

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG29
MUTANTE COMO VEHÍCULO PARA ENTREGA DE
MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO MURINO**

PRESENTA

M. EN C. SHEILA ADELA VILLA CEDILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA

AGOSTO 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG29
MUTANTE COMO VEHÍCULO PARA ENTREGA DE
MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO MURINO**

Presenta

M. EN C. SHEILA ADELA VILLA CEDILLO

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con orientación en Morfología**

AGOSTO 2017

**“ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG29 MUTANTE COMO
VEHÍCULO PARA ENTREGA DE MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO
MURINO”**

Aprobación de la Tesis:



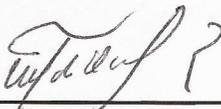
DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS

Director de tesis



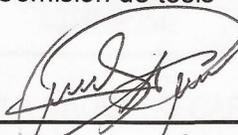
DRA. LAURA MIREYA ZAVALA FLORES

Co-director de tesis



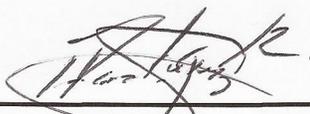
DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

Comisión de tesis



DRA. ARACELY GARCÍA GARCÍA

Comisión de tesis



DR. HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA

Comisión de tesis



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de estudios de posgrado

**ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG29m COMO VEHÍCULO
PARA ENTREGA DE MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO MURINO**

Presentado por: .

M. en C. Sheila Adela Villa Cedillo

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la co-dirección de la Dra. Laura Mireya Zavala Flores.



DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS

Director de tesis



DRA. LAURA MIREYA ZAVALA FLORES

Co-director de tesis

A mis padres, Sergio y Laura

A mi hermano Sergio

Con todo mi amor

Agradecimientos

A mi pilar, mi fuerza, mi hermosa familia: mis padres y mi hermano Sergio, presentes siempre desde la distancia.

A mi mejor amigo, José Juan, que con su apoyo y cariño incondicional me enseña a ser una mejor persona cada día.

A los miembros de mi comisión, a mi directora de tesis, Dra. Odila, que con su ejemplo como excelente investigadora y ser humano ha dejado una huella en mi vida. Por siempre estar ahí a cualquier hora, cualquier día. Gracias por permitirme aprender de usted y hacer posible esto.

A la Dra. Laura por su paciencia, siempre tener palabras de apoyo y consejos acertados tanto profesionales como personales. Al Dr. Roberto, por permitirme ser parte del Departamento de Histología, dedicarme su tiempo, paciencia y resolver todas mis dudas. A la Dra. Aracely y el Dr. Humberto, por todas sus enseñanzas, consejos e inspirarme a ser una mejor estudiante.

A mis maestros, amigos, compañeros y personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina UANL: Dra. Marichu, Dr. Arnulfo, Dr. Adolfo, Dra. Raquel. A mis compañeros de posgrado: Aby, Ana, Fany, Daniel M, Jorge y David.

Al Laboratorio de Genética Molecular del CIBN IMSS, por hacer más amenos estos 4 años y brindarme su apoyo incondicional: Jared, Luis Felipe, Leyla, Natalia, Erick, Anahí y Maribel.

A mis amigas, Edith, Cinthia, Rebeca y Halley por acompañarme durante esta aventura.

Al CONACYT por permitirme alcanzar mis metas por medio de la beca.

ÍNDICE

Agradecimientos	v
Lista de tablas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
2.1 Mecanismos de los procesos neurodegenerativos.....	2
2.2 Barrera Hematoencefálica	2
2.3 Sistemas de entrega de moléculas terapéuticas al cerebro.....	4
2.4 Péptidos con capacidad de penetración celular	4
2.5 CPPs como vectores neurotróficos	5
2.6 Glucoproteína del Virus de la Rabia.....	5
2.7 RVG29.....	8
2.8 Mecanismo de internalización de RVG29.....	10
2.9 Péptido señal de localización nuclear	12
3. Justificación.....	13
4. Objetivo General	14
5. Objetivos Específicos	14
6. Materiales y Métodos	15
6.1 Estrategia experimental	15

6.2 Material y Equipo	15
6.2.1 Reactivos.....	15
6.2.2 Equipo	17
Cultivo de células.....	17
Cirugía estereotáxica.....	17
Perfusión Cardíaca.....	17
RT-PCR.....	17
Citometría de Flujo	17
Análisis de datos	18
6.3 Metodología	18
6.3.1 Preparación de los complejos RVG29 y caracterización por geles de retardo.....	18
6.3.2 Ensayo de bioestabilidad	18
6.3.3 Cultivo celular.....	19
6.3.4 Cultivos primarios de astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos (OPCs).....	19
6.3.5 Transfección Celular.....	20
6.3.6 Tratamiento de cubreobjetos con APTES.....	20
6.3.7 Inmunofluorescencia en cultivo celular	20
6.3.8 Mecanismo de internalización.....	21

6.3.11	Inclusión de tejidos en parafina	22
6.3.12	Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en cortes histológicos	22
6.3.13	Obtención del RNA total	23
6.3.14	RT-PCR	23
6.3.15	Análisis Estadístico	25
7.	Resultados	26
7.1	Obtención de los complejos RVG29.....	26
7.2	La mutación Asn194Lys en el péptido RVG29s aumenta la capacidad de transfección celular del complejo pGL-RVG29m.....	28
7.3	El complejo pGL-RVG29m sin KP tiene una capacidad de transfección celular similar a pGL-RVG29s con KP	29
7.4	Los complejos RVG tienen capacidad de transfectar células de fenotipo neuronal y astrocitos.....	33
7.5	El proceso de endocitosis está implicado en la internalización celular de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP	36
7.6	Bio-estabilidad de los complejos RVG29 en suero de ratón.....	40
7.7	Los complejos RVG29 son capaces de transfectar células del Sistema Nervioso Central en el cerebro murino.....	41
7.8	El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar astrocitos, oligodendrocitos y microglía de corteza e hipocampo	51
8.	Discusión.....	54

9.	Conclusiones.....	60
10.	Perspectivas.....	61
11.	Bibliografía	62
12.	Anexos	70

Lista de tablas

Tabla 1. Estudios que reportan RVG29 para la entrega de moléculas cargo con acción terapéutica hacia el SNC.	10
Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de secuencia para los genes de interés....	24
Tabla 3. Reactivos y concentración utilizados en PCR usando cDNA como templado.	24
Tabla 4. Condiciones del termociclador para amplificación de los genes deseados.	25

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de la barrera hematoencefálica	3
Figura 2. Mecanismo de internalización del virus de la rabia en las neurona	7
Figura 3. Subunidades de los nAChRs de tipo neuronal	8
Figura 4. Mecanismo de internalización del complejo RVG-Arg-siRNA en neuronas.....	12
Figura 5. Estrategia experimental.....	15
Figura 6. Geles de retardo de los complejos RVG29.....	27
Figura 7. Geles de retardo de los complejos RVG29-KP.....	28
Figura 8. La mutación Asn194Lys en el péptido RVG29s del complejo pGL-RVG29m y la adición del KP incrementan la capacidad de transfección.....	31
Figura 9. La adición del KP en los complejos RVG incrementa la eficiencia de transfección en células SH-SY5Y.....	32
Figura 10. Los complejos RVG29 se internalizan eficientemente en células neuronales	33
Figura 11. Los complejos RVG29 tienen capacidad para transfectar células de fenotipo neuronal.	34
Figura 12. Los complejos RVG29 se internalizan en astrocitos.....	35
Figura 13. Los complejos RVG29 no se internalizan en OPC.	36
Figura 14. La internalización celular de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP es dependiente del proceso de endocitosis	39
Figura 15. Estabilidad de los complejos RVG29 en presencia de suero.....	41

Figura 16. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 2 días post-inyección	42
Figura 17. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 4 días post-inyección	43
Figura 18. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 20 días post-inyección	43
Figura 19. Los complejos RVG29 tienen la capacidad de transfectar células en la corteza a los 4 días post-inyección	44
Figura 20. Los complejos RVG29 tienen la capacidad de transfectar células en hipocampo a los 4 días post-inyección.....	45
Figura 21. Expresión de GFP en neuronas de corteza de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29	47
Figura 22. Expresión de GFP en neuronas de hipocampo de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29	48
Figura 23. Expresión de GFP en células de cuerpo estriado de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29	49
Figura 24. Transfección celular por el complejo pGL-RVG29m-KP en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo al realizar la inyección en ventrículos	50
Figura 25. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar astrocitos de corteza e hipocampo.....	51
Figura 26. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar oligodendrocitos en corteza de cerebro murino.....	52
Figura 27. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar microglía de la corteza de cerebro murino	53

Lista de abreviaturas

%	Por ciento
°	Grado angular
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés
BSA	Albúmina de suero bovino, por sus siglas en inglés
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-DiAmida-2-Fenidol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotretaacético
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína, por sus siglas en inglés
SFB	Suero fetal bovino
Kb	Kilo base
kDa	Kilodalton
Mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
lbs	Libras
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
p<	Grado de significancia

Pb	Pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino, por sus siglas en inglés
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
TAE	Tris-Acetato-EDTA (Buffer)
U	Unidades
UV	Ultravioleta
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos
mAChR	Receptores de acetilcolina muscarínicos
KP	Péptido cariofílico (por sus siglas en inglés)
NLS	Señalización de Localización Nuclear
EP	Enfermedad de Parkinson
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
BHE	Barrera Hematoencefálica
CPPs	Péptidos con Capacidad de Penetración Celular (por sus siglas en inglés)
AAV	Virus Adenoasociados (por sus siglas en inglés)
Col	Colaboradores
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
CA	Cuerno de Amón
GD	Giro dentado

RESUMEN

M.C. Sheila Adela Villa Cedillo
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Titulación: Agosto 2017

Título del estudio:

“ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG29 MUTANTE COMO VEHÍCULO PARA ENTREGA DE MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO MURINO”

Páginas en el estudio: 90

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Morfología

Área de estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio:

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte progresiva de neuronas y aún no existe un tratamiento efectivo que detenga este proceso neurodegenerativo. La terapia génica se perfila como una estrategia prometedora. Péptidos de penetración celular permiten la entrega de genes terapéuticos y poseen muy baja toxicidad. El péptido RVG es una secuencia de aminoácidos de la glucoproteína del virus de la rabia, que confiere tropismo para neuronas del sistema nervioso central. Para aumentar la entrega de genes a células de fenotipo neuronal, se introdujo una mutación de Asn194Lys al péptido RVG y se analizó su especificidad celular *in vitro* e *in vivo*.

El péptido RVG mutante o RVG de tipo silvestre, un péptido cariofílico (KP) y un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (pGreenLantern-1) se unieron mediante cargas electrostáticas para formar cuatro complejos RVG diferentes. Se evaluó la eficiencia de transfección de los complejos RVG en las líneas celulares SH-SY5Y, HeLa, NIH / 3T3 y en cultivos primarios de astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos (OPC). El mecanismo de captación celular de los complejos RVG se examinó utilizando inhibidores de endocitosis. Para evaluar la capacidad de transfección de los complejos RVG *in vivo*, mediante cirugía estereotáxica se inyectaron los complejos RVG en corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo de ratones C57BL/6. La expresión del gen reportero (GFP) se analizó a los 2, 4 y 20 días post-transfección mediante inmunohistoquímica y RT-PCR.

Conclusiones y Contribuciones:

El péptido RVGm tiene la capacidad de potenciar la importación nuclear de plásmidos. La mutación Asn194Lys en el péptido RVGm del complejo pGL-RVGm y la adición de KP al complejo pGL-RVGs-KP incrementaron la capacidad de transfección de los complejos RVG mediante endocitosis en astrocitos y células SH-SY5Y.

Los complejos pGL-RVGm y pGL-RVGs-KP tienen capacidad para transfectar la mayoría de los tipos celulares de la corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo. La expresión de los complejos es estable 20 días post-transfección en cerebro murino. La capacidad de transfección de este nuevo péptido RVGm lo hace un excelente candidato como vector de entrega de genes terapéuticos en las enfermedades neurodegenerativas.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas

Directora de Tesis

Abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by the progressive death of neurons and there is still no effective treatment that stops this neurodegenerative process. Gene therapy is emerging as a promising strategy. Cell penetrating peptides allow the delivery of therapeutic genes and possess very low toxicity. The RVG peptide is an amino acid sequence of the rabies virus glycoprotein, which confers tropism to neurons of the central nervous system. To increase gene delivery to neuronal phenotype cells, a mutation of Asn194Lys was introduced into the RVG peptide and its cell specificity was analyzed *in vitro* and *in vivo*.

Mutant RVG or wild-type RVG peptide, a karyophilic peptide (KP) and a plasmid encoding fluorescent green protein (pGL) were bound by electrostatic charges to form four different RVG complexes. The transfection efficiency of the RVG complexes in the SH-SY5Y, HeLa, NIH / 3T3 cell lines and in primary cultures of astrocyte and oligodendrocyte precursor cells (OPC) was evaluated. The cellular uptake mechanism of the RVG complexes was examined using endocytosis inhibitors. To evaluate the transfection ability of RVG complexes *in vivo*, RVG complexes were injected into the cerebral cortex, striatum and hippocampus of C57BL / 6 mice by stereotactic surgery. Expression of the reporter gene (GFP) was analyzed at 2, 4 and 20 days post-transfection by immunohistochemistry and RT-PCR.

The RVGm peptide has the ability to enhance the nuclear import of plasmids. The Asn194Lys mutation in the RVGm peptide of the pGL-RVGm complex and the addition of KP to the pGL-RVGs-KP complex increased the transfection ability of RVG complexes by endocytosis in astrocytes and SH-SY5Y cells.

The pGL-RVGm and pGL-RVGs-KP complexes have the ability to transfect most cell types in the cerebral cortex, striatum and hippocampus. Expression of complexes is stable 20 days post-transfection in murine brain. The transfection ability of this novel RVGm peptide makes it an excellent candidate as a therapeutic gene delivery vector in neurodegenerative diseases.

