumento en el nivel de expresión de la GS de 2.7 veces, comparado con el nivel de expresión de las células que fueron transducidas con los vVAA1GS-; sin embargo, esta diferencia no fue significativa (figura 27b). Al comparar la sobre-expresión de la GS inducida por la transducción con los vVAA1GS+ con los niveles de expresión de la GS endógena del hígado, sí hubo una evidente diferencia significativa. Así pues, con una dosis de 4.3×10^3 gv/célula de los vVAA1GS+ no se logró la sobreexpresión significativa de la GS en las células H9c2, por lo que habría que determinar mediante experimentos de dosis-respuesta, la dosis de vVAA1GS+ a partir de la cual se logra aumentar la sobre-expresión de la GS en estas células de forma significativa.

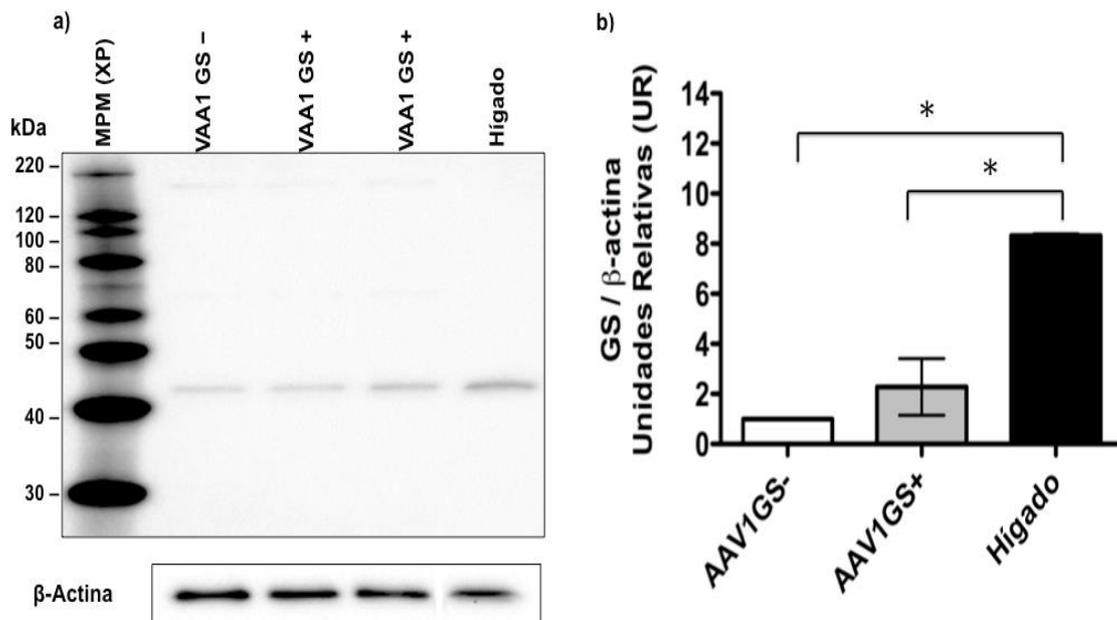


Figura 27. Expresión de la GS en miotubos transducidos con los vectores VAA1 GS+. a) Imagen de un Western blot representativo que muestra la expresión de la GS (42 kDa) en células H9c2 transducidas con 1.8×10^5 gv/célula del vVAA1GS- y con 4.3×10^3 gv/célula del vVAA1GS+, los mismos inmunoblots fueron probados con el anticuerpo β -actina como control de carga. b) El gráfico representa el promedio \pm DE del análisis densitométrico por triplicado para cada condición. Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $*p < 0.05$. MPM: Marcador de peso molecular XP.

Por otro lado, cuando las células H9c2 fueron transducidas con una dosis de 6.5×10^6 gv/cél de los vVAA8GS+, el nivel de expresión de las GS aumentó 7 veces comparado con los niveles de expresión de la GS endógena de las células que fueron transducidas con los vVAA8GS-. A pesar de que se logró la sobreexpresión de forma significativa de la GS con la transducción de las células H9c2 con los vVAA8GS+; los niveles de la GS fueron menores que con los expresados de manera endógena en el hígado, órgano que por su importancia fisiológica presenta altos niveles de expresión de GS, pues es dónde se lleva a cabo la detoxificación eficiente del amonio, mediante el ciclo de la urea y también mediante la conversión del amonio a Glu, mediante la acción de la GS expresada principalmente en los hepatocitos pericentrales.

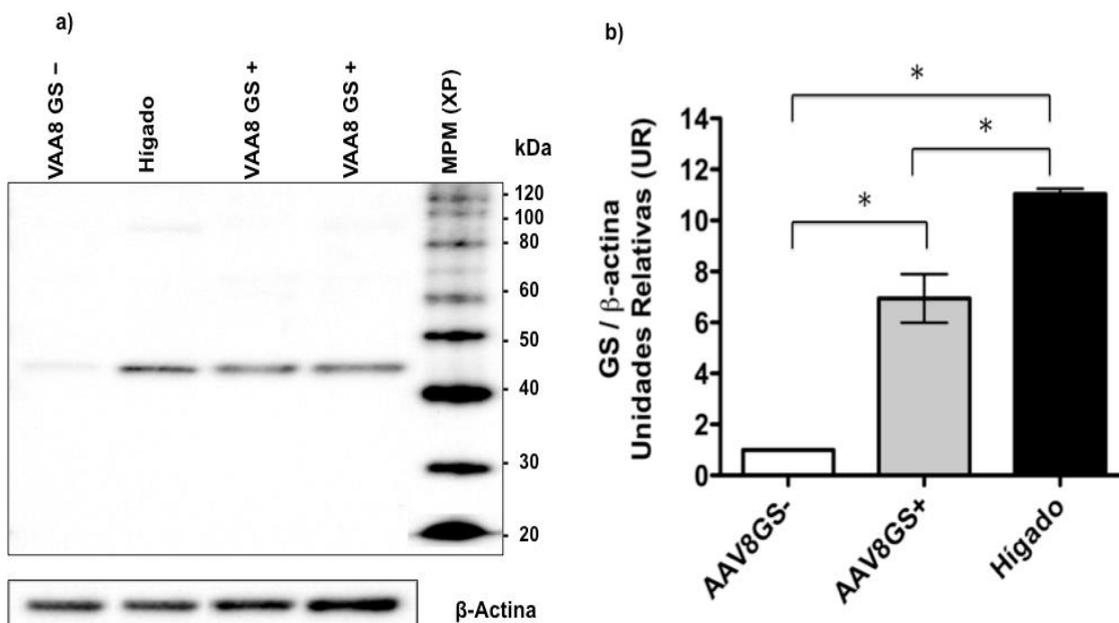


Figura 28. Expresión de la GS en miotubos transducidos con los vectores VAA8 GS+. a) Imagen de un Western blot representativo que muestra la expresión de la GS (42 kDa) en células H9c2 transducidas con 4.3×10^7 gv/célula del vVAA1GS- y con 6.5×10^6 gv/célula del vVAA1GS+, los mismos inmunoblots fueron probados contra el anticuerpo β-actina como control de carga. b) El gráfico representa el promedio \pm DE del análisis densitométrico por triplicado para cada condición. Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $*p < 0.05$. MPM: Marcador de peso molecular XP.

Debido a que las células H9c2 no fueron transducidas con una misma dosis de los vVAA1 y vVAA8, no se pudo determinar cual de los dos vectores es más eficiente para la transducción de los miotubos. Sin embargo, con estos datos podemos determinar un rango aceptable del número de gv/cél con el que se deberían llevar a cabo experimentos posteriores para ver un aumento significativo de la proteína de interés. Como se muestra en la Figura 27, la transducción celular con vVAA usando una dosis de 10^3 gv/cél no resultó en un aumento significativo de los niveles de expresión de GS; en cambio con una dosis de 10^6 gv/célula si hubo un aumento significativo en los niveles de expresión de la GS (Figura 28). Quedaría por determinar en experimentos futuros, si este aumento en la expresión de GS es suficiente para disminuir los niveles de amonio de un medio de cultivo hiperamonémico, como fue propuesto por Torres-Vega *et al.*, (2015) con el uso de los vectores de baculovirus Bac-GS.

Aunque en estos ensayos *in vitro* observamos una transducción diferencial por parte de los vectores de VAA1 y VAA8, no podemos concluir que se deba a una mayor eficiencia de transducción por parte de alguno de los serotipos de VAA

porque las dosis usadas de ambos vectores no fueron las mismas. Sin embargo, se pudo determinar algunos factores que influyen en la transducción celular por parte de vVAA como son la madurez del cultivo celular, el tiempo transcurrido después de la transducción y el número de genomas del vector (gv) utilizados. Inclusive, se pudo determinar una dosis adecuada para lograr una sobreexpresión significativa de la GS.

6.4 Establecimiento del modelo de hiperamonemia crónica en ratas Wistar

El objetivo principal de este proyecto es tratar la hiperamonemia crónica, porque es un factor desencadenante de la HE, y favorece el progreso de esta enfermedad hacia estadios que agravan la condición de los pacientes. La Sociedad Internacional de Encefalopatía Hepática y Metabolismo del Nitrógeno (ISHEN, por sus siglas en inglés) ha reportado diferentes modelos en roedores para la inducción de una hiperamonemia crónica, tales como una dieta con un alto contenido de amonio, inyecciones de diferentes compuestos, como el acetato de amonio o cloruro de amonio; desviaciones porto-sistémicas y la ligadura del conducto biliar (Butterworth *et al.*, 2009). Después de probar varios de estos modelos, en nuestras manos la mayoría de ellos mostraron dos inconvenientes principales: 1) no alcanzar altos niveles de amonio en las ratas tratadas y 2) una gran variabilidad en las concentraciones de amonio dentro de los mismos grupos. A pesar de ello, el modelo que mejor nos funcionó porque fue con el que se logró un incremento significativo del amonio en sangre, fue el de la ligadura del conducto biliar (LCB).

La LCB es un modelo de daño hepático crónico que consiste en impedir el flujo de los **ácidos biliares** desde el hígado hacia el duodeno, a través de la obstrucción del conducto biliar mediante suturas quirúrgicas. Este procedimiento provoca cambios morfológicos y estructurales y funcionales en el hígado, que van desde un leve daño celular después de varios días, hasta una fibrosis avanzada después de la tercera y cuarta semana post-operatoria, e incluso se puede desarrollar cirrosis hepática (Tag *et al.*, 2015). Así, este modelo puede reflejar diversos aspectos de la HE tales como una falla hepática crónica, ictericia, translocación bacteriana, disfunción del sistema inmune, hiperamonemia y sarcopenia (Butterworth *et al.*, 2009; Bosoi *et al.*, 2017). Existen

dos variantes de la LCB, la ligadura sencilla y la ligadura doble, en donde la severidad del daño hepático y sus consecuencias varían según el tipo de ligadura que se haya realizado. En la ligadura sencilla se bloquean 3 de las 5 ramificaciones de los conductos biliares, en cambio, en la ligadura doble se bloquean las cinco ramificaciones, impidiendo por completo el flujo de los ácidos biliares (Giménez-Garzo *et al.*, 2014). En este trabajo, realizamos ambos tipos de ligadura para determinar con cual lográbamos una hiperamonemia más contundente. Después de las intervenciones quirúrgicas, iniciamos las determinaciones de amonio plasmático de forma semanal, desde la semana 1-5 post-quirúrgicas. En las dos primeras semanas la elevación del amonio no fue tan evidente; sin embargo, para la tercer semana hubo un considerable aumento del amonio plasmático en aquellos grupos de animales a los que se les practicó la LCB tanto sencilla como doble. Los niveles de amonio plasmático en el grupo de animales con LCB sencilla fueron de $365.2 \pm 327.2 \mu\text{M}$; mientras que el grupo con la LCB doble fueron de $583.0 \pm 361.7 \mu\text{M}$. Sin embargo, al comparar estos niveles de amonio con respecto a los de las ratas control que fueron de $126.1 \pm 53.4 \mu\text{M}$, así como con respecto a las ratas sham que fueron de $149.3 \pm 90.4 \mu\text{M}$; sólo hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ligadura doble vs control (Figura 29).