1. Introducción

En los últimos años, se ha registrado un aumento en la esperanza de vida en la población mundial, debido a esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado el envejecimiento como un tema prioritario de salud. Lo anterior y la disminución de la tasa de fecundidad han dado como resultado un incremento considerable en la proporción de personas mayores de 60 años. En México en los próximos 50 años, más de la cuarta parte de la población será adulto mayor (World-Health-Organization 2015).

Uno de los órganos que se ve afectado de una manera importante al envejecer es el cerebro, esto conlleva al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson (EP), Enfermedad de Alzheimer (EA) o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Numerosos esfuerzos se han llevado para el desarrollo de tratamientos para enfermedades neurodegenerativas que sean efectivos y específicos para las células y procesos afectados. Debido a las limitaciones en los sistemas de entrega, principalmente debido a su baja eficacia para atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE) y las membranas celulares, existe la necesidad de encontrar nuevos métodos que puedan incrementar el transporte al interior celular (Pardridge 2002). Se han propuesto varias técnicas para resolver este problema de penetración de la membrana celular como la electroporación, microinyección, vectores virales y encapsulación liposomal. Sin embargo, estos métodos tienen poca eficiencia de transporte y citotoxicidad, además de ser altamente invasivos para su aplicación *in vivo*. Los péptidos de penetración celular (CPPs, por sus siglas en inglés) constituyen una técnica eficaz para el transporte de macromoléculas a través de la membrana celular, los cuales pueden ser usados para el transporte terapéutico en enfermedades neurodegenerativas.

2. Antecedentes

2.1 Mecanismos de los procesos neurodegenerativos

Los mecanismos que desencadenan la neurodegeneración aún no han sido dilucidados. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en esclarecer estos mecanismos de neurodegeneración que afectan la supervivencia y muerte neuronal. El proceso de neurodegeneración no es dependiente de un solo tipo celular. La disfunción glial puede afectar la neurotoxicidad de muchas maneras. La neuroglía tiene un papel importante en la protección del Sistema Nervioso Central (SNC) por medio de múltiples mecanismos homeostáticos (Schlachetzki, Zhang *et al.* 2004, Lobsiger and Cleveland 2007). En diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas se ha observado que los mecanismos celulares de neurodegeneración están fuertemente influenciados por la disfunción glial (Lobsiger and Cleveland 2007).

Se ha demostrado que la activación de la microglía y la astrogliosis son eventos claves en la pérdida neuronal y progresión de la EP, es por ello que se han propuesto estos tipos celulares como un blanco terapéutico para neuroprotección (Hirsch and Hunot 2009).

2.2 Barrera Hematoencefálica

Existen 3 principales barreras que regulan el intercambio molecular entre la sangre y el cerebro: el epéndimo, la barrera hemato-nerviosa y la Barrera hematoencefálica (BHE). En la BHE interactúan el endotelio y su lámina basal, astrocitos y pericitos neuronas y la matriz extracelular como se esquematiza en la figura 1 (Carvey, Hendey *et al.* 2009).

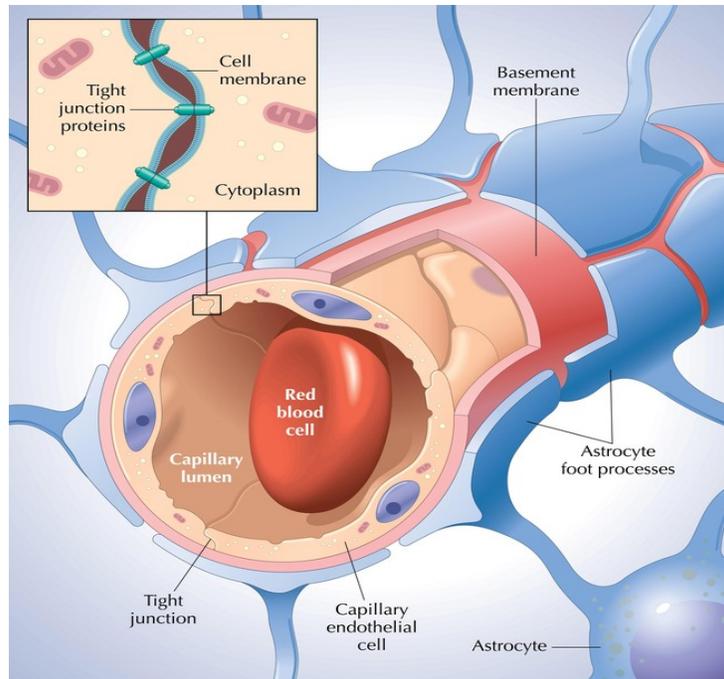


Figura 1. Esquema de la barrera hematoencefálica (Felten and Józefowicz 2003).

La nueva generación de tratamientos para los procesos neurodegenerativos pretende combinar nuevos fármacos y terapia génica. Sin embargo, el problema principal para la transferencia de moléculas terapéuticas hacia el cerebro es la BHE.

El papel de la BHE para controlar la entrada de cualquier sustancia en el SNC es muy restrictivo, pero, a pesar de esta restricción, existen diversos mecanismos por los cuales las moléculas terapéuticas pueden atravesar la BHE como son el sistema de transporte saturado, la difusión transmembranal por endocitosis, receptores y otras vías extracelulares.

Otro de los mecanismos para evadir la BHE, y que es utilizado tradicionalmente en terapia génica, es la administración intracraneal directa de moléculas terapéuticas en cerebro (Azimi, Yadollahikhales *et al.* 2017).

2.3 Sistemas de entrega de moléculas terapéuticas al cerebro

Entre los principales sistemas de entrega de moléculas terapéuticas al cerebro se encuentran los vectores virales, los vectores sintéticos y los péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs).

Los vectores virales, como los adenovirus y los virus adenoasociados (AAV), son los más usados para la transferencia de genes en ensayos clínicos. Este tipo de vectores tienen la capacidad de transfectar eficientemente a las células, sin embargo, presentan problemas de inmunogenicidad y citotoxicidad (Anson 2004).

Los vectores sintéticos, como el poliplex, por si solos no tienen capacidad de dirección a una célula blanco, pero tienen como ventaja una flexibilidad química que permite la adición de moléculas de direccionamiento celular específico (Chiou, Tangco *et al.* 1994).

2.4 Péptidos con capacidad de penetración celular

A finales de los 80's y principios de los años 90 fueron identificadas pequeñas secuencias de péptidos que tienen la habilidad de transportar diferentes clases de macromoléculas que normalmente no pueden internalizarse a la célula, tales como ácidos nucleicos y proteínas (Heitz, Morris *et al.* 2009).

Los CPPs son polipéptidos cortos de alrededor de 30 aminoácidos con capacidad de penetración celular que pueden ser encontrados de manera natural o sintetizados, y se utilizan como vectores para el transporte de macromoléculas (Zhang, Wang *et al.* 2016). Los CPPs tienen la capacidad de cruzar membranas celulares eficientemente con baja citotoxicidad y pueden sintetizarse fácilmente (Heitz, Morris *et al.* 2009, McGMcGowan, Bidwell *et al.* 2015). Sin embargo, tienen una baja especificidad ya que se internalizan en la mayoría de los tipos de células (Deshayes, Morris *et al.* 2005). Un sistema de entrega basado en péptidos puede ser específico cuando estos solamente interactúan con un tipo de receptor presente en una célula particular para la entrega de moléculas terapéuticas.

Para incrementar la eficiencia de transfección de los CPPs se ha llevado a cabo la modificación de aminoácidos para aumentar su afinidad de interacción con moléculas cargo. Una de las principales sustituciones es el incremento de argininas, ya que contienen fuertes cargas positivas que pueden ayudar a la unión de ácidos nucleicos con los CPPs, como ha sido demostrado en varios polipéptidos ricos en arginina (Futaki 2005, Amand, Fant *et al.* 2008).

2.5 CPPs como vectores neurotróficos

Uno de los primeros péptidos con características neurotróficas que llamó la atención fue TAT, derivado de la proteína trans-activadora del Virus de Inmunodeficiencia Humana TAT, el cual entra eficientemente en las células y promueve la expresión génica viral (Green and Loewenstein 1988). Se ha reportado que el péptido TAT 47-57 (YGRKKRRQRRR) puede transportar macromoléculas exógenas hacia el cerebro para el tratamiento de la EA, EP y depresión (Wu, Fu *et al.* 2006).

Otro péptido es el RDP el cual consiste en los aminoácidos 330-357 de la Glucoproteína del Virus de la Rabia (RVG, por sus siglas en inglés) el cual se ha administrado de forma sistémica para transportar proteínas de diferente tamaño hacia el cerebro de ratones (Fu, Wang *et al.* 2012). También se ha demostrado que el RDP puede entregar DNA hacia el cerebro e internalizarse dentro de las neuronas como un componente no-viral (Fu, Zhang *et al.* 2013, Fu, Zhao *et al.* 2013).

2.6 Glucoproteína del Virus de la Rabia

La rabia es una enfermedad zoonótica causada por el virus de la rabia que se transmite por la mordedura de un animal, principalmente de zorros, mapaches y otros roedores. Sin embargo, también es común encontrarlo en animales domésticos como los perros. El virus de la rabia es un virus de cadena sencilla de RNA de aproximadamente 12 kb de la familia *Rhabdoviridae* y del género *Lyssavirus* (Jackson 2016). El virus de la rabia codifica cinco proteínas

estructurales que en orden 3' a 5' son nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de matriz, glucoproteína y una RNA polimerasa (Albertini, Ruigrok *et al.* 2011).

El virus afecta principalmente a las neuronas motoras al entrar a través de la unión neuromuscular por medio de la infección en músculo (Lafon 2005). También se ha reportado infección en neuronas sensoriales. Se ha identificado que el transporte retrógrado (Figura 2) es el método de transporte del virus de la rabia hacia las neuronas motoras y sensitivas (Cherian, Singh *et al.* 2015).

RVG es el único componente viral expuesto en la superficie del virus y es el mayor determinante de la patogenicidad viral (Zhu and Guo 2016). RVG es una glucoproteína de membrana tipo I y está compuesta por 505 aminoácidos. Se ha propuesto que el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) es el receptor celular que interactúa con el virus, esto se debe a que se ha detectado el virus cerca de los sitios del nAChR y en los microtubos (Lentz, Burrage *et al.* 1982). Sin embargo, otras moléculas deben estar involucradas en la infección por el virus de la rabia dado que al bloquear los nAChR no se previene del todo la infección. La detección de regiones de nAChR en las uniones neuromusculares permite la internalización del virus de la rabia a través de la unión neuromuscular permitiendo su consecuente transportación al SNC (Lentz, Burrage *et al.* 1982).

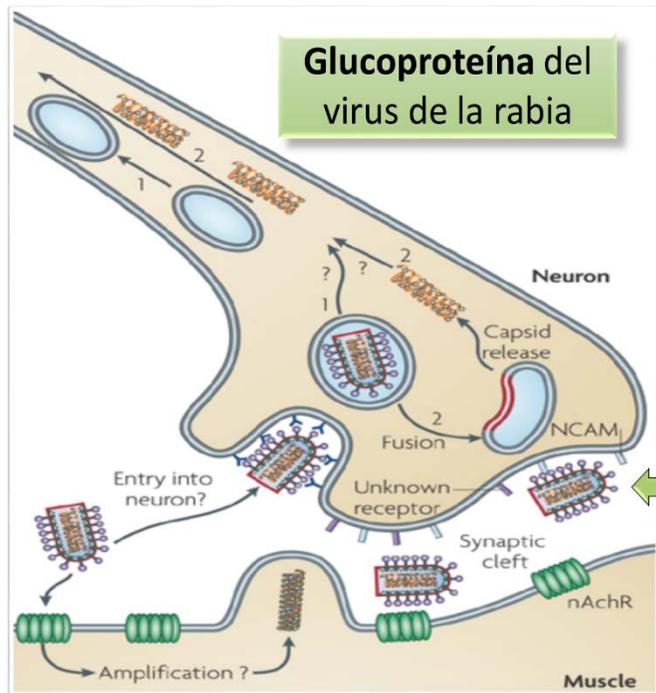


Figura 2. Mecanismo de internalización del virus de la rabia en las neuronas. El transporte retrógrado se realiza mediante el reconocimiento de la glucoproteína del virus de la rabia por los receptores de acetilcolina.

Existen dos subtipos de receptores de acetilcolina en el cuerpo humano, los receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) y los nicotínicos (nAChR). Estos dos receptores son activados por el ligando de acetilcolina tanto en sitios neuronales como no-neuronales. Los nAChRs se dividen de manera clásica en dos tipos, neuronal y no-neuronal. Sin embargo, se ha encontrado evidencia que el tipo neuronal se encuentra en otras áreas del cerebro además del SNC (Ferreira-Vieira, Guimaraes *et al.* 2016).

Los nAChRs existen de manera homopentamérica o heteropentamérica, esto significa que están compuestos típicamente por cinco subunidades alrededor de un poro central. Hasta el momento, en los nAChRs de tipo neuronal se han encontrado nueve tipos de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres tipos de subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$). No todas ellas pueden combinarse entre sí, pero es posible encontrar una

gran diversidad de receptores. El receptor neuronal predominante en el cerebro y principal responsable de los sitios de alta afinidad para nicotina es el formado por las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$. Se muestra un ejemplo de nAChRs de tipo neuronal en la figura 3 (Buckingham, Jones *et al.* 2009).