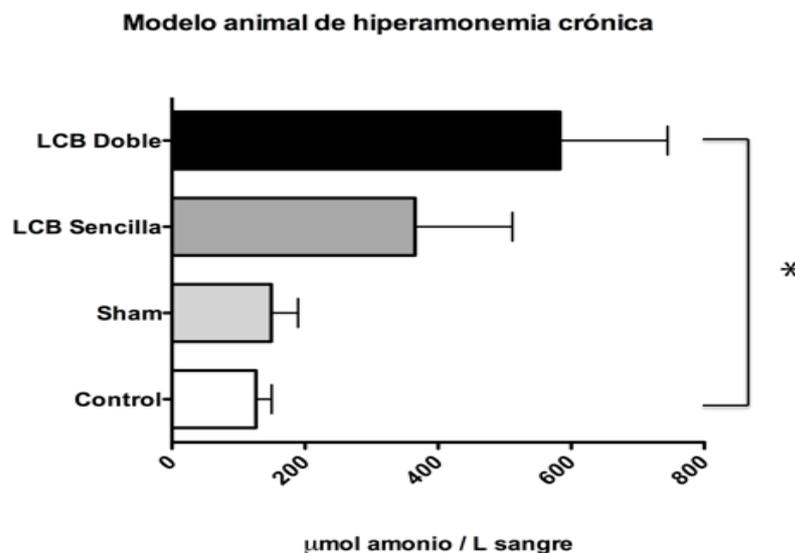


Figura 29. Niveles de amonio plasmático inducidos por la ligadura del conducto biliar (LCB). Los niveles de amonio corresponden a la tercer semana post-quirúrgica, la sangre se obtuvo a través de la vena de la cola de cada rata. El número de animales por grupo fue de n=7. Debido a que las desviaciones varían mucho entre los grupos, para el análisis estadístico se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Sólo hubo diferencias en los niveles de amonio plasmático entre el grupo de LCB doble vs el grupo control (* $p < 0.05$).

Las elevadas concentraciones de amonio se mantuvieron hasta la semana 5, después de la cual los animales sobrevivientes fueron sacrificados porque sus estados de bienestar se veían cada vez más comprometidos.

A lo largo del desarrollo del modelo, pudimos constatar otra consecuencia de la ligadura y ésta fue que conforme avanzaron las semanas post operatorias, la ganancia de masa corporal en los animales con LCB fue menor comparado con los animales control y sham (datos no mostrados). Esta falta de aumento en la masa corporal, o bien la pérdida de la misma, puede deberse en parte a la **sarcopenia** originada por las altas concentraciones de amonio, que consiste en un abatimiento en la síntesis de proteínas y en una elevada autofagia en el músculo esquelético (Bosoi *et al.*, 2017, Dasarathy *et al.*, 2017).

Conforme las ratas fueron falleciendo, o bien, hasta finalizar las determinaciones de amonio, las ratas se sacrificaron para evaluar el daño hepático que presentaban. Pudimos constatar que la LCB doble generó cambios fenotípicos muy evidentes en los hígados, pues aparentemente hubo presencia de hígado graso (**esteatosis**) con diferentes grados de infiltración de grasa, hígados con hepatitis aguda y crónica e inclusive hígados con necrosis evidente, según fue determinado siguiendo las consideraciones de Solís-Herruzco & Muñoz Yagüe, 2008 (Figura 30). En cambio los hígados de los animales a los que se les practicó LCB sencilla no presentaron daños evidentes. Los diferentes cambios fenotípicos observados evidenciaron la heterogeneidad del modelo, pues los animales presentaron diferentes grados de daño hepático, que quizá haya causado la alta variabilidad entre los niveles de amonio.

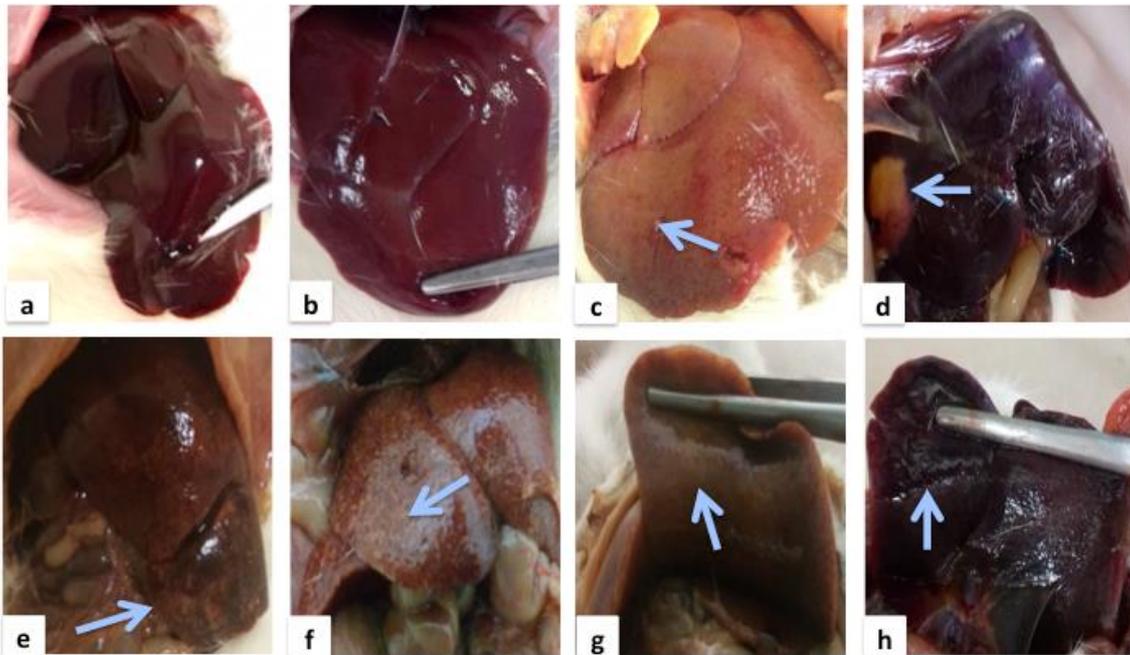


Figura 30. Daño hepático inducido por la ligadura doble del conducto biliar. a) Hígado normal de una rata control, con una superficie lisa y brillante; b) hígado de una rata sham, sin daño evidente; c-h) hígados de ratas a las que se les realizó LCB doble. c) Hígado con hepatitis aguda (el color rojo del parénquima pierde viveza, tornándose color mate a marrón); d) hígado con esteatosis focal (mancha amarilla aislada en el lóbulo izquierdo); e) hígado con esteatosis parcial en el lóbulo inferior derecho; f) hígado con esteatosis avanzada (parénquima hepático intensamente infiltrado por grasa, presenta un color rojo anaranjado con punteado amarillo); g) hígado con una hepatitis crónica (el parénquima presenta una tonalidad marrón con regiones verdosas por colestasis importante); h) hígado con regiones necróticas. Los cambios morfológicos de los hígados se determinaron basados en Solís-Herruzco & Muñoz Yagüe, 2008.

Uno de los inconvenientes del modelo de la LCB doble es la alta tasa de mortalidad inherente al proceso quirúrgico, así como a las complicaciones del modelo. Gutiérrez-Ortega (1998) demostró que los 10 primeros días post ligadura son críticos, pues es el tiempo en el que ocurre el mayor número de muertes, en donde al menos muere el 50% de las ratas con intervención. Posteriormente, la tendencia se hace más lenta, aunque se mantiene un claro decremento en la tasa de supervivencia. En cambio, en el modelo de LCB sencilla, la tasa de mortalidad es mucho menor. Por ejemplo, Jover y colaboradores reportaron una tasa de mortalidad del 15% en ratas con LCB sencilla (Jover *et al.*, 2006), mientras que Tag reportó un porcentaje de mortalidad de sólo el 5%. Ésta se acentúa con la inexperiencia en la técnica, lo que también genera una gran variabilidad en la reproducibilidad de los datos (Tag *et al.*, 2011). Por lo tanto, se tiene que seguir mejorando la técnica de la LCB de tal forma que los datos de hiperamonemia logren ser reproducibles y la variabilidad dentro de una misma cohorte sea mínima.

Como ya se ha mencionado, tanto la LCB sencilla como la doble provocaron que los niveles de amonio en el plasma se elevaran considerablemente; sin embargo sólo los niveles de amonio del grupo con la LCB doble representó una diferencia significativa cuando se compararon con el control. Por lo tanto, se optó por la LCB doble como el modelo en ratas por medio del cual se indujo una hiperamonemia crónica.

6.4.1 Transducción *in vivo* con los vectores de VAA

En este estudio se eligió al músculo como el sitio para la entrega génica de la GS por parte de los vectores de VAA. Se ha demostrado que el músculo esquelético es uno de los tejidos blanco que es eficientemente transducido por algunas variantes de VAA, entre ellas los VAA1, VAA8, VAA6 y VAA9 (Qiao *et al.*, 2011; Riaz *et al.*, 2015). Una vez transducidas, las células musculares sirven como un sitio de producción de los productos proteicos, que pueden actuar local o sistémicamente, como es el caso del Glybera (Kassner *et al.*, 2018). Como resultado de la baja tasa de recambio celular de las células musculares, el producto génico entregado por un VAA puede ser mantenido como episoma por varios meses e inclusive hasta por varios años, como se ha demostrado en muchos estudios en primates no humanos (Penaud-Budloo, *et al.*, 2008) e inclusive en pacientes humanos en donde la expresión del transgen ha permanecido activa durante 18-20 meses (Kassner *et al.*, 2018). En consecuencia, una única dosis del producto administrado por vía IM pudiera no necesitar ser re administrado a menos que haya un daño significativo o una eliminación inmune de las células transducidas. Finalmente, otra razón de peso que nos llevó a elegir el músculo como una plataforma de expresión de la GS fue que se sabe que ante un falla hepática considerable, el músculo juega un papel importante en la detoxificación del amonio; sin embargo esta función resulta insuficiente, por lo que buscamos potenciar esta función a través de la terapia génica.

Así pues, los vVAA se inyectaron directamente en el músculo gastrocnemio de ratas Wistar macho con un peso entre 180-200 g. El protocolo que se siguió para llevar a cabo las transducciones *in vivo* fue el que se muestra en la figura 31. A partir de que se les inyectó vía intramuscular los vVAA, se consideró como la

semana 0 del protocolo. Dos semanas después de la transducción, a los animales correspondientes se les realizó la ligadura del conducto biliar (LCB) para inducir la hiperamonemia crónica. Previamente, habíamos determinado que la elevación del amonio por efecto de la LCB ocurre entre la primera y tercer semana posterior al procedimiento (datos no mostrados), lo cual concuerda con Jover y colaboradores, quienes observaron hiperamonemia en los animales en la tercera semana posterior a la LCB (Jover *et al.*, 2006). Por ello, se decidió empezar a determinar el amonio en sangre a partir de la primera semana y seguir las determinaciones hasta la semana 4 ó 5 después de la LCB, o más según nos fuera posible.

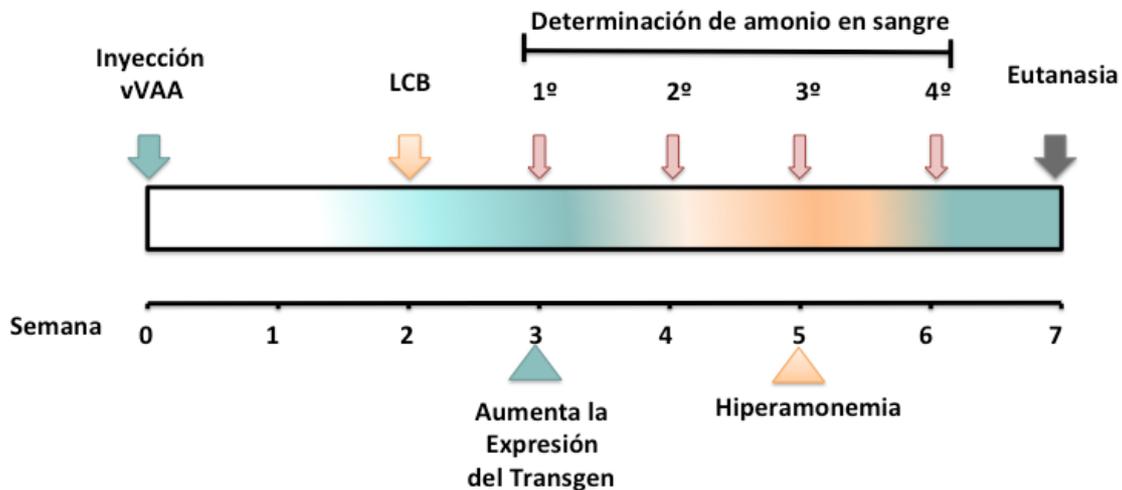


Figura 31. Protocolo experimental para la transducción *in vivo* con los vVAA en el modelo de LCB. Para evaluar la eficacia del tratamiento con los vectores vVAA1GS+ y vVAA8GS+, estos se administraron vía Intramuscular a ratas Wistar (semana 0), 2 semanas después se llevó a cabo la LCB. A la tercer semana post inyección se espera que comience la mayor expresión del transgen de GS, mientras que 3 semanas posteriores a la LCB, se espera el pico de hiperamonemia. Se realizaron al menos 4 determinaciones semanales de los niveles de amonio en sangre. También se espera que los animales que fueron transducidos con los vVAA8GS+, no desarrollen episodios de hiperamonemia. Al final del protocolo, los animales sobrevivientes fueron sacrificados y los hígados disectados, para ver el daño hepático que presentaban. LCB: Ligadura del conducto biliar; vVAA: vector de virus adeno-asociado.