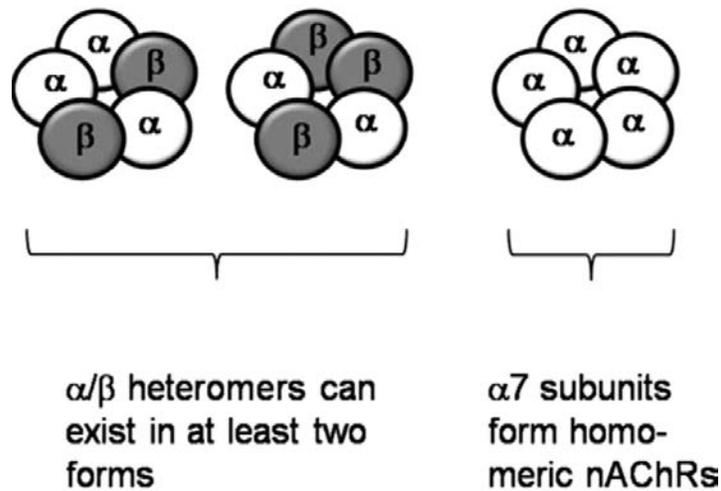


Figura 3. Subunidades de los nAChRs de tipo neuronal. $\alpha 7$ homopentamérica y $\alpha 4\beta 2$ heteropentamérica.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el reemplazo de aminoácidos en los CPPs puede mejorar la internalización de la molécula cargo en las células blanco. Faber y col. descubrieron que un solo cambio de un aminoácido en el sitio de unión al receptor incrementa la propagación y patogenicidad del virus de la rabia. Ellos encontraron una mayor cantidad de células infectadas por el virus que porta esta mutación de asparagina por lisina en el hipocampo e hipotálamo de ratones infectados (Faber *et al.* 2005).

2.7 RVG29

RVG posee propiedades neurotrópicas y es por ello que algunos fragmentos de esta proteína se han utilizado en el transporte de moléculas cargo al cerebro. Kumar y col. utilizaron un péptido corto de 29 aminoácidos de la proteína RVG (RVG29) para dirigir un siRNA hacia el SNC mediante una aplicación intravenosa,

logrando inhibir la expresión del virus de la encefalitis japonesa debido a la alta eficiencia de transfección del siRNA. Además, este grupo demostró que el RVG29 interactúa específicamente con células de tipo neuronal y no con las de tipo no-neuronal como las HeLa (Kumar, Wu *et al.* 2007). Diversos estudios han reportado el uso de conjugados con el péptido RVG obteniendo resultados prometedores para la transfección de neuronas, tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndose en un atractivo vector para terapia génica en SNC (Son, Hwang *et al.* 2011, Rohn, Suttkus *et al.* 2012).

Estudios recientes (Tabla 1) han probado complejos modificados de RVG29 ligado a moléculas de quitosano trimetilado para la entrada de siRNA, mostrando una mayor afinidad por tipos celulares que tienen receptores de acetilcolina así como la entrega efectiva de siRNA al SNC. Además, con el uso de esta estrategia demostraron el silenciamiento efectivo para el gen BACE1, que es un blanco terapéutico para la EA (Gao, Wang *et al.* 2014).

Tabla 1. Estudios que reportan RVG29 para la entrega de moléculas cargo con acción terapéutica hacia el SNC.

Autor, año	RVG29 en la entrega de diversas moléculas al cerebro	Molécula cargo
(Zou, Tao <i>et al.</i> 2017)	Targeted delivery of nano-PTX to the brain tumor-associated macrophages	Nano partículas
(Zou, Sun <i>et al.</i> 2016)	Cre Fused with RVG Peptide Mediates Targeted Genome Editing in Mouse Brain Cells In Vivo.	Cre-RVG
(Liu, Li <i>et al.</i> 2015)	Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse.	siRNA
(Gao, Wang <i>et al.</i> 2014)	RVG-Peptide-Linked Trimethylated Chitosan for delivery of siRNA to the brain.	siRNA
(Kim, Choi <i>et al.</i> 2013)	Brain-targeted delivery of protein using chitosan- and RVG peptide conjugated pluronic-based nano carrier.	Nano partículas
(Rohn, Suttikus <i>et al.</i> 2012)	RVG peptide as transfection reagent for specific cdk4 gene silencing <i>in vitro</i> an <i>in vivo</i> .	siRNA

2.8 Mecanismo de internalización de RVG29

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que RVG tiene afinidad por los nAChRs, los cuales se expresan en el SNC. Por lo tanto, esto nos da un indicio de que probablemente RVG29 también se internalice a las células

mediante la interacción por esta vía (Figura 4) (Hanham, Zhao *et al.* 1993). Sin embargo, la internalización del péptido se ha relacionado con otros mecanismos y receptores dejando en duda el tipo de mecanismo por el cual entra el péptido a la célula (Kuan, Poole *et al.* 2012).

La nicotina es un agonista exógeno de los nAChRs y es capaz de atravesar la BHE. Se ha encontrado que la activación de los nAChRs por la nicotina promueve la neuroprotección en estudios *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que la disrupción en la transmisión vía nAChRs en cerebro juega un papel importante en la neurodegeneración (Gotti, Zoli *et al.* 2006).

Por otro lado, se ha asociado RVG con la vía de endocitosis en una línea celular de neuroblastoma de ratón (MNA) (St Pierre, Leonard *et al.* 2011). Se ha propuesto que tanto el péptido RVG como sus derivados RVG-29 y RDP se internalizan en las células por medio de la vía de endocitosis. Liu y col. reportaron que RVG29 conjugado con nanopartículas entra en el cerebro por dos vías, la endocitosis mediada por clatrina y la dependiente de caveolas (Liu, Huang *et al.* 2009). Aún no se cuenta con evidencia sólida que compruebe que RVG y sus derivados sean internalizados por medio de endocitosis mediada por receptores. Sin embargo, existe evidencia de que además del nAChR, otros receptores, como el GABA, pudieran también estar involucrados (Fu, Zhao *et al.* 2013).

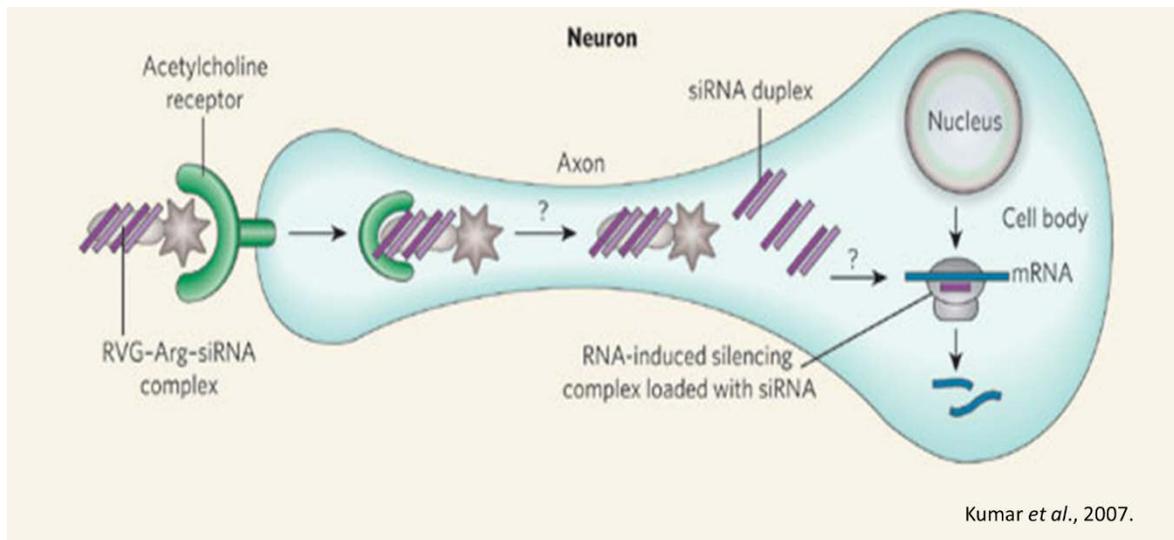


Figura 4. Mecanismo de internalización del complejo RVG-Arg-siRNA en neuronas.

2.9 Péptido señal de localización nuclear

La envoltura nuclear es el segundo mayor obstáculo para la entrega de moléculas a las células blanco. Para entrar al núcleo, las moléculas cargo tienen que atravesar la envoltura nuclear por medio de una estructura especializada llamada complejo de poro nuclear (NPC), el cual representa un filtro importante. Las moléculas cariofílicas pueden interactuar directamente con un grupo de proteínas llamadas nucleoporinas (Xu, Alarcon *et al.* 2003, Zhong, Takeda *et al.* 2005). Estas moléculas cariofílicas sirven como un péptido señal de localización nuclear (NLS), el cual al ser reconocido funge como señal de reconocimiento para las importinas y así iniciar el transporte nuclear de moléculas (Li, Yang *et al.* 2017).

Los ácidos nucleicos no son cariofílicos per se, por lo tanto, se requiere la adición de un péptido cariofílico como NLS para conducir la carga del DNA plasmídico hacia el NPC (Perez-Martinez, Guerra *et al.* 2011).

3. Justificación

La nueva generación de tratamientos contra los procesos neurodegenerativos combina una serie de nuevos fármacos y terapia génica. Sin embargo, el principal problema para la transferencia de moléculas terapéuticas hacia el cerebro sigue siendo la barrera hematoencefálica.

El uso de la terapia génica en enfermedades neurodegenerativas, abre un nuevo campo para su tratamiento, ya que permite actuar sobre procesos para los cuales no existen agentes terapéuticos. Numerosos estudios se están enfocando en diversas moléculas terapéuticas, sobre todo en aquellas que tengan una acción neuroprotectora.

Existen pocos sistemas de CPPs eficientes en el envío de moléculas terapéuticas hacia el cerebro para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Se ha demostrado que el péptido RVG29 puede transportar moléculas hacia el cerebro, y hasta la fecha no se ha utilizado para el envío de DNA como molécula cargo.

Se ha reportado que el cambio de un solo aminoácido de la glucoproteína del virus de la rabia en el sitio de unión al nAChR incrementa su virulencia.

De acuerdo con estos antecedentes, creemos que al introducir la mutación Asn194Lys en el péptido RVG29, la eficiencia de transfección de moléculas de DNA en células del Sistema Nervioso Central, se incrementará.

4. Objetivo General

Analizar la eficiencia del péptido RVG29 mutante como vehículo para la entrega de moléculas de DNA en cerebro murino.

5. Objetivos Específicos

1. Establecer la relación óptima para la formación de los complejos RVG mutante (RVGm) y RVG silvestre (RVG29s).
2. Evaluar la eficiencia y especificidad de transfección de los complejos RVG29m y RVG29s en una línea de neuroblastoma.
3. Evaluar la eficiencia de transfección de los complejos RVG29m y RVG29s en el cerebro murino.
4. Identificar los tipos celulares que expresan el gen reportero (GFP) de los complejos RVG29m y RVG29s en el cerebro murino.

6. Materiales y Métodos

6.1 Estrategia experimental

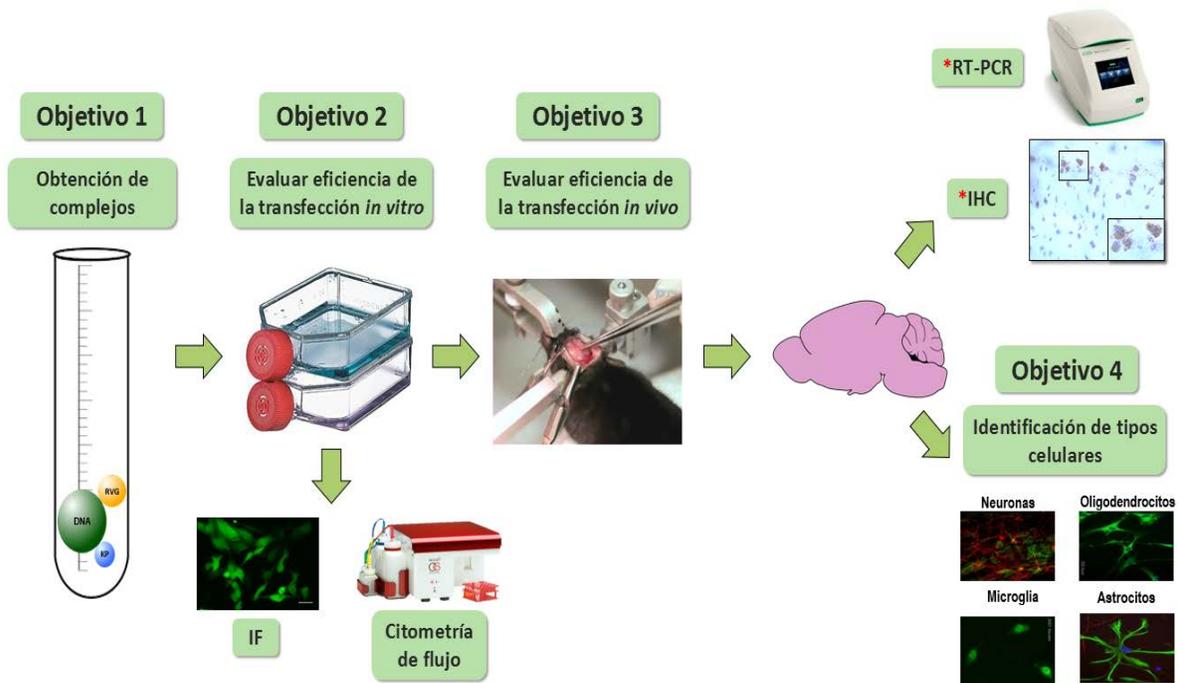


Figura 5. Estrategia experimental. Se obtuvo la relación óptima de los diferentes componentes de los complejos RVG29. Se evaluó la eficiencia de transfección de los complejos obtenidos *in vitro* mediante inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo. Después de comprobada la transfección *in vitro* de los complejos RVG, se evaluó la eficiencia *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 por medio de RT-PCR e inmunohistoquímica (IHQ). Por último, se identificaron los diferentes tipos celulares transfectados con los complejos RVG en el SNC mediante IF.

6.2 Material y Equipo

6.2.1 Reactivos

Los siguientes péptidos fueron obtenidos de United Peptide Corporation (Herndon, VA, USA):

- RVG29 (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR)
- RVG29m (YTIWMPENPRPGTPCDIFTKSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR)
- Péptido cariofílico (KP) (MAPTKRKGSCPGAAPNKKP)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), DMEM /Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), alta-glucosa DMEM, Suero Fetal Bovino (SFB), L-glutamina, 100X solución antibiótica/antimicótico, 0.25% Tripsina-EDTA y Green Lantern plasmid (pGL) (Anexo 1) fueron obtenidos de (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA). TurboFect® *in vitro* transfection reagent fue obtenido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Los anticuerpos anti-GFP (ab6556 y ab1218), anti-GFAP (ab5804), goat anti-mouse FITC (ab6785) and goat anti-rabbit Alexa Fluor® 555 (ab150082) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA, USA). El anticuerpo anti-CNPase (MAB326) fue obtenido de Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). DAPI mounting solution (H-1200) fue obtenido de Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA).

Los reactivos para extracción de RNA como TRIzol™ fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) y RNAlater® obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). La síntesis de cDNA se realizó con el Kit GoScript® de Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA). Los reactivos para PCR (Buffer, dNTPS, Taq Polimerasa) fueron obtenidos de Axygen (New York, USA). Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Eurofins genomics (Louisville, KY, USA)

Los ratones de la cepa C57BL/6 fueron obtenidos de la compañía Círculo ADN S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Para el manejo de los animales se utilizaron los anestésicos Avertin® de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) y Zoletil 100® de Virbac (Zapopan, Jalisco, México).

6.2.2 Equipo

Cultivo de células

Para el cultivo de células se trabajó en una campana de flujo laminar (Labconco), fueron mantenidas en una incubadora de CO₂ (Thermo Scientific), y observadas en un microscopio invertido (Southern Precision Instruments). Se utilizó una centrífuga con refrigeración (Rotanta 460), baño de agua con control de temperatura (Revolutionary Science), placas de 24 pozos (Corning), cajas de 25 cm, cajas de 75 cm (Corning), cubreobjetos (Fisher), tubos criogénicos (Corning). Las células fueron observadas y capturadas en un microscopio de fluorescencia invertido marca Nikon eclipse 50i.

Cirugía estereotáxica

Para la cirugía se utilizó un equipo esterotáxico con barras para los oídos de 18° y un adaptador para ratón (Stoelting). Material de cirugía y disección (tijeras, pinzas, escalpelo no. 3, navajas no. 15, microtaladro, marca Stoelting), pinza gubia para hueso (Stoelting), equipo para rasurar (Andis), bomba de infusión (Stoelting). Para la microinyección se utilizó una jeringa de 10 µL (Hamilton Serie 900).

Perfusión Cardíaca

Para el sacrificio por perfusión cardíaca de los animales se utilizó una bomba peristáltica FH100 de Thermo Scientific.

RT-PCR

Para la síntesis de cDNA y RT-PCR se utilizó un termociclador (Labnet).

Para fotodocumentar los geles de agarosa se utilizó el equipo DIGI DOC-IT System (Ultraviolet/Laboratory Products, Upland, CA, USA).

Citometría de Flujo

Para el análisis de citometría de Flujo se utilizó un citómetro de flujo citómetro Accuri C6 de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Analisis de datos

Para el análisis morfológico se utilizó el programa ImageJ, desarrollado por el National Institutes of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA), y para el análisis estadístico el software Graphpad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA).

6.3 Metodología

6.3.1 Preparación de los complejos RVG29 y caracterización por geles de retardo

Cuatro diferentes tipos de complejos RVG29 fueron preparados y caracterizados para su unión con el plásmido. Los complejos pGL-RVG29s y pGL-RVG29m fueron preparados usando 2 µg de pGL e incubados a temperatura ambiente (TA) por 30 min mediante agitación constante con los péptidos RVG29s y RVG29m a las concentraciones de 2:0.5, 2:1 y 2:2 µg. Los otros dos complejos, pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP, fueron preparados usando 2 µg del plásmido pGL e incubados a diferentes concentraciones con los péptidos RVG29s o RVG29m y el KP a las concentraciones de 2:4:1, 2:2:2, 2:1:4, 2:0.5:1, y 2:0:16 µg a TA en agitación constante durante 30 min. Después de la incubación, los cuatro complejos fueron mezclados con buffer de carga y analizados en geles de retardo. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio (0.5 g/mL del gel). Los geles fueron fotodocumentados en el equipo DIGI DOC-IT.

6.3.2 Ensayo de bioestabilidad

Para probar la estabilidad de los complejos RVG29 en presencia de suero, los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP fueron preparados como se describió anteriormente e incubados a 37°C en presencia de una mezcla 50% (v/v) de suero fresco de ratón en PBS al 0.01 M (pH 7.4) por diferentes tiempos (30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 14 h, 18 h y 24 h). Después de estos tiempos, la incubación se

detuvo añadiendo EDTA pH 8.0 a una concentración final de 60 mM, y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga y analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.3.3 Cultivo celular

Las células SHSY-5Y se cultivaron en DMEM/F-12, las células NIH/3T3 y HeLa se cultivaron en DMEM. Ambos medios fueron suplementados con 10% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

6.3.4 Cultivos primarios de astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos (OPCs)

Las cortezas de ratones de 3-4 días de nacidos fueron disecadas, cuidadosamente se extrajeron las meninges y el tejido se disoció suavemente utilizando 0.25% de Tripsina-EDTA hasta obtener células individuales. Las células fueron suspendidas DMEM con glucosa alta y 20% de SFB suplementado con 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico. Las células se sembraron en frascos T75 recubiertos con poli-L-Lisina (0.05 mg/mL). Los cultivos fueron incubados en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Después de 1 semana de cultivo, las células de la microglía fueron descartadas por agitación durante 30 minutos en un agitador orbital a 180 rpm. Después se añadieron 20 ml de DMEM con glucosa alta, se agitó a 240 rpm por 6 h hasta obtener los OPCs. El sobrenadante se centrifugó para separar los OPCs y cultivarlos. Para los cultivos de astrocitos y OPCs, el SFB se redujo a 10%, se removió la glucosa y el medio fue cambiado dos veces a la semana. Después de 12 días en cultivo se obtuvo una confluencia suficiente.

6.3.5 Transfección Celular

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 8×10^4 células/pozo. Los complejos pGL-RVG29s, pGL-RVG29m, pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP se prepararon en 200 μ l de DMEM con 2 μ g de DNA (pGL) a TA en agitación constante por 30 min. Los complejos RVG29 se añadieron a los astrocitos, OPCs, células HeLa, NIH/3T3 y SH-SY5Y, al alcanzar un 60% de confluencia y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El contro positivo de la expresión de GFP fue transfectado con el plásmido pGL usando Turbofect de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

6.3.6 Tratamiento de cubreobjetos con APTES

Los cubreobjetos se sumergieron en una solución de H₂SO₄ al 20% durante 1 h. Se enjuagaron 4 veces en agua MilliQ®. Se sumergieron en una solución de NaOH 1 N durante 5 min. Se enjuagaron 4 veces en agua MilliQ®. Se dejaron secar por 30 min. Se colocaron en una caja Petri de vidrio y se adicionó 1 mL de APTES durante 4 min. Se enjuagaron los cubreobjetos hasta dejar libre de residuos en agua MilliQ®. Se dejaron secar y se esterilizaron a 20 lbs por 15 min.

6.3.7 Inmunofluorescencia en cultivo celular

Se utilizó la IF indirecta para analizar la eficiencia de la transfección celular. Las células fueron lavadas en PBS 1X pH 7.4 frío y posteriormente fijadas en PFA al 4% por 15 min a RT. Después se lavaron con PBS 1X conteniendo tritón x-100 al 0.1%, las células fijadas fueron bloqueadas en suero de caballo al 10% por 1 h. Las células ya bloqueadas se incubaron toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (suero de caballo al 1% en PBS-Tritón). Los anticuerpos usados fueron: anti-GFP (1:500), anti-CNPase (1:200), and anti-GFAP (1:1000). Después las células fueron lavadas en PBS-Tritón 3 veces por 5 min e incubadas con anticuerpos secundarios diluidos en PBS-Tritón por 2 h a TA. Los anticuerpos secundarios usados fueron goat anti-mouse FITC (1:200) and goat anti-rabbit rhodamine (1:200). Los controles

negativos fueron preparados omitiendo el anticuerpo primario. Para teñir los núcleos las células se lavaron en PBS y fueron montadas con DAPI mounting solution. Las IF se observaron usando un microscopio de fluorescencia Leica.

6.3.8 Mecanismo de internalización

Para examinar el mecanismo de captación celular de los complejos RVG29, se sembraron células SH-SY5Y en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 8×10^4 células/pozo en DMEM/F-12. Las células SH-SY5Y se incubaron hasta que alcanzaron una confluencia del 60%, se retiró el medio y se añadieron inhibidores de la endocitosis. El inhibidor colchicina se añadió a diferentes concentraciones (5, 10 y 40 μm) por 30 min. Para la inhibición del proceso de endocitosis con sacarosa hipertónica, las células se incubaron en medio de cultivo que contenía 0.45 M de sacarosa durante 30 min. En la inhibición de este proceso mediante depleción de K^+ , las células se pre-trataron con medio hipotónico (DMEM/F-12: agua 1: 1) durante 5 min y luego se incubaron en buffer libre de K^+ (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico 50 mM (HEPES), NaCl 100 mM) durante 30 min. Después del tiempo de tratamiento con los inhibidores, se añadieron los complejos RVG en medio fresco a los cultivos. Después de 72 h de incubación, las células se fijaron en PFA al 4% durante 15 min a TA y se observaron mediante IF.

6.3.9 Cirugía estereotáxica

Para la inyección de los complejos pGL-RVGs-KP y pGL-RVGm-KP en el cerebro murino, se anestesiaron ratones de la cepa C57BL/6 de 10 semanas y 25 ± 2 gr de peso con 2,2,2-Tribromoetanol (Avertin®). Se colocaron en el aparato estereotáxico con la barra de incisivos a 6 mm por debajo de la línea interaural. Se ajustaron las coordenadas para corteza: AP -0.02 mm desde la línea interaural, ML -2 mm desde la línea media y DV -1.5 mm. Cuerpo estriado: AP +0.38 mm desde la línea interaural, ML -2 mm y DV -3.12 mm desde la corteza cerebral. Hipocampo: AP -1.86 mm desde la línea interaural, ML -1 mm desde la línea media y DV -4.5 mm. Ventrículo Derecho: AP -0.22 mm desde la línea interaural,

ML -1 mm desde la línea media y DV -2.5 mm. Después de la trepanación craneal se micro-inyectaron 5 μ L de los complejos RVG29 a una velocidad de 0.1 μ L/minuto. Agregar significado de AP, ML y DV

6.3.10 Perfusión Cardíaca

Después de 4 y 20 días de la cirugía de estereotaxia se les realizó la técnica de perfusión cardíaca a los ratones para la obtención de los tejidos. Los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral (480 mg/kg de peso, i.p), posteriormente se realizó una incisión a lo largo de toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural. Se realizó una incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo y se colocó una aguja a través de la pared de la aorta, por último se hizo una incisión en la aurícula derecha con unas tijeras y se conectó la bomba peristáltica para perfundir al animal con 25 ml de PBS 1X frío y después 25 ml de PFA al 4% (en buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4). Después de la perfusión se realizó la disección del cerebro de los animales, los cuales se conservaron en PFA al 4% por 12 h. Una vez obtenidos y post-fijados, se procedió a incluir los cerebros en parafina por medio de la técnica histológica.

6.3.11 Inclusión de tejidos en parafina

Una vez obtenidos los tejidos, se prosiguió con la deshidratación gradual a través de alcoholes al 70%, 90%, 96%, 100%, 100%, etanol: xilol (1:1), xilol (dos cambios) y parafina (dos cambios) por espacio de 1 h en cada solución. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina y se realizaron cortes de 5 μ m de espesor en el microtomo Leica RM2245.

6.3.12 Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en cortes histológicos

La desparafinación e hidratación de los cortes se realizó mediante dos cambios de xilol, luego un cambio en alcoholes al 100%, 95%, 75%, y finalmente agua MilliQ. Enseguida se procedió a la recuperación de epítopes con Buffer de Citratos pH 6.9. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X. Se realizó la permeabilización de las células dando 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-

Tritón 0.1%. Se bloquearon los sitios inespecíficos durante 1 h con suero de caballo al 10% preparado en PBS-Tritón 0.1%. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.5% ó PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.0% durante 2 h a TA. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X.

Para las inmunofluorescencias se secaron los cortes en los portaobjetos y se montaron con VECTASHIELD®.

Para las inmunohistoquímicas se sumergieron los cortes en solución DAB de 2 a 7 min. Se lavaron en con agua MilliQ. Se contra-tiñeron los cortes con Hematoxilina de Harris por 30 s. Para el montaje de las laminillas se sumergieron los cortes en alcoholes ascendentes (70%, 95%, 100%), xilol (2 cambios). Se limpió el exceso de xilol y se montaron con 50 µl de medio para montar.

6.3.13 Obtención del RNA total

Para la obtención del RNA de las diferentes regiones del cerebro transfectadas con los complejos RVG29, se obtuvieron los cerebros frescos y se tomaron 10 mg de tejido para macerarlo manualmente. El macerado se resuspendió en 1 mL de TRIzol®. El homogenizado se incubó por 5 min a TA. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión. Enseguida se incubó por 2 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se agregaron 500 µl de isopropanol y se mezcló por inversión 10 veces. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 15 min a TA. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 75%. La pastilla de RNA obtenida fue resuspendida en 50 µL de H₂O MilliQ® estéril. La integridad del RNA fue analizada en un gel de agarosa en TAE al 0.8%.

6.3.14 RT-PCR

Para la identificación del gen reportero en cerebros de ratón se llevó a cabo la reacción de transcriptasa reversa siguiendo el protocolo del Kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega) ®. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a

partir del RNA obtenido de los cerebros transfectados con los complejos RVG29, y se utilizó para amplificar los genes GFP y actina.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de secuencia para los genes de interés.