Sabemos que la expresión de los genes entregados por los vectores de VAA generalmente comienza los días 3-7 posteriores a la entrega del vector; sin embargo, estos alcanzan su pico de expresión entre las semanas 3-4 después de la entrega (Qiao *et al.*, 2011; Arnett *et al.*, 2014; Riaz *et al.*, 2015); y esta expresión génica puede persistir en el músculo de un ratón normal hasta por 18 meses. Con base en estos datos, esperábamos que al momento de que ocurriera la elevación del amonio inducida por la LCB (a partir de la semana 3-5 del

protocolo), ya existiera una buena expresión del transgen. De esta forma, la sobreexpresión de la GS en el músculo de aquellos animales que fueran transducidos con los vVAA GS+, les ayudaría a que los niveles de amonio no se elevaran considerablemente, a diferencia de lo que ocurriría en aquellos animales que fueran transducidos con los vVAA GFP, independientemente del serotipo de los vectores.

6.4.2 Niveles de amonio en ratas transducidas con los vVAA y con LCB

Al iniciar con los sangrados de las ratas transducidas con los vVAA y determinar las concentraciones de amonio en sangre, pudimos darnos cuenta que durante los dos primeros sangrados no hubo elevaciones de amonio considerables. No fue sino hasta el tercer sangrado en donde se presentaron elevaciones de amonio considerables, pero sólo para el grupo de animales que fueron transducidos con los vVAA GFP. En cambio, en el grupo de animales transducidos con los vVAAGS+ de ambos serotipos, los niveles de amonio no se elevaron considerablemente (Figura 32a y 32b).

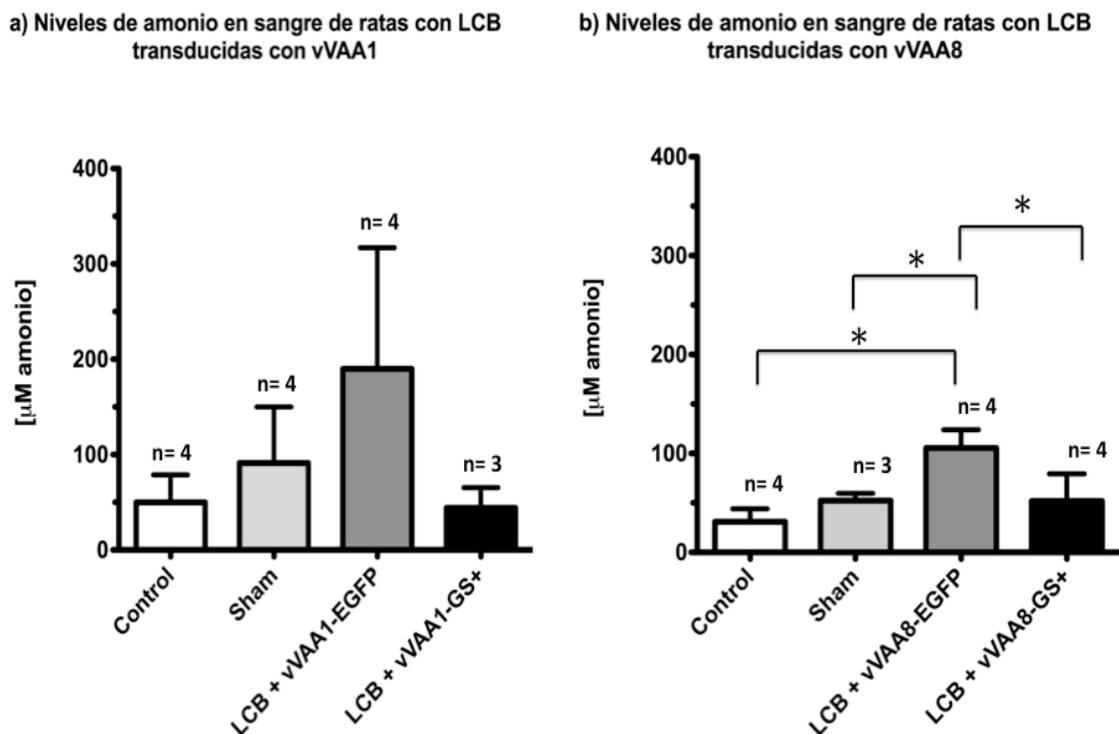


Figura 32. Niveles de amonio en sangre de ratas Wistar con LCB y transducidas con a) vectores de VAA1 y b) vectores de VAA8. Las muestras de sangre fueron tomadas a la tercer semana después de la LCB y a la quinta semana después de la transducción. Los datos corresponden a la media \pm DE de al menos 3 ratas por grupo. Para determinar las diferencias entre los grupos se realizó un ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey (* $p < 0.05$, denota diferencias estadísticamente significativas).

En la cohorte de animales en los que se evaluaron los vVAA del serotipo 1 observamos que el nivel de amonio de las ratas control (n=4) fue de $49.86 \pm 29.93 \mu\text{M}$, el de las ratas sham (n=4) fue de $91.16 \pm 58.84 \mu\text{M}$, el de las ratas con LCB+vVAA1GFP (n=4) fue de $189.98 \pm 127.06 \mu\text{M}$; mientras que el de las ratas con LCB+vVAA1GS+ (n=3) fue de $44.09 \pm 21.27 \mu\text{M}$. Con estos datos, pareciera que la administración del vVAA1GS+ logró disminuir los niveles de amonio en un 76% con respecto al grupo que le fue administrado el vVAA1GFP, alcanzando los niveles de amonio de las ratas control. Sin embargo, estas diferencias no resultaron ser significativas ($p=0.0732$), debido a la gran variabilidad dentro de los grupos. Por otra lado, en la cohorte de animales en los que se evaluaron los vVAA del serotipo 8, el nivel de amonio de las ratas control (n=4) fue de $52.29 \pm 7.36 \mu\text{M}$, el de las ratas sham (n=3) $30.98 \pm 12.99 \mu\text{M}$; el de las ratas con LCB+vVAA8GFP (n=4) fue de $93.77 \pm 20.81 \mu\text{M}$; mientras que el de las ratas con LCB+vVAA8GS+ (n=4) fue de $49.36 \pm 6.83 \mu\text{M}$. Podemos apreciar que al administrar los vVAA8GS+ hubo una disminución significativa de los niveles de amonio en un 47% con respecto al grupo que le fue administrado el vVAA8GFP, alcanzando incluso niveles de amonio similares al de las ratas control y sham. Las determinaciones de amonio se continuaron hasta la cuarta y quinta semana post ligadura; y éstas se mantuvieron similares a las determinadas en el tercer sangrado.

Cabe la posibilidad de que los animales transducidos con los vVAA8GS+ no hayan logrado desarrollar hiperamonemia, y debido a ello en estos grupos se vieran niveles más bajos de amonio; sin embargo, sería mucha coincidencia que en ambos grupos de ratas que recibieron los vVAA8GS+ tanto del serotipo 1 como del serotipo 8, en experimentos totalmente independientes, presentaran el mismo comportamiento. Para aclarar esta duda, en experimentos posteriores se debería incrementar la "n" para cada uno de los grupos de experimentación.

Uno de los objetivos originales de este trabajo era determinar cual de los dos serotipos de VAA presentaban una mejor eficiencia de transducción en el músculo esquelético. Desafortunadamente no pudimos hacer esta comparación pues no se usó la misma dosis para los vectores. En estudios

previos, las dosis que usaron para la entrega intramuscular de vVAA en experimentos en ratones fueron desde 5×10^8 a 5×10^{12} gv/ratón (Zhou *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2011; Arnett *et al.*, 2013); aunque es a partir de la dosis de 10^9 que se empiezan a ver buenos niveles de transducción (Arnett *et al.*, 2013). No obstante, los más altos niveles de transducción se han visto con las dosis de 1×10^{10} - 1×10^{12} gv/ratón (Arnett *et al.*, 2014). Las dosis de los vVAA que usamos en este estudio se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Número de genomas del vector de VAA por rata (gv/rata) utilizados en los ensayos *in vivo*.

Vector	gv/rata
vVAA1 GS+	4.12×10^9
vVAA1 EGFP	8.96×10^{11}
vVAA8 GS+	1.7×10^{11}
vVAA8 EGFP	8.7×10^{11}

Aunque observamos que el vVAA GS+ del serotipo 1 con una dosis de 4.12×10^9 , 41 veces menor que la del vVAA GS+ del serotipo 8 (con una dosis de 1.7×10^{11}), pareciera que logra disminuir el amonio con una intensidad similar (Figura 32). Sería conveniente realizar una curva dosis respuesta, para determinar si se logra disminuir una cantidad similar de amonio desde la dosis de 10^9 gv/rata hasta la de 10^{11} gv/rata.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se produjeron los vectores de VAA en el sistema células de insecto-baculovirus, el cual es una plataforma de producción que está ganando terreno frente a las células de mamífero, que es a la forma tradicional de producción de los vVAA. Se eligió este sistema porque permite una disminución de los costos de producción, asimismo permitirá un escalamiento más factible para la producción de los vVAA para ensayos preclínicos. Además, la producción de dichos vectores se hizo usando el sistema células de insecto-baculovirus de segunda generación, en donde sólo se necesita que una célula sea infectada por dos baculovirus diferentes en lugar de 3 baculovirus diferentes, para asegurar la expresión de los elementos necesarios para la producción de los vVAA; disminuyendo con ello la carga celular impuesta al momento de la infección por la presencia de un mayor número de partículas de baculovirus.

Cuando se evaluó la capacidad transductora de los vVAA1 y vVAA8 *in vitro* en un sistema celular con características de microtubos, se logró la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), así como la sobreexpresión de la glutamina sintetasa de forma significativa. Asimismo, cuando los vVAA1GS+ y vVAA8 GS+ fueron administrados en un modelo animal de hiperamonemia crónica, se observó la disminución de los niveles de amonio plasmático en aquellos animales transducidos con los vVAAGS+, comparado con los animales transducidos con los vVAAGFP. En el caso de los animales con los vVAA1GS+ los niveles de amonio disminuyeron en un 76% comparado con los animales tratados con los vVAA1GFP; sin embargo esta reducción no resultó ser significativa, debido a la variabilidad mostrada en cada uno de los grupos. En el caso de los animales transducidos con los vVAA8GS+, los niveles de amonio disminuyeron en un 47% con respecto al grupo al que le fueron administrados los vVAA8GFP, y en este caso la disminución resultó ser significativa, debido a que la variabilidad dentro de los grupos resultó ser menor. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que los vectores de VAA tanto del serotipo 1 como del serotipo 8 portando el gen de la GS pueden ayudar a disminuir los niveles de amonio plasmático en las ratas que fueron previamente transducidas con dichos vectores. Por lo tanto, nuestro trabajo arrojó datos contundentes que demuestran que la terapia génica con los vVAAGS+ es una alternativa

terapéutica factible para el tratamiento de un amplio rango de desordenes que muestran el desarrollo de una hiperamonemia crónica, tal es el caso de la encefalopatía hepática y los desórdenes del ciclo de la urea.

8. PERSPECTIVAS

Sería deseable que en estudios posteriores se tomen en cuenta las siguientes consideraciones: a) aumentar el número de animales por grupo en el modelo experimental de hiperamonemia crónica y a los que se les administre los vVAA, b) tener un grupo de LCB que no haya recibido algún vector, c) determinar los niveles del mRNA así como de la proteína GS, en los lisados de los músculos de las ratas transducidas con los vectores VAAGS+, d) evaluar la actividad enzimática de la GS en los músculos transducidos con los vVAAGS+. e) comparar el efecto de los vectores de GS con respecto a algún medicamento ya establecido que disminuya los niveles de amonio como la rifaximina, el benzoato de sodio, el fenilacetato sódico, el L-ornitina L-aspartato ó bien, la combinación de varios de estos medicamentos (Couse *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2010).

Otro aspecto importante a considerar en el desarrollo de una estrategia de terapia génica con VAA será determinar el grado de daño muscular que pueda desencadenarse por la misma hiperamonemia, desgaste muscular que pudiera estar generando una combinación heterogénea de miofibras en diferentes estados de degeneración y regeneración, lo cual cambiaría la eficiencia de transducción por parte de los vVAA, como ha sido previamente reportado por Arnett *et al.*, 2014.