Gen	Secuencia	
GFP	GFP-F	5'-gaagtgatgccacatacgg-3'
	GFP-R	5'-gtaatggtgtctgggaggag-3'
Actina	ACT-F	5'-ggtgatgacctggccgtcaggc-3'
	ACT-R	5'-ggccaaccgcgagaagatgacc-3'

La PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y concentración utilizados en PCR usando cDNA como templado.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer + MgSO ₄	10X + 1M	2.5 μ L
Oligonucleótido sentido	100 ng/ μ L	1 μ L
Oligonucleótido antisentido	100 ng/ μ L	1 μ L
dNTP	2.5 mM	2.5 μ L
Taq polimerasa	1 U	0.1 μ L
cDNA	-	2 μ L
H ₂ O	-	13 μ L

El programa utilizado para la PCR se especifica en la tabla 4. La temperatura de alineamiento fue de 60°C para ambos genes.

Tabla 4. Condiciones del termociclador para amplificación de los genes deseados.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
2	94°C	1 min
3	60°C	1 min
4	72°C	1 min
5	30 ciclos desde el paso 2	
6	72	3 min

6.3.15 Análisis Estadístico

La significancia estadística entre dos grupos se determinó por una prueba t de Student de dos colas, el análisis entre tres o más grupos fue determinado por ANOVA de una cola seguido de una corrección de Tukey. Se utilizó el programa Graphpad Prism 6.0. Los datos presentados como media \pm SD <0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

7. Resultados

7.1 Obtención de los complejos RVG29

Se obtuvieron cuatro tipos diferentes de complejos de RVG29 uniendo el pDNA y péptidos a través de cargas electrostáticas, estos complejos fueron denominados como pGL-RVG29s, pGL-RVG29m, pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP.

Para determinar la relación que representa la unión óptima de los componentes de los complejos pGL-RVG29s y pGL-RVG29m para su posterior transfección celular, se incubó el plásmido pGL (2 μg) con diferentes concentraciones de los péptidos RVG29s o RVG29m (0.5, 1 y 2 μg) y se analizaron por medio de geles de agarosa. En la figura 6 (a, b) se muestra el desplazamiento de las muestras preparadas de los complejos pGL-RVG29s y pGL-RVG29m en el gel de agarosa. La relación plásmido/péptido de 2:2 mostró un retardo en el corrimiento del DNA, debido a la unión electrostática del DNA a los péptidos. La proporción de 2:2 fue elegida para los experimentos de transfección celular.

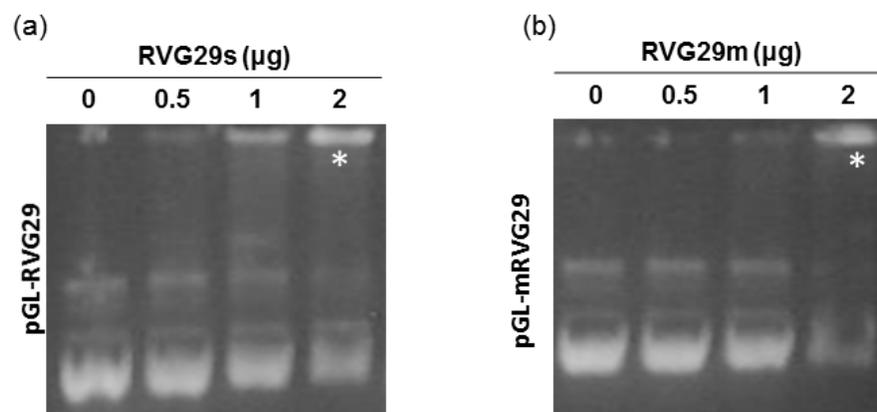


Figura 6. Geles de retardo de los complejos RVG29. Los complejos pGL-RVG29s y pGL-RVG29m se prepararon utilizando 2 μg de pGL con diferentes concentraciones de los péptidos RVG29s o RVG29m. Los complejos RVG29 se corrieron en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. El símbolo * indica la relación óptima elegida para cada complejo. El carril 1 indica el corrimiento del plásmido sin péptido.

Para incrementar la importación de DNA al núcleo y aumentar la eficiencia de transfección celular de los complejos RVG29, se añadió un KP. La relación óptima de unión de los componentes de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29-KPm que contenían el KP se determinó para su posterior transfección celular, incubando el pGL (2 μg) con diferentes concentraciones de los péptidos RVG29s o RVG29m y el KP. De acuerdo con los resultados de migración del DNA mostrados en la figura 7 (a, b) se seleccionó la relación de pGL /RVG / KP de 2: 2: 2 para utilizarse en los experimentos de transfección celular. Las bandas de DNA que muestran retardo en el gel de agarosa indican que ha tenido lugar la unión electrostática entre los componentes de los complejos RVG, y por ello ocurre un retardo en la migración del DNA.

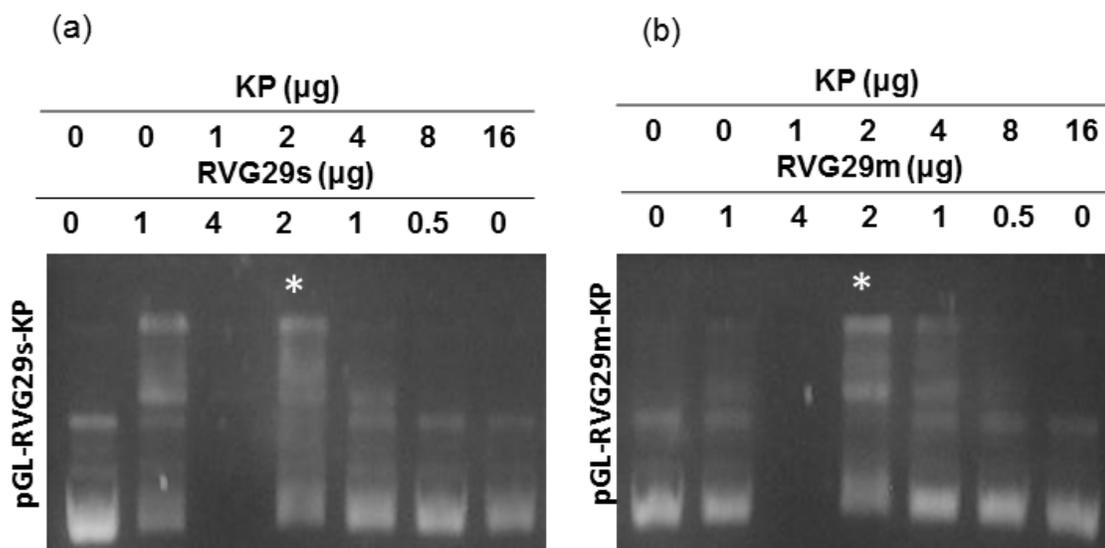


Figura 7. Geles de retardo de los complejos RVG29-KP. Los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP se prepararon utilizando 2 µg de pGL con diferentes concentraciones del KP y RVG29s ó RVG29m. Los complejos RVG29 se corrieron en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. El símbolo * indica la relación óptima elegida para cada complejo. El carril 1 indica el corrimiento del plásmido sin péptidos.

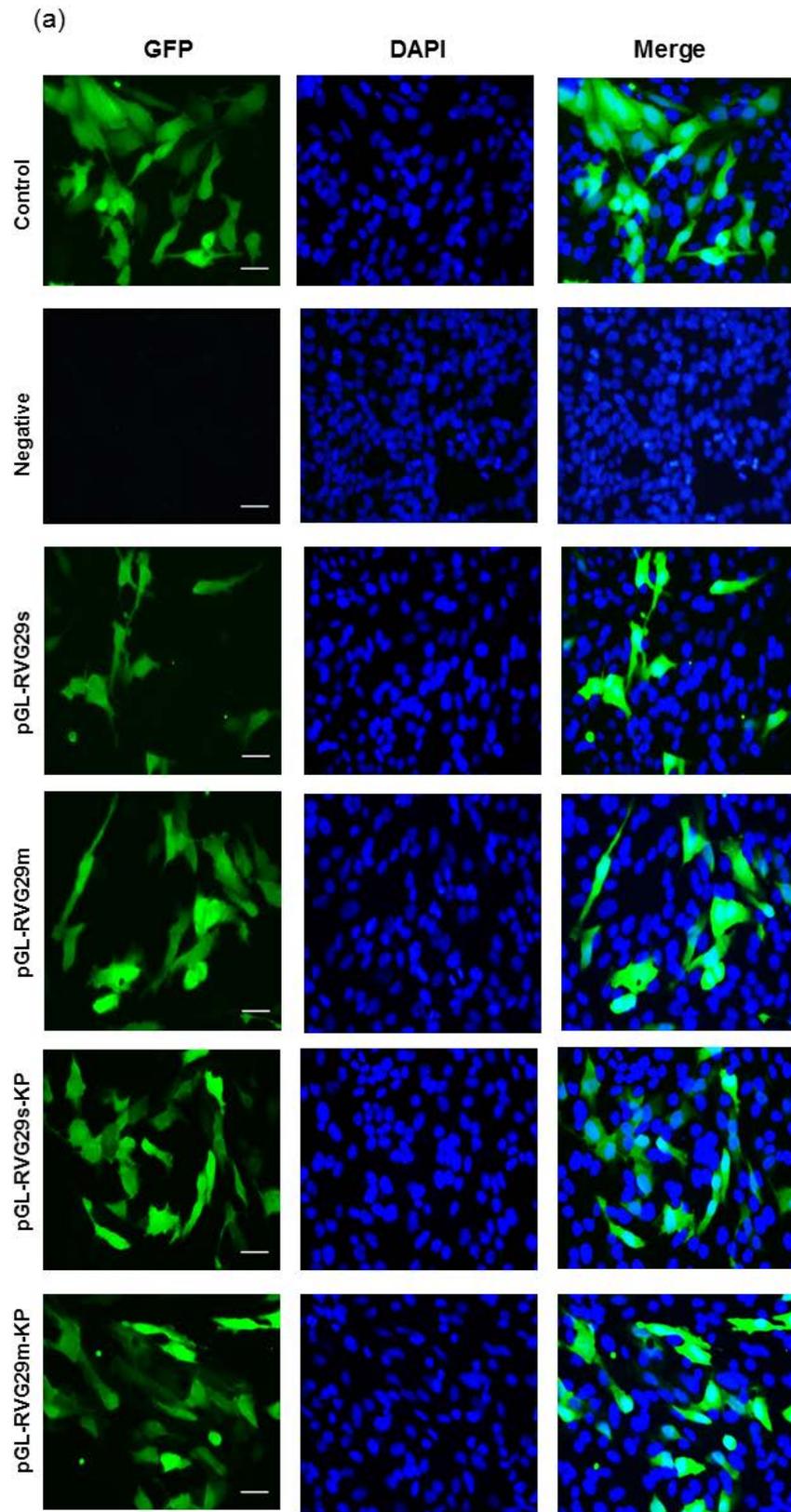
7.2 La mutación Asn194Lys en el péptido RVG29s aumenta la capacidad de transfección celular del complejo pGL-RVG29m

Primero, examinamos si el RVG29m tiene la capacidad de transfectar moléculas de DNA, en este caso pGL, que expresa GFP, a una línea celular de fenotipo neuronal. La línea celular SH-SY5Y se transfectó con pGL-RVG29s ó pGL-RVG29m, y la expresión de GFP se observó mediante IF después de 72 h. La expresión de GFP en las células SH-SY5Y fue mayor en las células transfectadas con el complejo pGL-RVG29m que en las células transfectadas con el complejo pGL-RVG29s (Figura 8a). Estos resultados sugieren que el aumento en la capacidad de transfección celular está determinado por la mutación Asn194Lys en el péptido RVG29s. Además, fueron confirmados al realizar la cuantificación de la media de la intensidad de la fluorescencia, que mostró una

diferencia significativa entre las células transfectadas con pGL-RVG29s y pGL-RVG29m (Figura 8b).

7.3 El complejo pGL-RVG29m sin KP tiene una capacidad de transfección celular similar a pGL-RVG29s con KP

Se añadió un KP a los complejos RVG29 para aumentar la eficiencia de transfección al facilitar el envío del DNA al núcleo en la línea celular SH-SY5Y transfectada con estos complejos. Después de 72 h, la expresión de GFP se analizó mediante IF, se mostró que el KP aumenta la capacidad de los complejos pGL-RVG29s-KP para transfectar células SH-SY5Y en comparación con los complejos pGL-RVG29s sin KP (Figura 8a). La IF mostró un patrón de expresión de GFP muy similar en ambas células SH-SY5Y transfectadas con pGL-RVG29m-KP y con pGL-RVG29s-KP. El análisis estadístico también indicó una diferencia significativa entre las células transfectadas con los complejos pGL-RVG29m a los que se les añadió KP y los transfectados con pGL-RVG29s a los que no se les añadió KP. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la media de la intensidad de la fluorescencia entre los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP (Figura 8b). Estos resultados indican que la adición de KP a los complejos de RVG silvestres también aumenta la capacidad de transfección en una línea celular de fenotipo neuronal de manera similar a como se observa con los complejos mutantes de RVG.