Quizá no sea suficiente una terapia monogénica para el tratamiento de un padecimiento tan complejo como lo es la encefalopatía hiperamonémica, sino más bien se requiera de una terapia que comprenda la expresión prolongada de varios genes implicados en la destoxificación del amonio. Por lo que sería conveniente probar esta terapia génica en la que se sobreexpresa el gen la GS combinada con la expresión de otros genes como los de los transportadores de glutamina que se han visto tienen un papel fundamental en el manejo del amonio.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt J. (2011). AAV Capsid Structure and Cell Interactions. *Methods in Molecular Biology*. 47-92.

Andeva MM, Souto G, Blanco N, Donapetry C. (2012). Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*. 61(11): 1495-1511.

Arnett AL, Beutler LR, Quintana A, Allen J, Finn E, Palmiter RD, Chamberlain JS. (2013). Heparin-binding correlates with increased efficiency of AAV1- and AAV6-mediated transduction of striated muscle, but negatively impacts CNS transduction. *Gene Ther*. 20(5): 497-503.

Arnett AL, Konieczny P, Ramos JN, Hall J, Odom G, Yablonka-Reuveni Z, Chamberlain JR, Chamberlain JS. (2014). Adeno-associated viral (AAV) vectors do not efficiently target muscle satellite cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 1:

Aslanidi G, Lamb K, Zolotukhin S. (2009). An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(13): 5059-64.

Auricchio A, O'Connor E, Hildinger M, Wilson JM. (2001). A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 4: 372-374.

Bosoi CR, Oliveira MM, Ochoa-Sanchez R, Tremblay M, Ten Have GA, Deutz NE, Rose CF, Bemeur C. (2017). The bile duct ligated rat: A relevant model to study muscle mass loss in cirrhosis. *Metab Brain Dis*. 32:513-518.

Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med*. 10(7):717-33.

Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*. 48(3): 223-34.

Burger C, Nash K. (2016). Small-Scale Recombinant Adeno-Associated Virus Purification. *Methods Mol Biol*. 1382: 95-106.

Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International* 783-788.

Chahal PS, Aucoin MG, Kamen A. (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods*. 139 (1): 61-70.

Chávez-Peña C. (2011). Desarrollo de un sistema de entrega de sustancias para células utilizando partículas pseudovirales de virus adeno asociado.

Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ. (1996). The mitogenic and miogenic actions of Insuline-like Growth Factors utilize distinct signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(10): 6653-62.

Córdoba J, Mínguez B. (2008). Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis*. 28(1):70-80.

Couce ML, Bustos G, García-Alix A, Lázaro A, Martínez-Pardo M, Molina A, Sáenz de Pipao M, Serrano M, Sanjurjo P. (2009). A guide to the clinical diagnosis and urgent treatment of neonatal hyperammonaemia. *An. Pediatr (Barc)*.70(2):183-88.

Cunningham SC, Spinoulas A, Carpenter KH, Wilcken B, Kuchel PW, Alexander IE. (2009). AAV2/8-mediated correction of OTC deficiency is robust in adult but not neonatal Spf(ash) mice. *Mol Ther*. 17(8): 1340-46.

Dasarathy S, Mookerjee RP, Rackayova V, Rangroo Thrane V, Vairappan B, Ott P, Rose CF. (2017). Ammonia toxicity: from head to toe? *Metab Brain Dis*. 32 (2):529–38.

de Gooijeret C, van Lier F, van den End E, Vlak J, Tamper J. (1989). A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures. *Appl. Microb. Biotechnol*. 30:497-501.

Doria M, Ferrara A, Auricchio A. (2013). AAV2/8 vectors purified from culture médium with a simple and rapid protocol transduce murine liver, muscle, and retina efficiently. *Human Gene Ther Methods*. 24(6):392-98.

Drouin LM, Agbandje-McKenna M. (2013). Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. *Future Virol*. 8(12): 1183-1199.

Felipo V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci*. 14(12): 851-8.

Felipo V, Butterworth RF. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*. 67(4): 259-79.

Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. (2002). Hepatic Encephalopathy—Definition, Nomenclature, Diagnosis, and Quantification: Final Report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 35(3): 716-721.

Ford T, Graham J, Rickwood D. (1994). Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem*. 220 (2):360-6.

Gallo-Ramírez LE. (2002). Estudio de los factores que afectan la repliación y empaquetamiento de DNA en cápsides de virus adeno-asociado 2 en

células de insecto. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Giménez-Garzó C, Salhi D, Urios A, Ruíz-Sauri A, Carda C, Montoliu C, Felipe V. (2015). Rats with mild bile duct ligation show hepatic encephalopathy with cognitive and motor impairment in the absence of cirrhosis: effects of alcohol ingestion. *Neurochem Res.* 40(2): 230-40.

Gonçalves MA. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2:43.

Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc.* 1(3): 1412-28

Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther.* 7(6): 839-50.

Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 9(18): 2745-60.

Gutiérrez-Ortega C. (1998). Estudio morfológico y funcional de un modelo experimental de cirrosis biliar en ratas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Haddley K. (2013). Alipogene tiparvovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Drugs Today (Barc)* 49(3): 161-70.

Hermens WT, ter Brake O, Dijkhuizen PA, Sonnemans MA, Grimm D, Kleinschmidt JA, Verhaagen J. (1999). Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum. Gene Ther.* 10(11):1885-91.

Huang E, Esrailian E, Spiegel BM. (2007). The cost-effectiveness and Budget impact of competing therapies in hepatic encephalopathy-a decision analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 26(8): 1147-61.

Jones EA, Mullen KD. (2012). Theories of the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis.* 16(1): 7-26.

Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M. (2006). Ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology.* 43: 1257-66.

Kim JM, Yoon MY, Kim J, Kim SS. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase Regulates Differentiation of H9c2 Cardiomyoblasts mainly through the protein

-
-
- KinaseB/Akt-independent pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 367(1): 67-73.
- Kimes BW, Brandt BL. (1976). Properties of clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*. 98(2): 367-81.
- Kok C, Cunningham SC, Carpenter KH, Dane AP, Siew SM, Logan GJ, Kuchel PW, Alexander IE. (2013). Adeno-associated virus-mediated rescue of neonatal lethality in argininosuccinate synthetase-deficient mice. *Mol Ther*. 21(10): 1823-31.
- Krajewski WW, Collins R, Holmberg-Schiavone L, Jones TA, Karlberg T, Mowbray SL. (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate –induces conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol*. 375(1): 217-28.
- Kuck D, Kern A, Kleinschmidt JA. (2007). Development of AAV serotype-specific ELISAs using novel monoclonal antibodies. *J. Virol Methods*. 140(1-2):17-24.
- Larsen LE, Heglund IF, Fabian R, Walday P, Blazak WF. (1995). Neural tolerability of iodixanol in mice and dogs after single and repeated intracisternal administration. *Acta Radiol Suppl*. 399: 238–43.
- Lee EK, Hu C, Bhargava R, Rozengurt N, Stout D, Grody WW, Cederbaum SD, Lipshutz GS. (2012). Long-term survival of the juvenile lethal arginase-deficient mouse with AAV gene therapy. *Mol Ther*. 20(10):1844-51.
- Lemberg A, Fernández MA. (2009). Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol*. 8(2):95-102.
- Luo WY, Lin SY, Lo KW, Lu CH, Hung CL, Chen CY, Chang CC, Hu YC. (2013). Adaptive immune responses elicited by baculovirus and impacts on subsequent transgene expression in vivo. *J Virol*. 87(9): 4965–73.
- Meister A. (1985). Glutamine Synthetase from Mammalian Tissues. *Methods Enzymol* 113: 185-199.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. (2003). Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*. 34(2): 260-64.
- Méndez-Sánchez N, Villa AR, Chávez-Tapia NC, Ponciano-Rodríguez G, Almeda-Valdés P, González D, Uribe M. (2005). Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol*. 4(1): 52-55.
- Mietzsch M, Grasse S, Zurawski C, Weger S, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Muzyczka N, Zolotukhin S, Heilbronn R. (2014). OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 25(3): 212-22.

Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. (2012). Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 79(6): 394-402.

Morgan MY, Blei A, Grüngreiff K, Jalan R, Kircheis G, Marchesini G, Riggio O, Weissenborn K. (2007). The treatment of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 22: 389-405.

Naumer M, Sonntag F, Schmidt K, Nieto K, Panke C, Davey NE, Popa-Wagner R, Kleinschmidt JA. (2012). Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein. *J Virol.* 86(23): 13038-48.

Negrete A, Esteban G, Kotin RM. (2007). Process Optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76: 761-772.

Negrete A, Kotin RM. (2008). Strategies for manufacturing recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy applications exploiting baculovirus technology. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 7(4): 303-311.

O'Donnell J, Taylor KA, Chapman MS. (2009). Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor-Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology.* 385(2):434-43.

Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Ozawa K. (2009). Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther* 20 (9): 1013-21.

O'Reilly DR, MLK, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual.* 1994, New York: Oxford University Press, Inc. 347.

Palomares Aguilera LA. (1999). Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Palomares LA, Pedroza JC, Ramirez OT. (2001). Cells size as tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology Letters.* 23(5):359-364.

Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol.* 267: 15-52.

Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. (2006). Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. *Cell culture technology for pharmaceutical end cell-based therapies.* 627-692.

Palomares LA, Realpe M, Ramírez OT. (2015). An Overview of cell culture engineering for the insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS). *Engineering* 9: 501-519.

Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, Chenuaud P, Schmidt M, von Kalle Ch, Rolling F. (2008). Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J Virol.* 82(16): 7875-85.

Phongsamran PV, Kim JW, Cupo Abbott J, Rosenblatt A. (2010). Pharmacotherapy for hepatic encephalopathy. *Drugs.* 70(9): 1131-1148.

Pieroni L, Maione D, La Monica N. (2001). In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Human Gene Ther.* 12(8): 871-81.

Potter M, Chesnut K, Muzyczka N, Flotte T, Zolotukhin S. (2002). Streamlined large-scale production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Methods Enzymol.* 346: 413-430.

Potter M, Lins B, Mietzsch M, Heilbronn R, Van Vliet K, Chipman P, Agbandje-McKenna M, Cleaver BD, Clément N, Byrne BJ, Zolotukhin S. (2014). A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1:14034.

Pruchnic R, Cao B, Peterson ZQ, Xio X, Li J, Samulski RJ, Epperly M, Huard J. (2000). The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Human Gene Ther.* 11(4): 521-36.

Qiao C, Koo T, Li J, Xia X, Dickson JG. (2011). Gene therapy in skeletal muscle mediated by adeno-associated virus vectors. *Methods Mol Bio.* 807: 119-140.

Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, Tai A, Cataniag F, McDonnell J, Zhou J, Hauck B, Luna J, Sommer JM, Smith P, Zhou S, Colosi P, High KA, Pierce GF, Wright JF. (2007). Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vector by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods.* 140(1-2): 183-92.

Riaz M, Raz Y, Moloney EB, Putten M, Krom YD, Maarel SM, Verhaagen J, Raz V. (2015). Differential myofiber-type transduction preference of adeno-associated virus serotypes 6 and 9. *Skelet Muscle.* 5: 37- 41.

Rohrmann GF. (2008). *Baculovirus Molecular Biology.* 2nd. Edition. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information (US).

Rose CF. (2012). Ammonia-Lowering Strategies for the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 92(3): 321-31.

Smith RH, Levy JR, Kotin RM. (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther.* 17(11): 1888-96.

Solís-Herruzco JA, Muñoz Yagüe MT. (2008). Atlas de diagnóstico diferencial laparoscópico. Edit. Aran. Madrid, España.

Sonntag K, Köther K, Schmidt K, Weghofer M, Rauuçpp C, Nieto K, Kuck A, Gerlach B, Böttcher B, Müller OJ, Lux K, Hörer M, Kleinschmidt JA. (2011). The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J Virol.* 85(23):12686-97.

Spodenkiewicz M, Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Gemperle-Britschgi C, Häberle J. (2016). Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. *Biology.* 5(40): 1-17.

Stepanova M, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM. (2012). In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 10(9): 1034-41.

Strobel B, Miller FD, Rist W, Lamla T. (2015). Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications. *Human Gene Ther Methods.* 26(4): 147-57.

Tag CG, Weiskirchen S, Hittatiya K, Tacke F, Tolba RH, Weiskirchen R. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice. *Lab Anim.* 2015; 49(S1):70-80.

Torre A. (2008). Conceptos actuales sobre la fisiopatología y diagnóstico de la encefalopatía hepática. *Rev Invest Clin.* 60(4): 321-31.