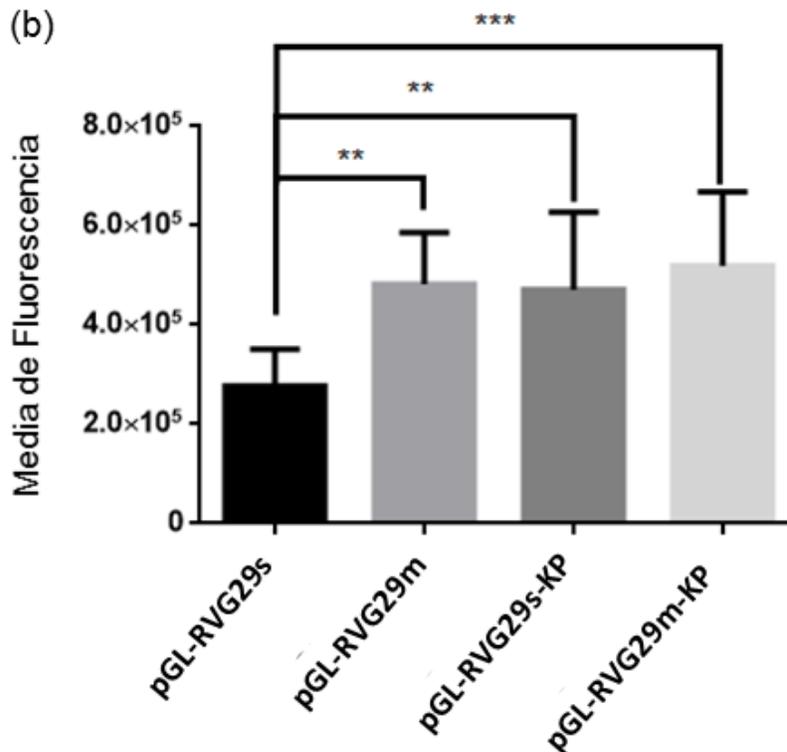


Figura 8. La mutación Asn194Lys en el péptido RVG29s del complejo pGL-RVG29m y la adición del KP incrementan la capacidad de transfección. (a) IF anti-GFP. Las células SH-SY5Y fueron transfectadas con los complejos pGL-RVG29s y pGL-RVG29m, el grupo control fue transfectado con Turbofect y el control negativo no fue transfectado. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (b) Media de la fluorescencia en las células SH-SY5Y transfectadas con los cuatro diferentes complejos RVG29. El análisis se realizó por medio del Software ImageJ. Cada barra representa Media \pm SD, *P< 0.05. Escala 50 μ m.

La diferencia de transfección entre los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP se comprobó por medio de citometría de flujo. Las células SH-SY5Y fueron transfectadas con los diferentes complejos RVG29, después de 72 h se analizaron en un citómetro de flujo. En la figura 9 se observa un desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha en las células que fueron transfectadas con los complejos RVG29 en comparación con las células SH-SY5Y control, las cuales no fueron transfectadas (línea color negro). Se confirmó que al añadir el KP el

número de células aumenta. A partir de estos resultados se decidió trabajar con los complejos que tienen el KP.

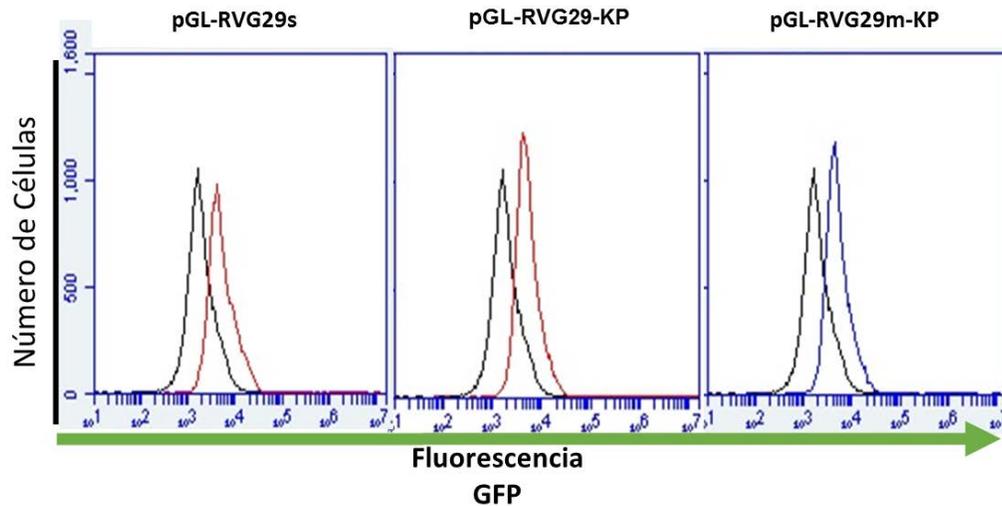


Figura 9. La adición del KP en los complejos RVG incrementa la eficiencia de transfección en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y fueron transfectadas con los complejos RVG y analizadas después de 72 h, el control negativo no fue transfectado (línea color negro). Se utilizó un anticuerpo anti-GFP. El análisis se realizó por medio de citometría de flujo.

Para determinar el tiempo en el que se obtiene una mayor eficiencia de transfección celular de los diferentes complejos RVG29, se evaluó la expresión de GFP a las 24, 48 y 72 h. Se comenzó a observar la expresión de GFP a las 24 h, cuando aproximadamente el 30% de las células mostraron positividad para GFP. A las 48 h alrededor del 50% de las células fueron transfectadas y la mayor cantidad de células positivas para GFP ocurrió a las 72 h. En este momento, la expresión de GFP estaba presente en aproximadamente el 70% de las células (Figura 10).

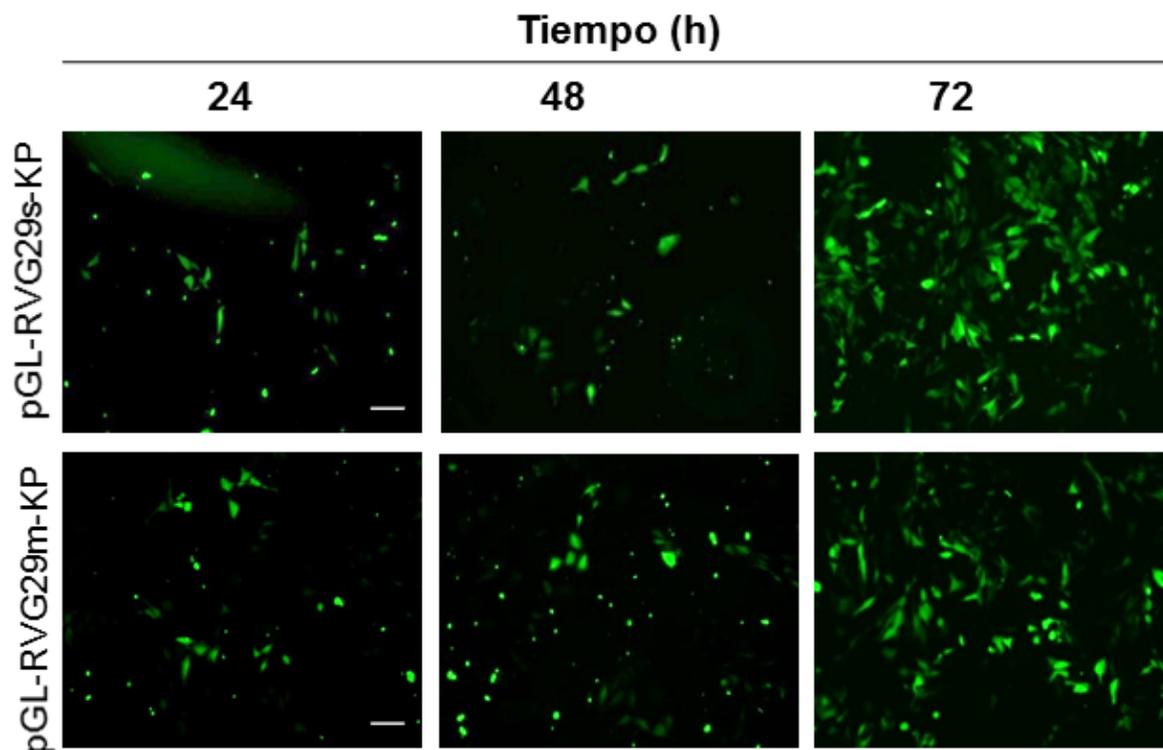


Figura 10. Los complejos RVG29 se internalizan eficientemente en células neuronales. Seguimiento en el tiempo de transfección de las células SH-SY5Y con los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP. La expresión de GFP fue detectada por microscopía de fluorescencia a las 24, 48 y 72 h. Escala 50 μ m.

7.4 Los complejos RVG tienen capacidad de transfectar células de fenotipo neuronal y astrocitos

Para identificar la especificidad celular de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP para la entrega de DNA en células de fenotipo neuronal y no neuronal se utilizaron tres líneas celulares diferentes (células NIH/3T3, HeLa, y SH-SY5Y). Se transfectaron estas líneas celulares con los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP, se analizó la expresión de GFP mediante IF después de 48 h. No se detectó la expresión de GFP en las células NIH/3T3 y HeLa transfectadas con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP (Figura 11), sólo en células SH-SY5Y. Se muestran sólo resultados de las células

transfectadas con el complejo pGL-RVG29m-KP. Estos resultados indican que los complejos RVG29 tienen la capacidad de transfectar células de fenotipo neuronal.

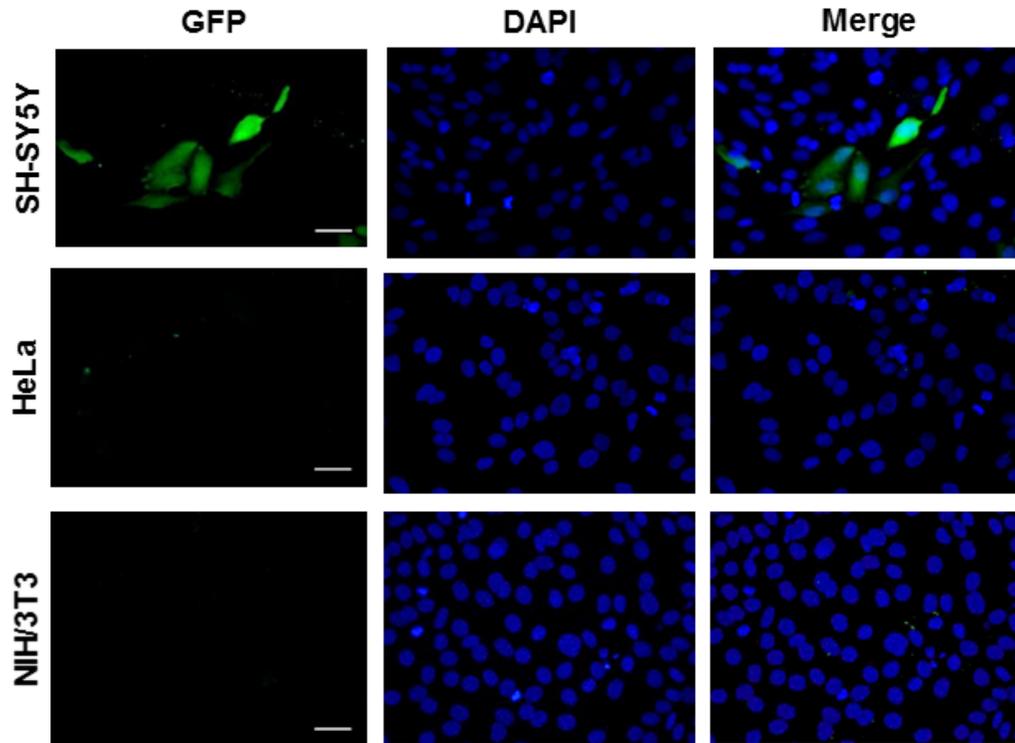


Figura 11. Los complejos RVG29 tienen capacidad para transfectar células de fenotipo neuronal. Las células SH-SY5Y, HeLa y NIH/3T3 fueron transfectadas con el complejo pGL-RVG29m-KP. La expresión de GFP fue observada a las 48 h solamente en las células SH-SY5Y. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m. Microscopía de fluorescencia.

También se analizó si otras células del SNC podrían ser transfectadas por los complejos RVG29-KP. Para confirmar la especificidad neuronal de los complejos RVG29, se transfectaron astrocitos primarios y cultivos OPC con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP. Después de 48 h, la expresión de GFP fue examinada por IF. Los resultados indicaron que la expresión de GFP estaba presente en astrocitos (anti-GFAP) transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP (Figura 12). Por el contrario, los cultivos de OPC anti-

(CNPase) transfectados con pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP no expresaron GFP con ninguno de los complejos (Figura 13). De acuerdo con estos resultados, los complejos RVG29 que se internalizan en células de neuroblastoma también pueden ser reconocidos por células gliales como astrocitos, pero los complejos RVG29-KP no fueron capaces de transfectar los cultivos de OPC.

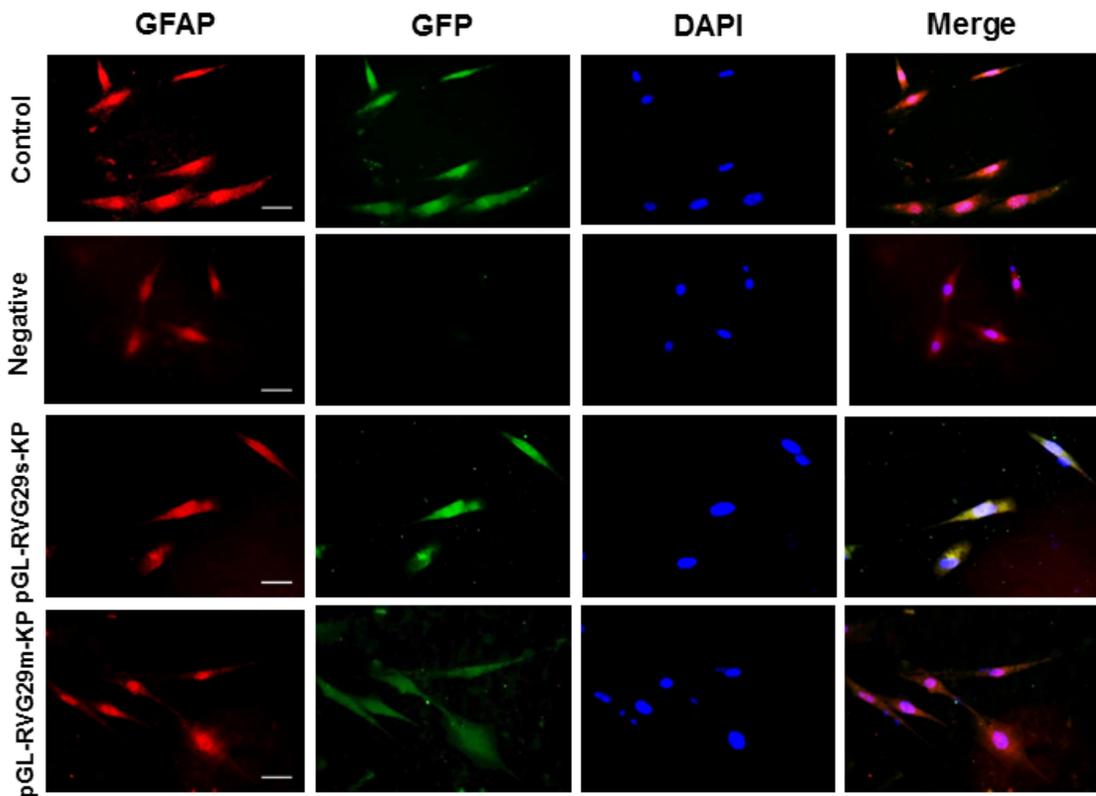


Figura 12. Los complejos RVG29 se internalizan en astrocitos. Cultivos primarios de astrocitos fueron transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP, el grupo control fue transfectado con Turbofect, el control negativo no fue transfectado. Después de 48 h la expresión de GFP fue detectada por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un anticuerpo anti-GFAP para identificar a los astrocitos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m.