Torres-Vega MA, Vargas-Jerónimo RY, Montiel-Martínez AG, Muñoz-Fuentes RM, Zamorano-Carillo A, Pastor AR, Palomares LA. (2015). Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia. *Gene Ther.* 22(1): 58-64.

Urabe M, Ding C, Kotin RM. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther.* 13(16): 1935-43.

Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K, Ozawa K. (2006). Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther.* 13(4): 823-8.

Van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology.* 96, 6-23.

Van Vliet KM, Blouin V, Brumento N, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. (2008). The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol Biol.* 437: 51-91.

Werling NJ, Satkunanathan S, Thorpe R, Zhao Y. (2015). Systematic Comparison and Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for the

Quantitation of Adeno-Associated Viral Products. *Hum Gene Ther Methods*. 26(3): 82-92.

Williams GV, FP, Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection, in *The Baculoviruses*, LK. Miller, Editor. 1997, Plenum: New York. P61-107.

Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. (2013). History of gene therapy. *Gene*. 525(2): 162-9.

Wobus CE, Hügler-Dörr B, Girod A, Petersen G, Hallek M, Kleinschmidt JA. (2000). Monoclonal Antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol*. 74(19): 9281-93.

Zolotukhin S, Byrne BJ, Masiyon E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy*. 6: 973-985.

Zolotukhin S, Potter M, Zolotukhin I, Sakai Y, Loiler S, Fraites TJ Jr, Chiodo VA, Phillipsberg T, Muzyczka N, Hauswirth WW, Flotte TR, Byrne BJ, Snyder RO. (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28(2): 158-67.

<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>

10. APÉNDICES

Apéndice I. Mapas de los diferentes plásmidos usados en este trabajo.

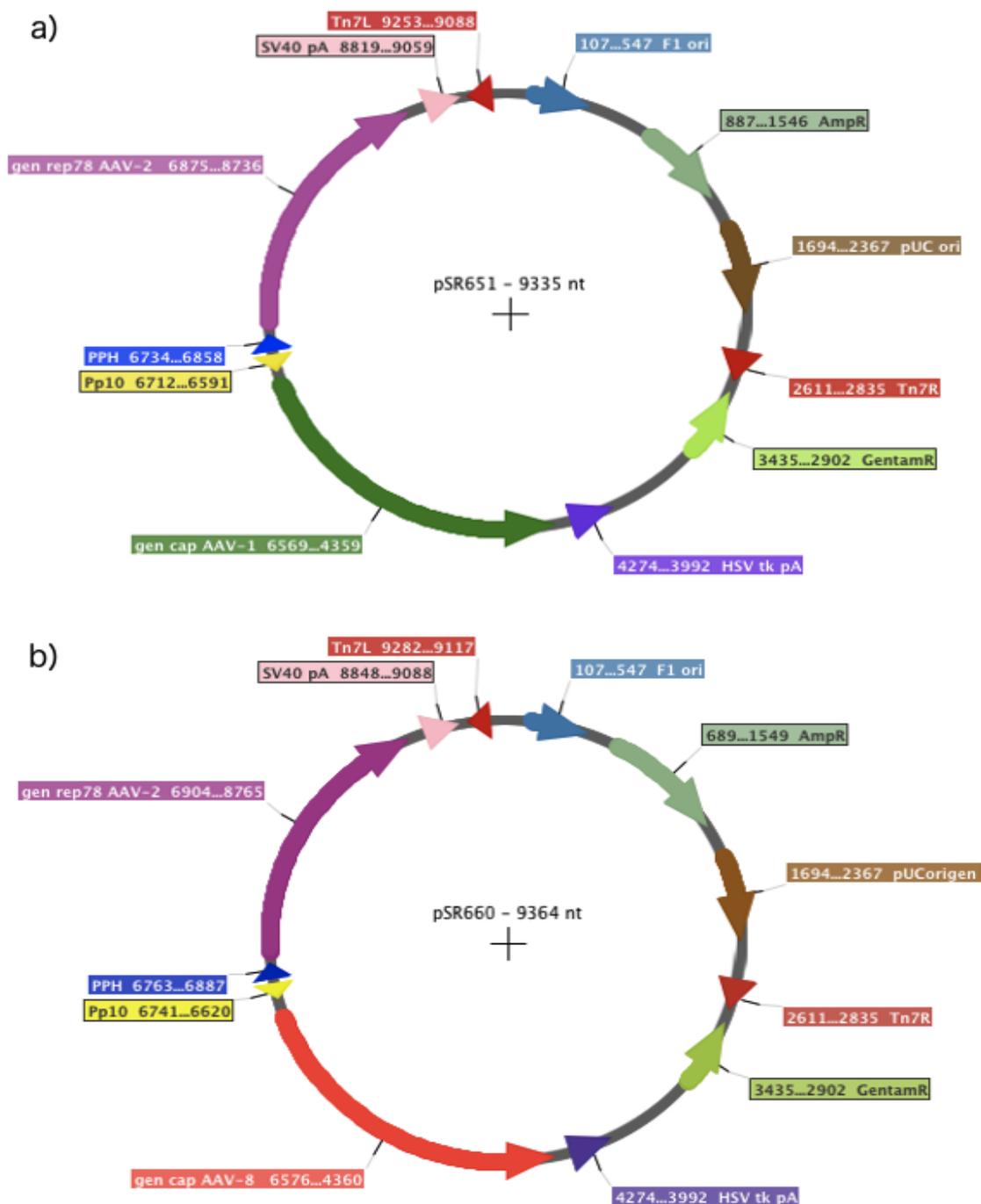
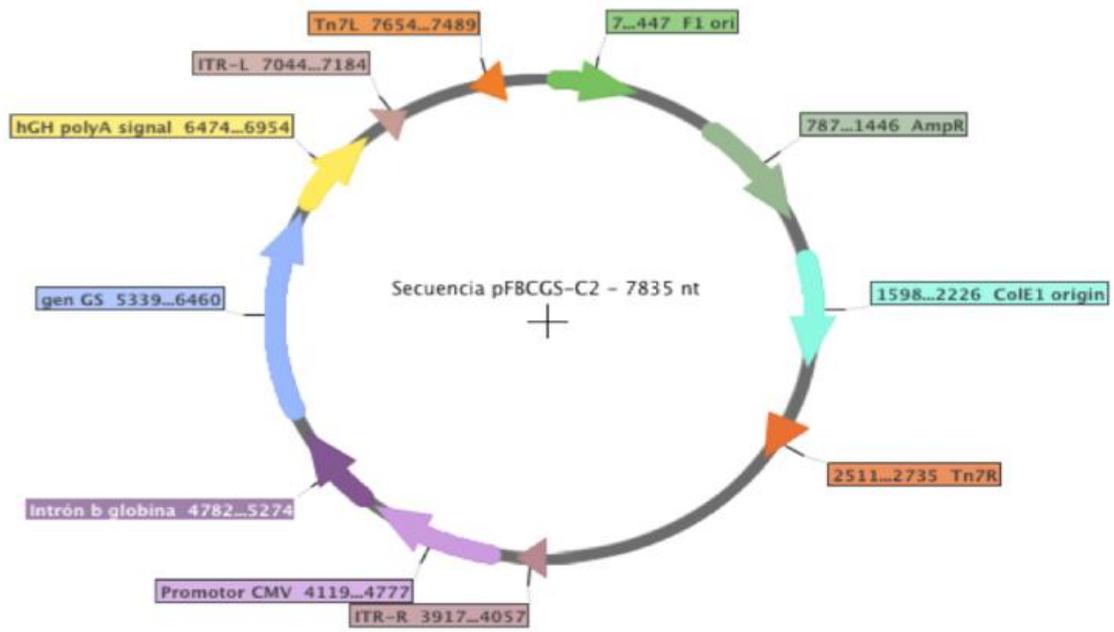


Figura 33. Plásmidos pSR651 y pSR660. a) Plásmido pSR651, con una longitud de 9335 nucleótidos, contiene las secuencias de los genes *rep* y *cap*. El gen *rep* codifica para las proteínas Rep52 y Rep78 del VAA del serotipo 2, mientras que el gen *cap* codifica para las proteínas estructurales (VPs) del VAA del serotipo 1. b) Plásmido pSR660, con una longitud de 9364 nucleótidos, contiene las secuencias de los genes *rep* y *cap*. El gen *rep* codifica para las proteínas Rep52 y Rep78 del VAA del serotipo 2, mientras que el gen *cap* codifica para las proteínas estructurales (VPs) del VAA del serotipo 8. Los mapas de los plásmidos fueron realizados en el programa Serial Cloner 2.6.1.

c)



d)

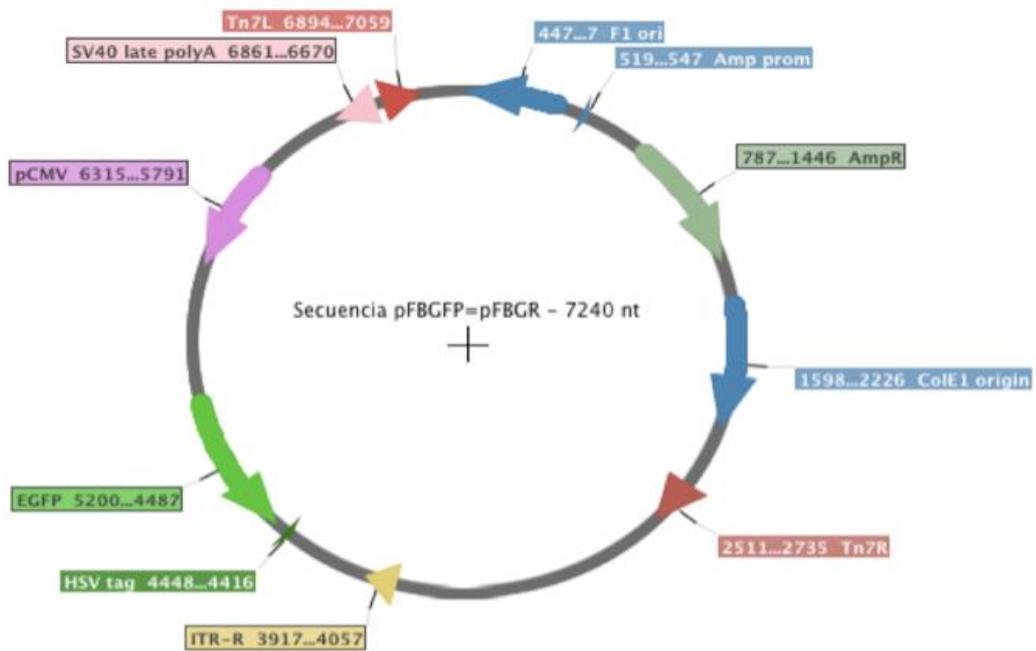


Figura 34. Plásmidos pFBCGSC2 y pFBGR. c) Plásmido pFBCGS-C2 con una longitud de 7835 nucleótidos, contiene la secuencia del gen de la GS. b) Plásmido pFBGR, con una longitud de 7240 nucleótidos, contiene la secuencia del gen de la proteína reportera verde fluorescente GFP. Los mapas de los plásmidos fueron realizados en el programa Serial Cloner 2.6.1

Gene Therapy for Treatment of Chronic Hyperammonemia in a Rat Model of Hepatic Encephalopathy

Plácido Espiritu-Ramírez,* Nancy Y. Ortega-Balderas,* Laura Sevilla-Tapia,*^{***}
Ana G. Montiel-Martínez,** Ana R. Pastor-Flores,^{***} Laura A. Palomares,^{***} Miguel A. Torres-Vega*

* Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico.

** Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

^{***} Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

ABSTRACT

Introduction and aim. Hepatic encephalopathy (HE), caused by hyperammonemia resulting from liver disease, is a spectrum of neuropsychiatric and motor disorders that can lead to death. Existing therapies are deficient and alternative treatments are needed. We have shown that gene therapy with a baculovirus vector containing the glutamine synthetase (Bac-GS) gene is efficient for reducing ammonia levels in an acute hyperammonemia rat model. However, the most common condition resulting from liver disease is chronic hyperammonemia. In this work, Bac-GS was evaluated in bile-duct ligated rats, a chronic liver disease model with hyperammonemia and some characteristics of Type C HE. **Material and methods.** Bac-GS was tested for mediating GS overexpression in HeLa cells and H9C2 myotubes. For determining the utility of Bac-GS for the reduction of ammonia levels in a chronic hyperammonemia animal model, four groups of rats were treated: control, sham, ligated with Bac-GS and ligated with Bac-GFP. Baculoviruses were injected *i.m.* 18 days post-surgery. Blood was drawn 2, 3 and 4 weeks post-surgery and plasma ammonia concentrations were quantified. **Results.** In protein lysates of cells and myotubes transduced with Bac-GS, a 44 kDa band corresponding to GS was detected. Significant results were obtained in the hyperammonemic bile-duct ligated rat model, as plasma ammonia was reduced to normal levels 3 days after treatment with Bac-GS. Furthermore, a transitory effect of Bac-GS was observed. **Conclusion.** Our results show that gene therapy by delivering GS is a promising alternative for treatment of hyperammonemia in acute-on-chronic liver failure patients with HE.

Key words. Baculovirus. Glutamine synthetase. Gene delivery. Bile-duct ligation. Liver failure.

INTRODUCTION

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric disorder that severely affects the life style of patients, who have a high risk of death. It is a common complication in acute and chronic liver failure.¹ Cirrhotic patients frequently exhibit covert or overt HE, which is detected by clinical testing or through the appearance of symptoms, such as a lower attention span, decreased awareness, altered sleep rhythm, abnormal psychometric or neuropsychological tests, personality change, inappropriate or bizarre behavior, asterixis, dyspraxia, lethargy, somnolence, objectively disoriented to time and space and

coma.² The importance of covert or minimal HE (MEH), that is characteristic in individuals with psychomotor slow down and cognitive deficits, has grown. It has identified in the 59.1% of cirrhotic patients with grade 0 of encephalopathy (West-Craven HE criteria).³

The etiology of HE is complex, but in the nucleus of this pathology is the elevation of ammonia in blood circulation and brain,⁴ recognizing that factors other than ammonia are relevant. Recent evidence confirms this toxin is the main cause of HE. In acute-on-chronic liver failure (ACLF) patients, a strong correlation between hyperammonemia and the presence of HE has been demonstrated. There is a direct correlation between an increase in the

level of ammonia and a higher risk of death. Moreover, a lower grade of HE is observed when ammonia levels decrease.⁵ Furthermore, in cirrhotic patients that had suffered episodes of overt HE, a fasting ammonia level 1.5 times above the normal value was associated with an increase in probability of having a new episode of overt HE; the annualized rate of HE-related hospitalizations augmented in the same way.⁶ Other study identified covert HE and elevated blood ammonia as factors associated with the onset of overt HE in liver cirrhosis patients.⁷ However, it is interesting to note that in a group of 26 patients with likely MHE, identified by the neuropsychometric Trail Making Test, only 15 of them showed altered concentrations of venous blood ammonia.³

Ammonia has a severe effect in the brain.⁸ Besides the perturbations of ammonia on astrocytes and neurons, this toxin also has a negative influence on other specialized cells in the body like stellate cells in the liver, skeletal muscle fibers and probably Purkinje cells.⁹⁻¹¹

During HE manifestations in acute and chronic liver failure, several lines of evidence have shown a synergistic relation between ammonia and other toxins, like mercaptans, phenols and fatty acids, ions as manganese, pro-inflammatory cytokines, mainly Tumoral Necrosis Factor α (TNF α), IL-1 beta and IL-6, and the activation of microglia (revised in Butterworth, 2016).¹²

With the aim to reduce ammonia levels and decrease HE symptoms in patients, disaccharides (lactulose) and antibiotics (Rifaximin) is one of the most used therapies in the clinic. This approach causes undesirable secondary effects, it is often not effective and has elevated costs. Therefore, other treatment options are in development.^{2,13} Our research group was the first to demonstrate that baculovirus-delivery of the glutamine synthetase (GS) gene is a promising strategy for diminishing hyperammonemia.¹⁴ The establishment of the gene therapy strategy proposed here can avoid the need of clinical interventions with potential secondary effects and relapses that are common when traditional therapies for hyperammonemia and HE are used.

The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) is an insect-baculovirus with an important role as a vector.¹⁵ In addition to its safety and a wide tropism, one of the most attractive properties of baculovirus is its capacity of carrying several genes and regulatory elements in its large genome (~134 kbp), which is translated in the possibility of delivering and expressing multiple genes in the host, allowing applications such as reprogramming a specific cell-type into another one, or gene editing.¹⁶

Due to the high potential of using baculovirus as a vector for human treatment in clinical trials, several improvements have been made in production processes, such as

large-scale production, concentration, purification, storage, quality control and preclinical studies to demonstrate safety of the baculovirus therapy and formulations.^{17,18}

Bac-GS is a recombinant baculovirus carrying the GS gene. When it was evaluated *in vitro* or in an acute rat model of hyperammonemia, a significant decrease in the ammonia levels was found.¹⁴

In this work, treatment with Bac-GS was tested in bile-duct ligated rats, which is a model of chronic liver failure, showing some aspects of Type C HE and hyperammonemia.¹⁹ The obtained results were outstanding. Treatment with Bac-GS was so effective in reducing the hyperammonemia in bile-duct ligated rats that ammonia levels reached normal values. They confirm that Bac-GS and delivery of the GS coding sequence as a promising gene therapy to control hyperammonemia in patients with HE.

MATERIAL AND METHODS

Production of recombinant baculovirus

Three recombinant baculovirus vectors were used, Bac-GS, Bac-control and Bac-GFP. Their construction is described in Torres-Vega, *et al.* (2015).¹⁴ Bac-GS contains the rat liver GS cDNA, Bac-control is identical to Bac-GS but does not contain the GS gene. Bac-GFP contains the enhanced green fluorescent protein gene in place of the GS gene. The amplification of the recombinant baculoviruses is described in Torres-Vega, *et al.* (2015).¹⁴ Titters of baculovirus stocks were determined as described in Mena, *et al.* (2003).²⁰ Titters were 3×10^8 , 2.4×10^8 and 6.6×10^8 pfu/mL for Bac-GS, Bac-control and Bac-GFP, respectively.

Transduction of mammalian cells with recombinant baculoviruses

HeLa or H9C2 (ATCC, Manassas, VA, USA) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-Invitrogen) and penicillin/streptomycin (Gibco/Invitrogen). To induce the differentiation to myotubes, medium of a confluent L6 myoblast culture was replaced with medium containing only 1% FBS and incubation was continued for four weeks.²¹ To transduce cells with recombinant baculoviruses, the medium of six-well plates with confluent HeLa cells or H9C2 myotubes was replaced with 1.5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium without serum or antibiotics, and the baculovirus particles were added (100 pfu per cell). Plates were incubated for 1 h at 26°C with mild shaking every 10 min. Thereafter, medium was substituted

with 2 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) containing antibiotics, 5 mM sodium butyrate (Sigma, St Louis, MO, USA) and 1% or 2% FBS (Gibco-Invitrogen) for myotubes H9C2 or HeLa cells, respectively. Cells were maintained for three days. Pictures of GFP fluorescence were taken in an Olympus microscope.

Western blot analysis

Western blot to detect Bac-GS-mediated GS expression was done as described in Torres-Vega, et al. (2015)¹⁴ using a rabbit anti-GS antibody (Sigma, St Louis, MO, USA).

Bile-duct-ligation model

Experiments with rats were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. To ligate the bile-duct of rats, we followed the procedure described in Giménez-Garzó, et al.,²² with some modifications. Wistar male rats, 160 - 250 g body weight, were anesthetized intraperitoneally with a combination of Xylazine (Xilazina Aranda, Querétaro, México) and Ketamine (Anesket Pisa Agropecuaria, Atitalaquia, México). The abdominal part of the body was shaved and an incision in the linea alba was made to expose the liver. The liver lobules were separated and the bile-duct was localized. The connective tissue holding the bile-duct was broken with a capillary. Three ligations were made along the bile-duct using soft silk suture 4 0 (Ethicon, USA), as shown in Figure 2A. Then, the muscle and the skin were sutured with soft silk suture 3 0 (Ethicon, USA). The total number of triple-ligated rats was 30. Twenty of them survived for five weeks, when all rats were euthanized. Sham rats had the same surgery with exception of the ligations. The administration of recombinant baculovirus to rats was performed as described in Torres-Vega, et al.¹⁴ Briefly, 0.9 or 2×10^8 pfu of Bac-GS or Bac-GFP baculovirus vectors, respectively, were intramuscularly injected into the two rear legs.

Ammonia quantification

Plasma samples were deproteinized as described in Jover, et al.²³ Ammonia was quantified on the neutralized supernatants using a modified Kaplan method.²⁴ Briefly, two solutions were prepared: A) 106 mM phenol (Merck, Darmstadt, Germany), 0.17 mM sodium nitroprusside (Merck, Darmstadt, Germany); B) 0.125 N sodium hy-

droxide (J.T. Baker, Xalostoc, México), 11 mM sodium hypochlorite (Sigma, St Louis, MO, USA). Twelve and a half microliters of supernatants were mixed with 0.5 ml solution A; 0.5 ml of solution B were added and mixed. Color was development after 30 min. Then, to quantify ammonia two hundred microliters of the complete mix were loaded into 96-well plates and absorbance was measured at 635 nm on an Epoch 2 BioTek microplate reader.

Statistical analysis

For descriptive statistics of quantitative variables, the mean \pm standard deviation was used. Analysis of data was made with the analysis of variance - Tukey test using the GraphPad Prism 7 software. $P < 0.05$ was considered statistically significant. GraphPad Prism 6.01 software was used to plot data.

RESULTS

Expression of GS in HeLa cells and H2C9 myotubes

With the aim of evaluating a wider range of cell substrates for GS gene delivery by baculovirus, HeLa cells were transduced. Condreay, et al.²⁵ reported that HeLa cells are efficiently transduced by baculovirus vectors. Similarly to MA104 epithelial monkey cells, which we evaluated as an hyperammonemia *in vitro* model in our previous publication,¹⁴ Western blotting of HeLa cells transduced with Bac-GS showed a specific sharp band with a molecular weight of 44 kDa, which corresponds to the size of GS (Figures 1A and 1B). HeLa cells were also efficiently transduced by Bac-GFP (Figure 1C). To evaluate the ability of Bac-GS to transduce skeletal muscle cells, the target of the proposed gene therapy for hyperammonemia, H9C2 cells, myoblasts derived from the heart of rat embryos,²¹ were differentiated into myotubes by culturing them with a low FBS concentration (1%), resulting in the morphology typical of skeletal muscle myofibers.²¹ The morphology and the capacity of Bac-GFP to transduce muscle cells were evident upon observation under a microscope (Figure 1D). Differentiated H9C2 myotubes were efficiently transduced by Bac-GS and overexpressed GS with the expected molecular weight (Figure 1B).

Hyperammonemia in rats by ligation of the bile-duct

Ligation of the bile-duct in rodent results in jaundice, inflammation, fibrosis, liver damage and hyperammonemia.^{22,26} For these and other reasons, this procedure is

considered a good chronic liver failure model, that shows some aspects of Type C HE.¹⁹ We intended to reproduce this model in our laboratory and practiced a surgery with a single or triple ligation in the bile-duct of rats (Figure 2A). Even when an increase of ammonia

levels in circulating blood of rats with one ligation was observed, it was not significant (data not shown). In contrast, the rats with a triple ligation were hyperammonemic two weeks post-surgery. We selected rats with ammonia circulation levels above 200 μm (n = 12). These animals had

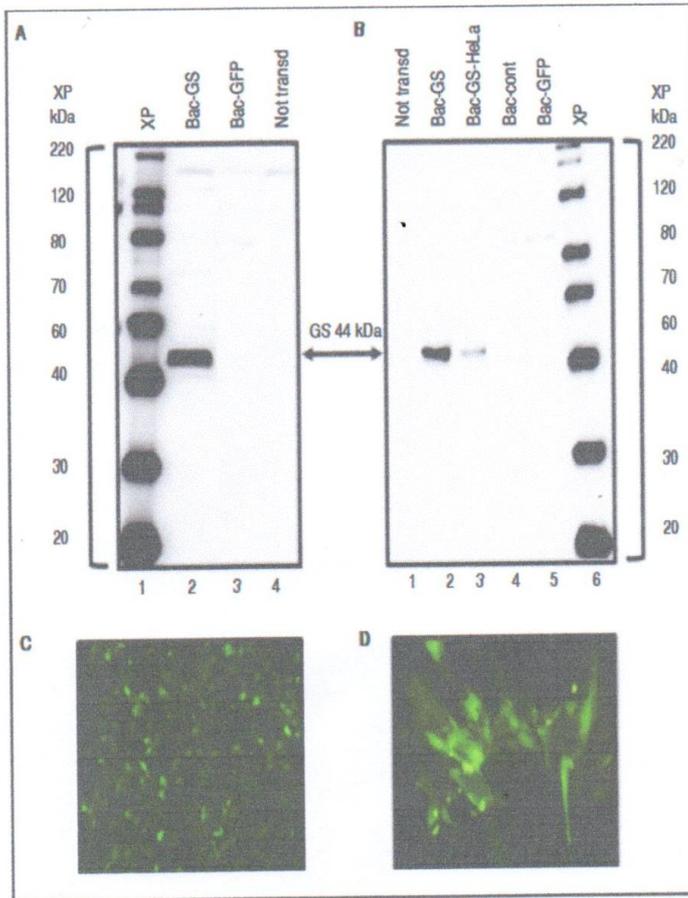


Figure 1. Expression of the therapeutic GS gene in HeLa and H9C2 myotubes by transduction with Bac-GS. Cells were transduced with 100 pfu/cell. Protein lysates (4 μg) were analyzed by Western blot with a specific anti-GS antibody. **A.** HeLa cells were transduced with Bac-GS (Lane 2), Bac-GFP (Lane 3), or not transduced (not transd, Lane 4). XP: XP molecular weight marker. **B.** H9C2 myotubes were transduced with Bac-GS (Lane 2), Bac-control (Bac-cont, Lane 4), Bac-GFP (Lane 5), or not transduced (Lane 1). A sample of the HeLa-Bac-GS lysate was loaded as a positive control in Lane 3. **C.** Living fluorescent imaging of HeLa cells transduced with Bac-GFP (20X). **d)** Living fluorescent imaging of H9C2 myotubes transduced with Bac-GFP (20X).