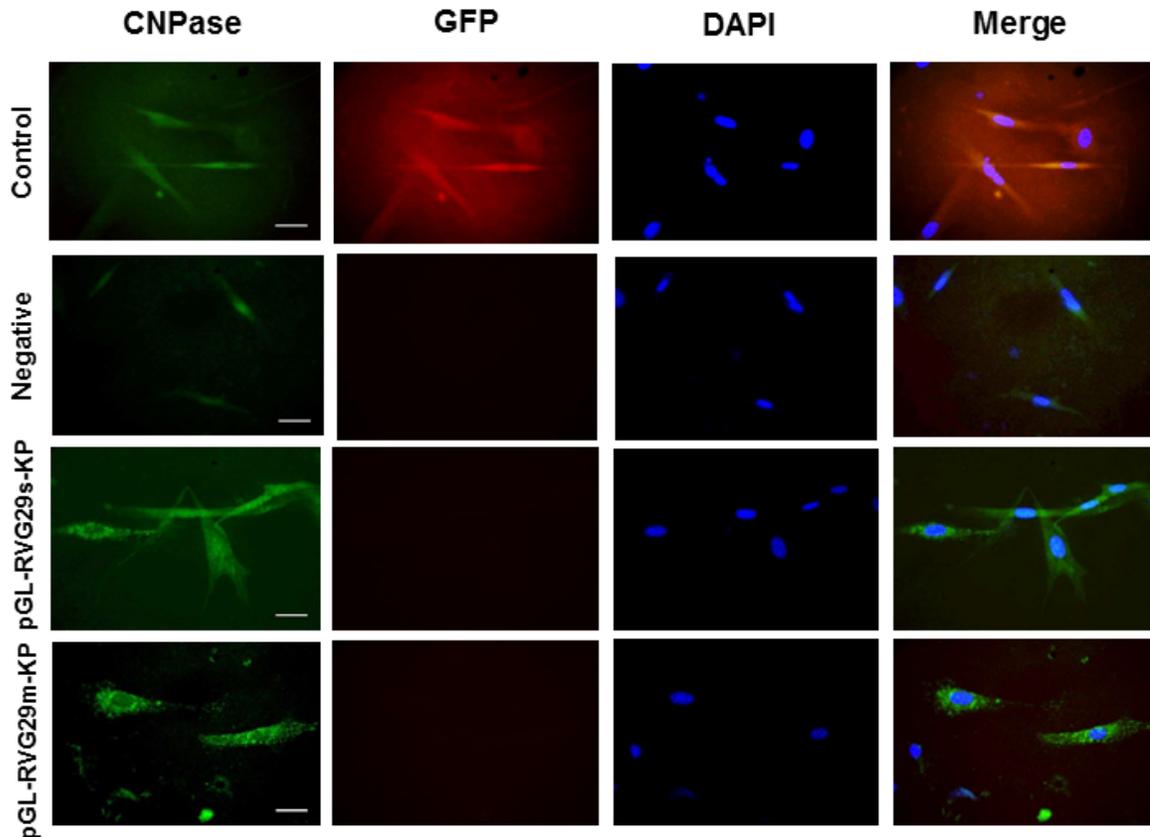


Figura 13. Los complejos RVG29 no se internalizan en OPC. Cultivos primarios de OPCs fueron transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP, el grupo control fue transfectado con Turbofect, el control negativo no fue transfectado. Después de 48 h la expresión de GFP no fue detectada en los OPCs por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un anticuerpo anti-CNPase para identificar a los OPCs. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m.

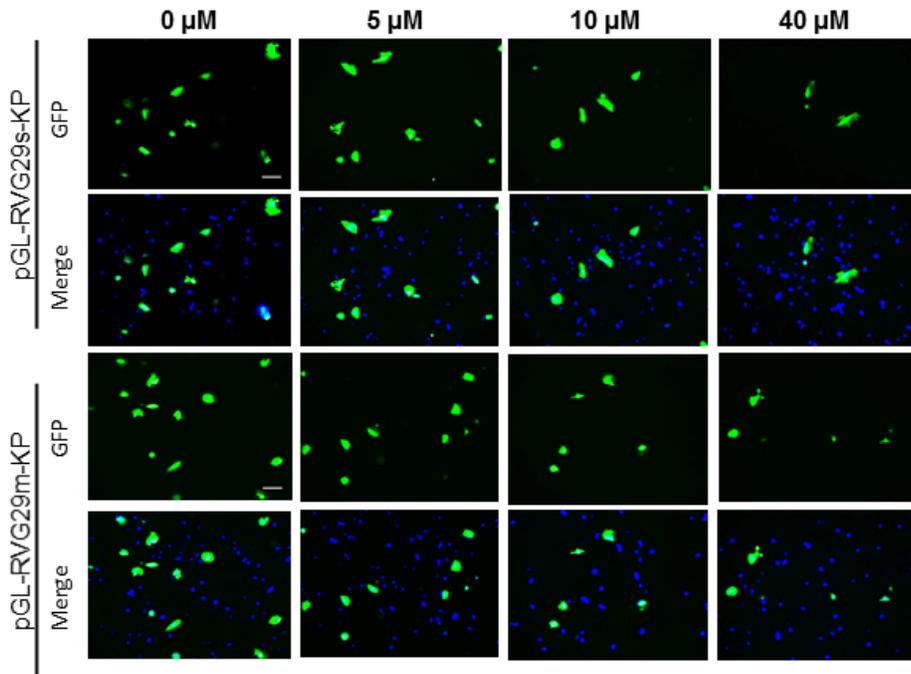
7.5 El proceso de endocitosis está implicado en la internalización celular de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP

Los CPPs, incluyendo el péptido RVG29, han atraído gran interés en la terapia génica debido a sus posibles aplicaciones biomédicas, tales como la entrega de moléculas terapéuticas. La endocitosis es un importante mecanismo dependiente de energía, mediante el cual se produce la captación celular de macromoléculas. En el presente estudio se evaluó la captación celular de los complejos pGL-

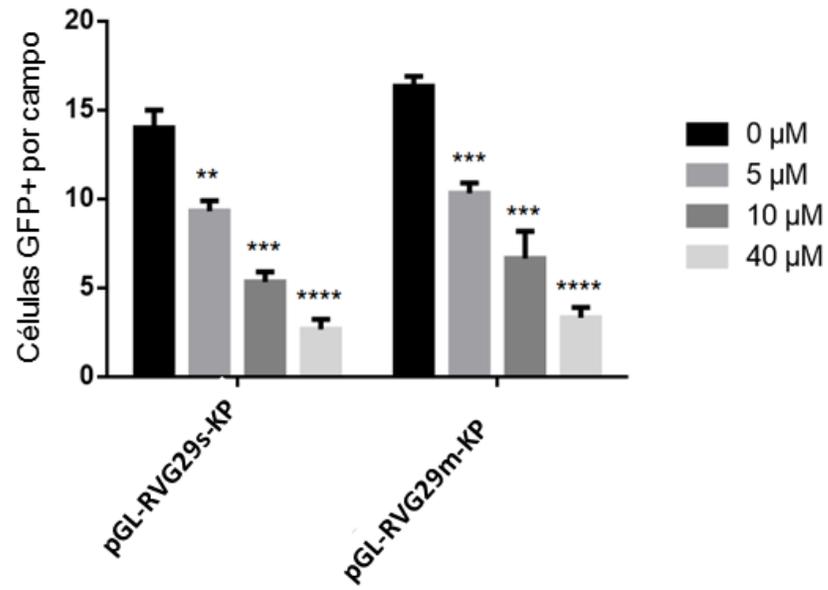
RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP utilizando diferentes concentraciones de colchicina, un inhibidor común de endocitosis (Piasek and Thyberg 1979) (5, 10 y 40 μ M) por 30 min. La colchicina redujo significativamente la captación de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP, lo que sugiere que la entrada de los complejos RVG29 en la célula se produce a través del proceso de endocitosis que depende de la presencia de los microtúbulos (afectados por la colchicina). Observamos que a mayor concentración de colchicina (40 μ M), la internalización celular de los complejos pGL-RVG29-KP y pGL-mRVG29-KP detectada por IF disminuyó drásticamente (Figura 14). Esto indica que la vía de endocitosis puede ser un mecanismo importante para la internalización de estos complejos.

La endocitosis mediada por clatrina ha sido inhibida por el uso de choque hipertónico (sacarosa) (Hansen, Sandvig *et al.* 1993) o depleción de potasio (Larkin, Brown *et al.* 1983), evitando que la clatrina y las moléculas adaptadores interactúen. Como se muestra en la figura 14c, la internalización de los complejos RVG29 se redujo con un tratamiento de sacarosa hipertónica, y bajo condiciones de depleción de potasio la internalización se inhibió dramáticamente en la línea celular SH-SY5Y. Estos resultados confirmaron la participación de la vía endocítica para la internalización de los complejos RVG29, tal como se observó en la figura 14a utilizando colchicina.

(a)



(b)



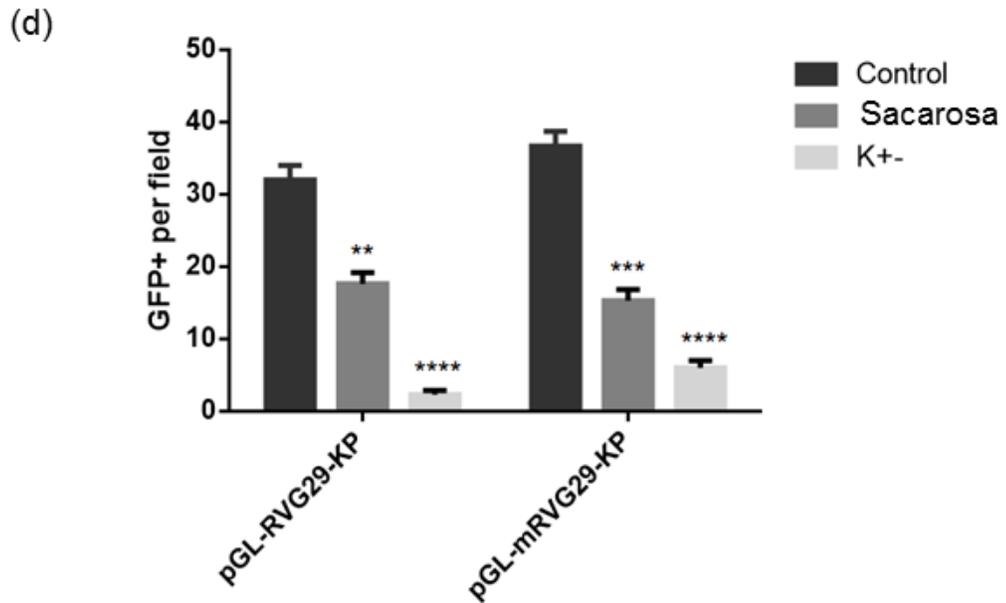
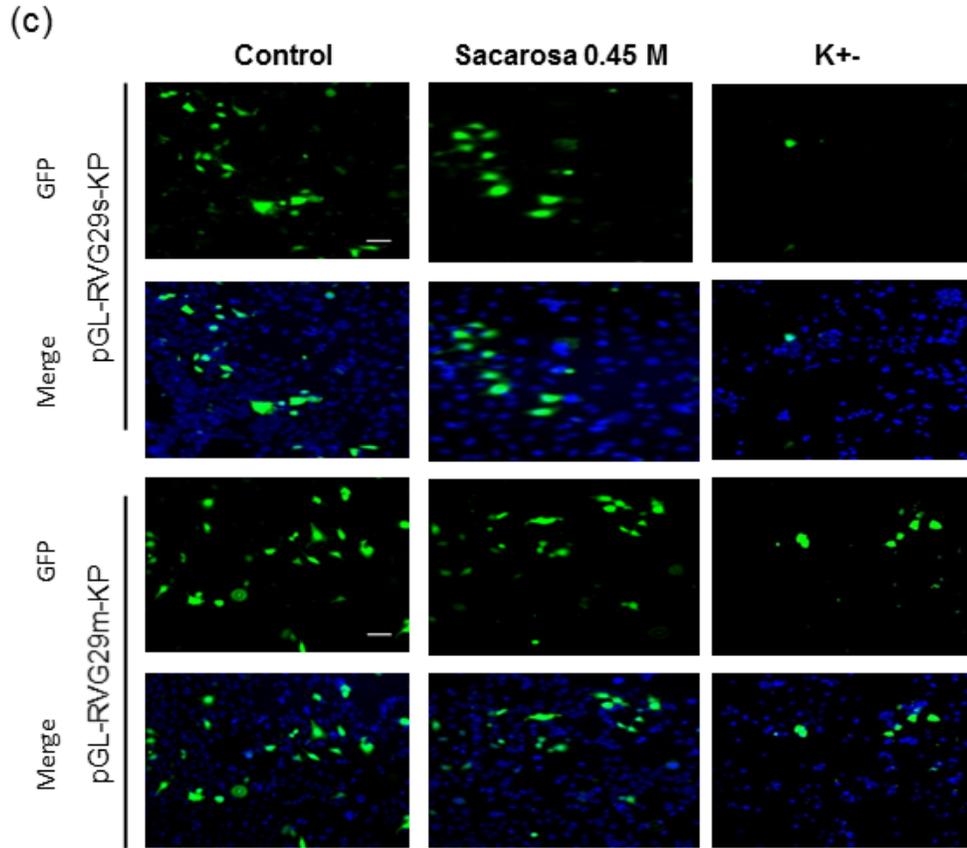