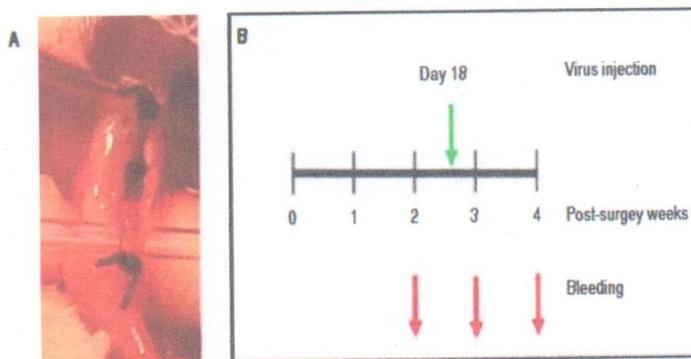


Figure 2. Establishment of the bile-duct ligation model for testing Bac-GS as a therapy to reduce hyperammonemia. **A.** Picture of one of the ligated bile-ducts showing the three ligations. **B.** Schedule of bleedings and i.m. injection of recombinant baculoviruses, with reference with the bile-duct ligation surgery.

four times more ammonia in their plasma ($291.9 \pm 35.3 \mu\text{M}$) than control ($65.1 \pm 28.1 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$) or sham ($71.4 \pm 22.0 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$) rats (Figure 3).

Reduction of high levels of ammonia in the bile-duct ligated rat model by Bac-GS administration

Once we have established the bile-duct ligation (BDL) model, the gene transfer therapy with the recombinant

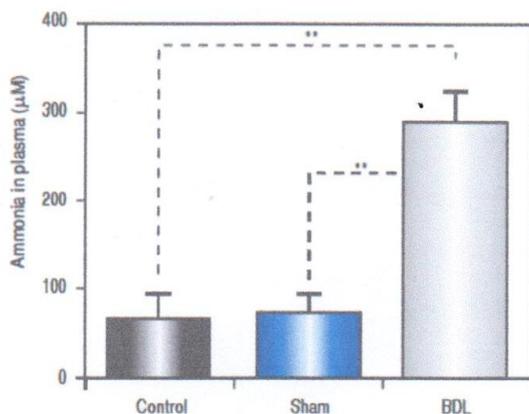


Figure 3. A strong bile-duct ligation (BDL) causes hyperammonemia in rats. Wistar rats were bile-duct ligated and bled from the tail 2 weeks post-surgery. Ammonia was quantified in plasma. Control, $n = 8$; sham, $n = 12$; BDL, $n = 12$. ** $P < 0.0001$.

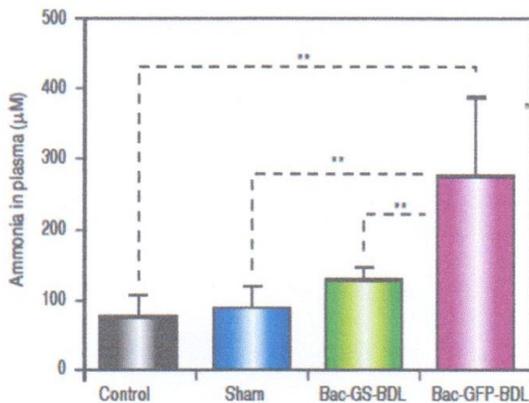


Figure 4. Gene therapy with recombinant baculovirus Bac-GS decreased hyperammonemia in a chronic liver disease model. Hyperammonemic bile-duct ligated (BDL) rats were divided in two groups and were i.m. injected with recombinant baculoviruses at 18 post-surgery days. One group ($n = 7$) received Bac-GS (9×10^7 pfu), Bac-GS + BDL, and the other ($n = 5$) received Bac-GFP (2×10^8 pfu, Bac-GFP+BDL). Control and sham rats were also monitored. Rats were bled from the tail 3 weeks post-surgery. Ammonia was quantified in plasma. Control, $n = 8$; sham, $n = 12$. ** $P < 0.0001$.

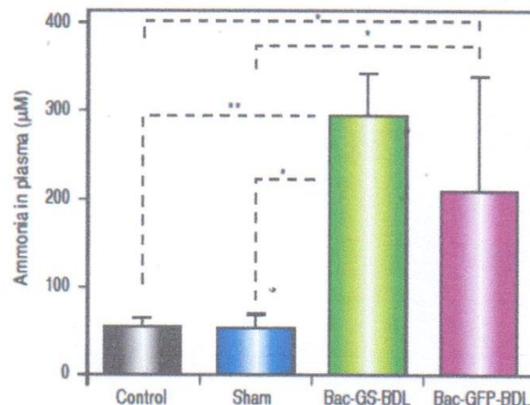


Figure 5. Recovery of hyperammonemia in bile-duct ligated (BDL) rats treated with Bac-GS. One group of hyperammonemic BDL rats received Bac-GS (9×10^7 pfu, Bac-GS + BDL, $n = 7$) and the other one received Bac-GFP (2×10^8 pfu, Bac-GFP + BDL, $n = 5$) at 18 days post-surgery. Rats were bled from the tail 4 post-surgery weeks. Ammonia was quantified in plasma. Control, $n = 8$; sham, $n = 12$. * $P < 0.001$; ** $P < 0.0001$.

baculovirus Bac-GS was tested. Hyperammonemic rats ($> 200 \mu\text{M}$, $n = 12$) were randomly divided in two groups; one was i.m. injected with Bac-GS ($n = 7$), while the other received a control baculovirus, i.e., Bac-GFP ($n = 5$), at 18 post-surgery days. Three days later, blood samples were taken from the tail artery and ammonia was quantified in the plasma (Figure 2B). Like in the acute hyperammonemia model reported before,¹⁴ we found low levels of ammonia in bile-duct ligated rats treated with Bac-GS ($128.3 \pm 19.0 \mu\text{M}$, Figure 4). In contrast, ligated rats injected with Bac-GFP remained hyperammonemic ($276.7 \pm 113.1 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$, Figure 4). Control and sham rats had low ammonia concentrations in plasma, $72.6 \pm 34.2 \mu\text{M}$ and $84.8 \pm 35.3 \mu\text{M}$, respectively. There was not significant difference between the control, sham and Bac-GS treated rats (Figure 4).

Transient effect of Bac-GS on ammonia reduction

It has been reported that baculovirus mediated-expression of transgenes in mammalian cells only lasts from one week to few months.^{27,28} We wanted to know if baculovirus mediated GS transduction was sustained over time. Blood samples were taken four weeks post-surgery, ten days after the i.m. injection of Bac-GS (Figure 2B). In comparison with control ($52.7 \pm 11.5 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$) and sham rats ($52.1 \pm 16.1 \mu\text{M}$, $p < 0.001$), the bile-duct-ligated rats treated with Bac-GS were hyperammonemic ($291.7 \pm 51.1 \mu\text{M}$, Figure 5). Ammonia concentration in plasma was similar to that obtained two weeks post-surgery (Figure

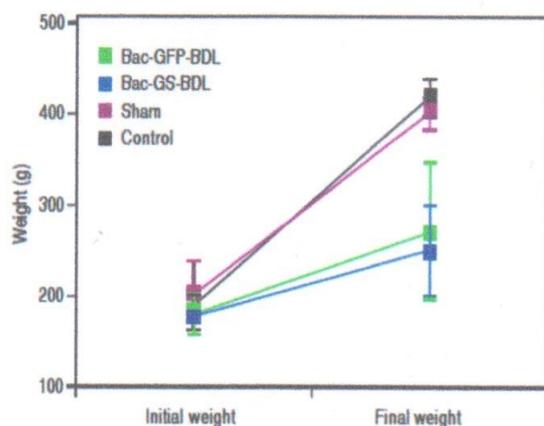


Figure 6. Changes in body weight of bile-duct ligated rats. One of the effects of bile-duct ligation (BDL) is translated to the growing or weight gain in the rats. At the time of the surgery all rats belonged to the same population and weight (Initial weight), but five weeks post-surgery (Final weight), the ligated rats significant weighted less in comparison with sham or control rats ($p < 0.0001$). There were no significant differences in the weight between the two groups of ligated rats that were injected with Bac-GS or Bac-GFP ($p > 0.05$).

3). The amount of ammonia in the plasma of bile-duct-ligated rats injected with Bac-GFP at four post-surgery weeks ($206.7 \pm 132.9 \mu\text{M}$) was not significantly different from the level found in rats receiving Bac-GS (Figure 5). Furthermore, there were differences in body weight accumulation between control, sham and bile-duct ligated rats, as shown in figure 6. Control and sham rats had similar weight gain (final weight, 410.9 ± 19.8 and 393.5 ± 16.0 , respectively, $p > 0.05$), but weight gain in ligated rats was significantly lower ($P < 0.0001$). The lower final weight in both Bac-GS and Bac-GFP injected bile-duct rats was similar (final weight, 247.3 ± 48.1 and 267.2 ± 75.3 g, respectively, $p > 0.05$).

DISCUSSION

Baculovirus is a versatile vector capable of transducing a variety of mammalian cells *in vitro* or *in vivo*. We have assessed the capacity of baculovirus vectors (Bac-GS and Bac-GFP) for transducing MA104 or HeLa cells (Torres-Vega, *et al.*, 2015;¹⁴ this work). GFP fluorescence or over-expression of the GS gene were detected in these cell lines. Furthermore, a significant reduction of ammonia levels (44%) after transduction with the baculovirus Bac-GS was observed in the *in vitro* hyperammonemia model established in MA104 cells.¹⁴ In addition, it was shown that baculovirus vectors can efficiently transduce muscle cells (myoblast/myotubes L6 or H9C2; Torres-Vega, *et al.*, 2015;¹⁴ this work), setting ground for the use of the large

muscle volume for the expression of missing or needed therapeutic activities. Moreover, the ability of baculovirus to transduce several types of cells can be used to identify other factors or proteins that may act along the GS activity in diminishing ammonia, and to translate the findings to an improved gene therapy for hyperammonemia. Other applications where a reduction in ammonia concentration is needed, such as the development of bioartificial livers, can also benefit from the results reported here.²⁹⁻³¹

Baculovirus mediated over-expression of GS in cells and myotubes was strong and it gave us confidence for testing the recombinant baculovirus for treatment of the main cause of HE, i.e., hyperammonemia. Previously we reported the i.m. administration of Bac-GS in rats with acute hyperammonemia, provoked by the i.p. injection of ammonium acetate, which resulted in a $351 \mu\text{M}$ decrease of plasma ammonia. This ammonia reduction was attributed to the over-expression of GS in skeletal muscle.¹⁴ Here, we tested Bac-GS gene therapy in an animal model for chronic hyperammonemia.

It has been proposed that an animal model of HE caused by chronic liver impairment (Type B and C HE) should include chronic liver disease with portal-systemic shunting, to show all the spectrum of HE symptoms including coma, the conversion of astrocytes in Alzheimer Type II, an elevated ammonia level in blood and brain, at least one precipitating factor, and the capability to give a positive response when the treatments used in the clinic are applied.¹⁹ However, there is no ideal animal model that reproduces all the pathologies showed in the cirrhosis-derived HE (type C). The bile-duct ligation model in rats exhibits most pathologies, including an elevation of ammonia in blood circulation for several weeks.^{19,32} We consider this is a satisfactory model for testing the gene therapy approach with Bac-GS, because the elevation of ammonia is in the context of other affections that could attack to the patients with liver failure.

We implemented the bile-duct ligation rat model in our laboratory, resulting in rats with ammonia levels above $200 \mu\text{M}$, in comparison with less than $100 \mu\text{M}$ in control rats. Gene therapy with Bac-GS in hyperammonemic rats was effective, as plasma ammonia levels diminished from $292 \pm 35 \mu\text{M}$ to $128 \pm 19 \mu\text{M}$ (Figure 4), a reduction of 56.2 %, at the third day after Bac-GS injection to the muscle. No significant difference between the ammonia plasma concentration in control and test animals was found (Figure 4). Therefore, Bac-GS treatment resulted in a decrease of ammonia concentration to normal levels. Worthy, rats treated with baculovirus did not exhibit any abnormal behavior or corporal affection during the days of study.

This result is relevant because it confirms our previous observation that recombinant Bac-GS can deliver the GS

gene, and mediate the decrease of hyperammonemia. The feasibility of ammonia reduction driven by Bac-GS has been demonstrated in three different models: one *in vitro* using MA104 cells, and two *in vivo*, the acute hyperammonemia model and the bile-duct ligation model that represents a chronic liver disease like cirrhosis (Torres-Vega, et al., 2015;¹⁴ this work). Reduction of hyperammonemia in the chronic model was observed at three days after baculovirus injection, but not at 10 days after virus injection.

This is not surprising, as it has been reported that expression of transgenes delivered by baculovirus is of short duration because of the activation of the adaptive immune response. Particularly interesting is the development of neutralizing antibodies and CD4+ γ CD8+ T-cells against gp64 baculovirus capsid protein.²⁸ Accordingly, Bac-GS is a genetic tool that can decrease hyperammonemia in acute liver failure or in episodes of acute on chronic liver failure, where the presence of hyperammonemia is not sustained. Interestingly, Lammers, et al. found that the disposal of glutamine-bound ammonia to urea is dependent on the generation of new synthesized glutamine.³³ This suggests that treatment with Bac-GS of acute and chronic hyperammonemic rats not only decreased the elevated blood ammonia levels directly by the activity of GS, i.e. by binding ammonia to glutamate, but probably also by stimulating the urea cycle.

To address the necessity of a prolonged expression of the GS therapeutic gene in liver failure patients with chronic hyperammonemia, we are already developing adeno-associated virus vectors (AAVs). These recombinant AAVs kept the expression of erythropoietin for six years after just one-time injection of the vector in the muscle of macaques.³⁴

Glutamine synthetase catalyzes the ATP-dependent glutamine synthesis from glutamate and ammonia.³⁵ GS is essential for life and normal development, as was evidenced in three patients with mutations in the GLUL gene, that generated structural changes and a decreased activity in GS. These patients showed neonatal onset severe epileptic encephalopathy, glutamine deficiency, hyperammonemia and brain malformations. They died one-two days to six years after birth.³⁶ The main enzyme responsible for ammonia detoxification is GS, as was demonstrated by using a liver-specific GS knockout mouse (GS-KO/L), showing that enteral ammonia was cleared in 35% by GS in pericentral hepatocytes, 35% by the urea cycle enzymes and the rest was cleared probably by GS in skeletal muscle.³⁵ These mice were hyperammonemic and showed low glutamine levels. Furthermore, it was identified that GS is solely responsible for systemic ammonia detoxification and there was a dependence of glutamine-bound ammonia disposal to urea (via mitochondrial glutaminase and carbamoylphosphate

synthetase) on the rate of glutamine synthesis. The whole-body muscle-to-fat volume ratio declined > 5-fold in GS-KO/L mice compared to controls.³³

Delivery of the GS gene to skeletal muscle as done here can be helpful in other conditions where ammonia accumulates and glutamine is lacking. Also, treatment with GS could reduce muscle loss in cirrhotics or in sarcopenia³⁷ and for urea-cycle disorders. An important consideration is that there is no evidence of a specific muscle tropism of baculovirus. It is very probable that other cells types in the body can also be transduced.

In conclusion, the strategy of delivering the GS gene *in vitro* or in skeletal muscle of rats with acute or chronic hyperammonemia through the administration of Bac-GS is a promising strategy to alleviate elevated ammonia levels in liver failure patients. The consolidation of this type of gene therapy could reduce the necessity for liver transplantation, increase the survival and improve the quality of life of hyperammonemia-dependent HE and urea cycle patients.

ABBREVIATIONS

- ACLF: acute-on-chronic liver failure.
- AcMNPV: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus.
- ATP: adenosine 5'-triphosphate.
- Bac-control: identical to Bac-GS but does not contain the GS gene.
- Bac-GFP: baculovirus vector containing the GFP gene.
- Bac-GS: baculovirus vector containing the GS gene.
- BDL: bile-duct ligation.
- cDNA: complementary DNA.
- FBS: fetal bovine serum.
- GABA: γ -aminobutyric acid.
- GFP: green fluorescent protein.
- GS: glutamine synthetase.
- GS-KO/L: liver-specific GS knockout mouse.
- HE: hepatic encephalopathy.
- i.m.: intramuscular.
- i.p.: intraperitoneal.
- IL: interleukin.
- MARS: molecular adsorbent recirculating system.
- MPT: mitochondrial permeability transition.
- NMDA: N-methyl-D-aspartate.
- Pfu: plaque forming unit.
- RNAi: RNA interference.
- TNF α : tumoral necrosis factor α .

CONFLICT OF INTEREST

The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

FUNDING

This work was partially financed by the Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT (IT-200315 and IN223210).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank CONACyT-México for giving a scholarship to Laura Sevilla during her graduate studies.

REFERENCES

1. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35: 716-21.
2. Suraweera D, Sundaram V, Saab S. Evaluation and Management of Hepatic Encephalopathy: Current Status and Future Directions. *Gut Liver* 2016; 10: 509-19.
3. Citro V, Milan G, Tripodi FS, Gennari A, Sorrentino P, Gallotta G, Postiglione A, et al. Mental status impairment in patients with West Haven grade zero hepatic encephalopathy: the role of HCV infection. *J Gastroenterol* 2007; 42: 79-82.
4. Felipe V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 851-8.
5. Sawhney R, Holland-Fischer P, Rosselli M, Mookerjee R, Agarwal B, Jalan R. Role of ammonia, inflammation and cerebral oxygenation in brain dysfunction of acute on chronic liver failure patients. *Liver Transpl* 2016; 22: 732-42.
6. Vierling JM, Mokhtarani M, Brown RS Jr, Mantry P, Rockey DC, Ghabril M, Rowell R, et al. Fasting Blood Ammonia Predicts Risk and Frequency of Hepatic Encephalopathy Episodes in Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14: 903-6.
7. Iwasa M, Sugimoto R, Mifuji-Moroka R, Hara N, Yoshikawa K, Tanaka H, Eguchi A, et al. Factors contributing to the development of overt encephalopathy in liver cirrhosis patients. *Metab Brain Dis* 2016; 31: 1151-6.
8. Oja SS, Saransaari P, Korpi ER. Neurotoxicity of Ammonia. *Neurochem Res* 2017; 42: 713-20.
9. Aghaei I, Hajali V, Dehpour A, Haghani M, Sheibani V, Shabani M. Alterations in the intrinsic electrophysiological properties of Purkinje neurons in a rat model of hepatic encephalopathy: Relative preventing effect of PPAR γ agonist. *Brain Res Bull* 2016; 121: 16-25.
10. Davuluri G, Krokowski D, Guan BJ, Kumar A, Thapaliya S, Singh D, Hatzoglou M, et al. Metabolic adaptation of skeletal muscle to hyperammonemia drives the beneficial effects of l-leucine in cirrhosis. *J Hepatol* 2016; 65: 929-37.
11. Jalan R, De Chiara F, Balasubramanian V, Andreola F, Khetan V, Malago M, Pinzani M, et al. Ammonia produces pathological changes in human hepatic stellate cells and is a target for therapy of portal hypertension. *J Hepatol* 2016; 64: 823-33.
12. Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: the concept of synergism revisited. *Metab Brain Dis* 2016; 31: 1211-15.
13. Rahimi RS, Rockey DC. Hepatic Encephalopathy: Pharmacological Therapies Targeting Ammonia. *Semin Liver Dis* 2016; 36: 48-55.
14. Torres-Vega MA, Vargas-Jerónimo RY, Montiel-Martínez AG, Muñoz-Fuentes RM, Zamora-Carrillo A, Pastor AR, Palomares LA. Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia. *Gene Ther* 2015; 22: 58-64.
15. Makkonen KE, Airene K, Ylä-Herttuala S. Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications. *Viruses* 2015; 7: 2099-125.
16. Mansouri M, Bellon-Echeverría I, Rizk A, Ehsaei Z, Cianciolo Cosentino C, Silva CS, Xie Y, et al. Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells. *Nat Commun* 2016; 7: 11529. doi: 10.1038/ncomms11529.
17. Palomares LA, Realpe M, Ramírez OT. An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). In: Al-Rubeai M (ed.). *Animal Cell Culture, Cell Engineering 9*. Chapter 15. Switzerland: Springer International Publishing; 2015, p. 501-19.
18. Kwang TW, Zeng X, Wang S. Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016; 3: 15050. doi:10.1038/mtm.2015.50. eCollection 2016.
19. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009; 29: 783-8.
20. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* 2003; 34: 260-4.
21. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 1976; 98: 367-81.
22. Giménez-Garzó C, Salhi D, Urios A, Ruiz-Sauri A, Carda C, Montoliu C, Felipe V. Rats with Mild Bile Duct Ligation Show Hepatic Encephalopathy with Cognitive and Motor Impairment in the Absence of Cirrhosis: Effects of Alcohol Ingestion. *Neurochem Res* 2015; 40: 230-40.
23. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: 1257-66.
24. Kaplan A. Urea, nitrógeno and urinary ammonia. In: Meites S (ed.). *Standard Methods of Clinical Chemistry*. New York: Academic Press Inc; 1965, p. 245-56.
25. Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 127-32.
26. Tag CG, Weiskirchen S, Hittatiya K, Tacke F, Tolba RH, Weiskirchen R. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice. *Lab Anim* 2015; 49: 70-80.
27. Pieroni L, Maione D, La Monica N. In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 871-81.
28. Luo WY, Lin SY, Lo KW, Lu CH, Hung CL, Chen CY, Chang CC, et al. Adaptive immune responses elicited by baculovirus and impacts on subsequent transgene expression in vivo. *J Virol* 2013; 87: 4965-73.
29. Miyashita T, Enosawa S, Suzuki S, Tamura A, Tanaka H, Amemiya H, Matsumura T, et al. Development of a bioartificial liver with glutamine synthetase-transduced recombinant human hepatoblastoma cell line, HepG2. *Transplant Proc* 2000; 32: 2355-58.
30. Tang NH, Wang XQ, Li XJ, Chen YL. Ammonia metabolism capacity of HepG2 cells with high expression of human glutamine synthetase. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 621-7.

31. van Wenum M, Adam AA, Hakvoort TB, Hendriks EJ, Schevchenko V, van Gulik TM, Chamuleau RA, et al. Selecting Cells for Bioartificial Liver Devices and the Importance of a 3D Culture Environment: A Functional Comparison between the HepaRG and C3A Cell Lines. *Int J Biol Sci* 2016; 12: 964-78.
32. Díaz-Gómez D, Jover M, del-Campo JA, Galindo A, Romero-Gómez M. Experimental models for hepatic encephalopathy. *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 536-41.
33. Hakvoort TB, He Y, Kulik W, Vermeulen JL, Duijst S, Ruijter JM, Runge JH, et al. Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification. *Hepatology* 2017; 65: 281-93.
34. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zolnick PW, Rozamus LW, Clackson T, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; 105: 1424-30.
35. Moreira C, Ramos MJ, Fernandes PA. Glutamine Synthetase Drugability beyond Its Active Site: Exploring Oligomerization Interfaces and Pockets. *Molecules* 2016; 21: pii: E1028. doi: 10.3390/molecules21081028.
36. Spodenkiewicz M, Diez-Fernandez C, Rufenacht V, Gemperle-Britschgi C, Häberle J. Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. *Biology (Basel)* 2016; 5: pii: E40. doi:10.3390/biology5040040.
37. Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia from mechanism to diagnosis and treatment in liver disease. *J Hepatol* 2016; 65: 1232-44.

Correspondence and reprint request:

Miguel Angel Torres Vega, Ph.D.
Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de
Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga, No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección
XVI. Deleg. Tlalpan, C. P. 14080. Ciudad de México, México.
Tel.: 5255 5487-0900, Ext. 2711
Fax: 52 55 565-50-900
E-mail: m1torres3125.matv@gmail.com