Figura 14. La internalización celular de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP es dependiente del proceso de endocitosis. (a) Las células SH-SY5Y fueron incubadas con colchicina como inhibidor de la endocitosis a diferentes

concentraciones (5, 10, and 40 μM), después fueron transfectadas con pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP. Después de 72 h, la expresión de GFP fue analizada por microscopía de fluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (b) Efecto del tratamiento con colchicina en la internalización de los complejos RVG29 en las células SH-SY5Y. (c) Las células fueron incubadas con sacarosa hipertónica al 0.45 M ó con un shock hipotónico seguido de una incubación con buffer libre de potasio, después fueron transfectadas con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP. Después de 72 h, la expresión de GFP fue analizada por IF. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (d) Efecto de la sacarosa hipertónica y la inhibición del potasio en la internalización de los complejos RVG29 en las células SH-SY5Y. Se presentan los resultados como células GFP (+) por campo. Los Se presentan los resultados como células GFP (+) por campo. Los resultados se muestran como media \pm SD (n=3) vs grupo control **P <0.005, ***P <0.001, ****P <0.001. Escala 50 μm . Microscopía de fluorescencia

7.6 Bio-estabilidad de los complejos RVG29 en suero de ratón

Una vez confirmada la transfección *in vitro* de los complejos RVG29, se determinó la estabilidad y degradación de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP en presencia de nucleasas séricas. Se encontró que la formación de complejos RVG29 impide su degradación en suero fresco de ratón por lo menos durante las primeras 6 h. A las 14 h, los componentes de los complejos comienzan a separarse. A las 24 h, los componentes se degradan, como se muestra en la figura 15.

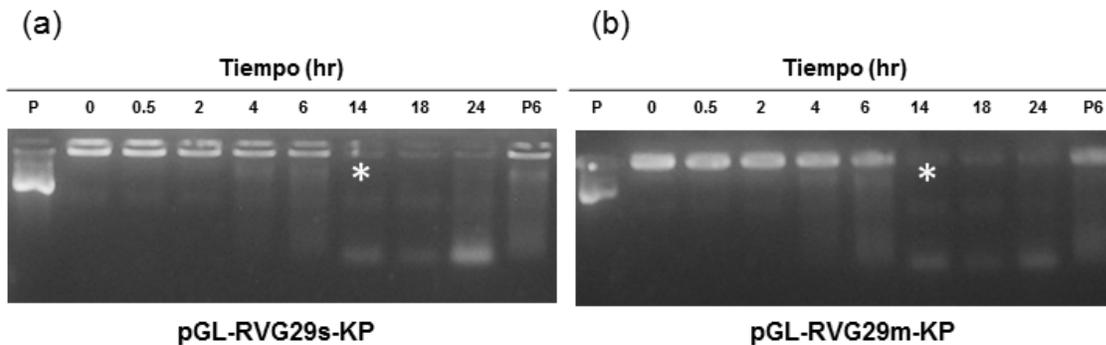


Figura 15. Estabilidad de los complejos RVG29 en presencia de suero. Los complejos RVG29 fueron incubados en presencia de suero de ratón a 37°C por 30 min, 2, 4, 6, 14, 18 y 24 h, y el plásmido sin péptidos fue incubado por 6 h (P6). Se analizó la degradación de los complejos por medio de geles de agarosa al 1%. El símbolo * indica el tiempo en el cual inició la separación de los complejos. En el carril P se muestra el pGL sin péptidos.

7.7 Los complejos RVG29 son capaces de transfectar células del Sistema Nervioso Central en el cerebro murino.

Para comprobar la transfección celular *in vivo* de los complejos RVG29, ratones de la cepa C57BL/6 fueron transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP, por medio de cirugía estereotáxica en las regiones de la corteza, hipocampo y cuerpo estriado. Estas regiones son de interés ya que se encuentran involucradas de una manera importante en los procesos neurodegenerativos y las células de estas regiones podrían ser un excelente blanco para terapia génica en enfermedades neurodegenerativas.

Los ratones fueron sacrificados a los 2, 4 y 20 días post-inyección y se realizó una extracción de RNA de las regiones de interés para síntesis de cDNA y realizar posteriormente una RT-PCR para la detección de la expresión del gen reportero GFP. Se encontró la expresión de GFP en todas las regiones de interés a los 2 días post-inyección (Figura 16). Posteriormente, se evaluó a los 4 días la

expresión del gen reportero GFP en corteza, hipocampo y cuerpo estriado. Como se observa en la figura 17, a los 4 días post transfección, también se observó expresión del gen reportero en las 3 regiones de interés. Además, se procedió a analizar a un tiempo más prolongado la expresión del gen reportero, y al menos hasta los 20 días post-inyección con los complejos RVG29 se mantiene su expresión en corteza, hipocampo y cuerpo estriado (Figura 18).

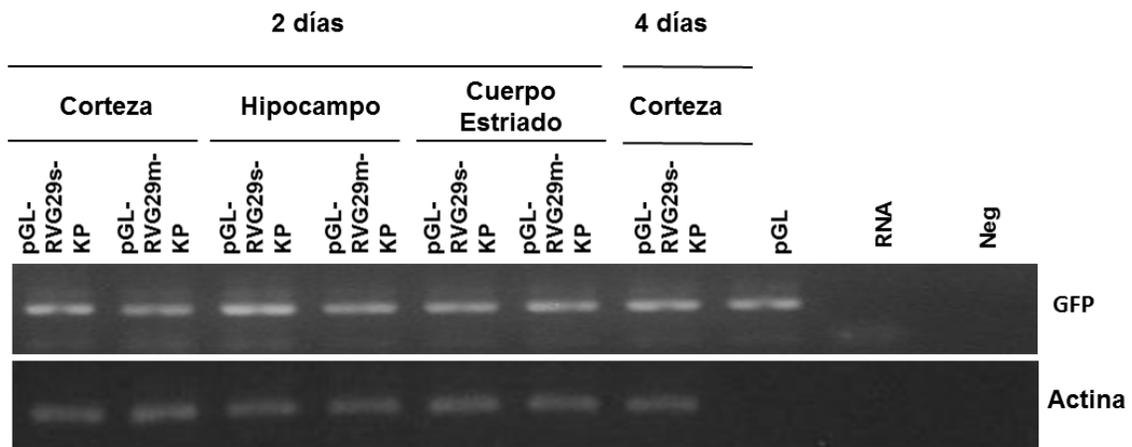


Figura 16. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 2 días post-inyección. Amplificación de un fragmento de 500 pb del gen reportero GFP mediante RT-PCR. La expresión del gen reportero se observa en todas las regiones de interés y en el control positivo (plásmido pGL). Control de actina 400 pb.

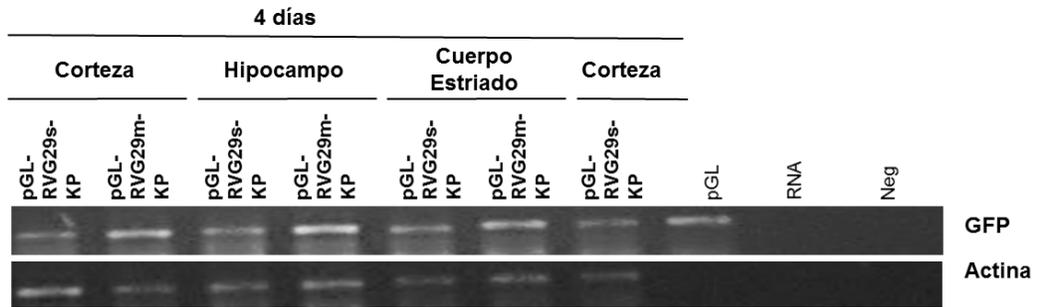


Figura 17. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 4 días post-inyección. Amplificación de un fragmento de 500 pb del gen reportero GFP mediante RT-PCR. La expresión del gen reportero se observa en todas las regiones de interés y en el control positivo (plásmido pGL). Control de actina 400 pb.

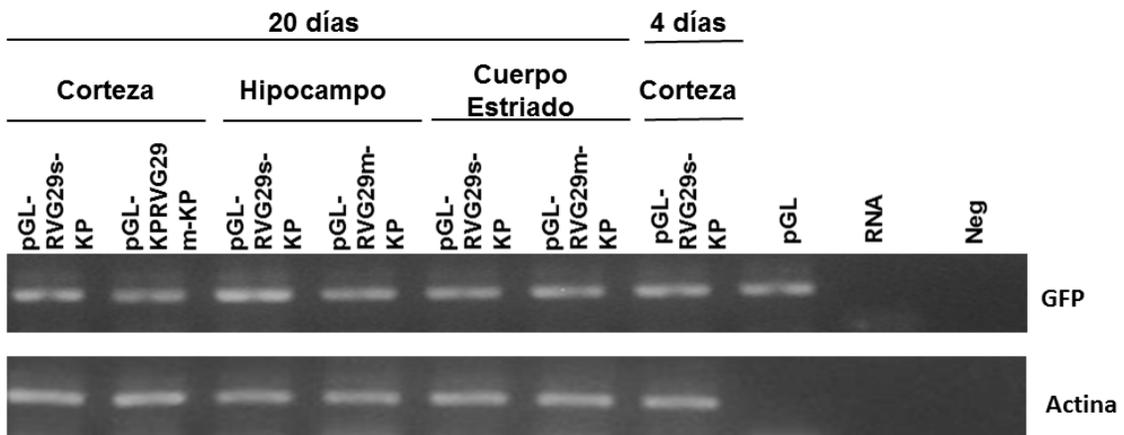


Figura 18. Expresión del gen reportero en cerebro de ratón con los complejos RVG29 a los 20 días post-inyección. Amplificación de un fragmento de 500 pb del gen reportero GFP mediante RT-PCR. La expresión del gen reportero se mantiene en todas las regiones de interés y en el control positivo (plásmido pGL). Control de actina 400 pb.

Es importante identificar los tipos celulares que pueden ser transfectados por los complejos RVG29 en las distintas regiones de nuestro interés, ya que se podría dirigir un vector terapéutico al tipo celular afectado. Para detectar la localización del gen reportero a nivel celular se realizó una IF en los cerebros de ratón a 4 días

post-inyección con los complejos pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP en las regiones de corteza e hipocampo. Se pudo detectar que los complejos tienen la capacidad de transfectar células en la corteza (Figura 19) e hipocampo de cerebro murino (Figura 20).

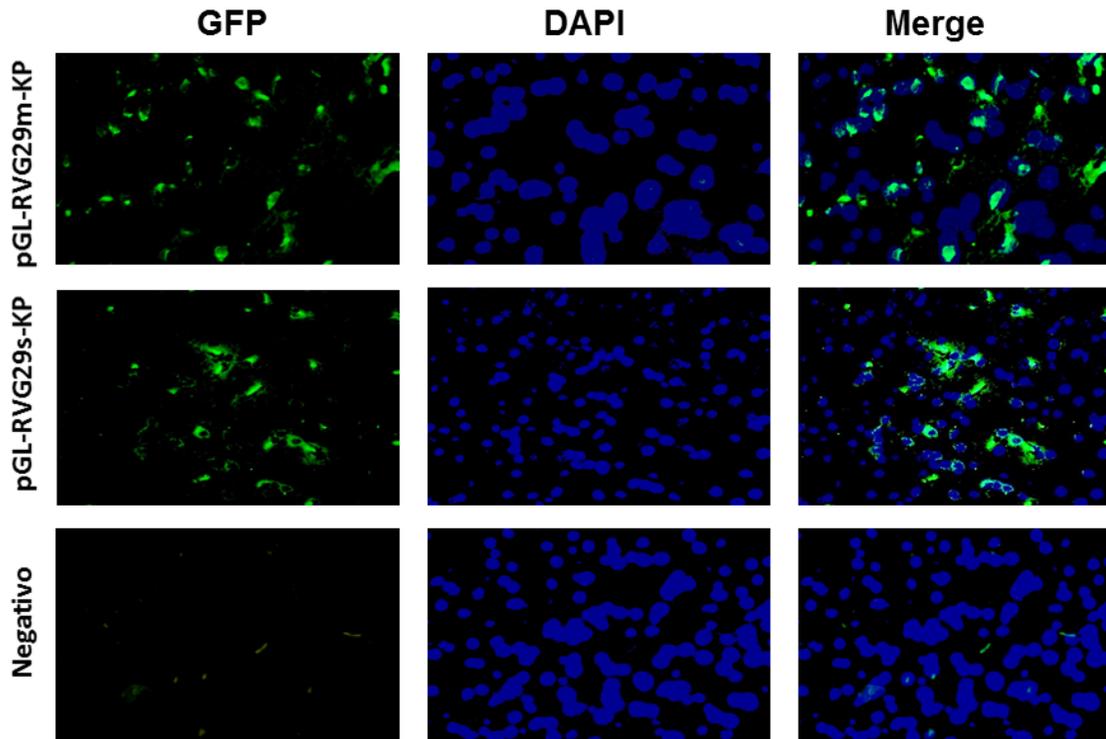


Figura 19. Los complejos RVG29 tienen la capacidad de transfectar células en la corteza a los 4 días post-inyección. Expresión del gen reportero GFP por IF en la región de corteza de cortes de cerebros murinos transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP, el control negativo fue inyectado con PBS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m. Microscopía de fluorescencia.

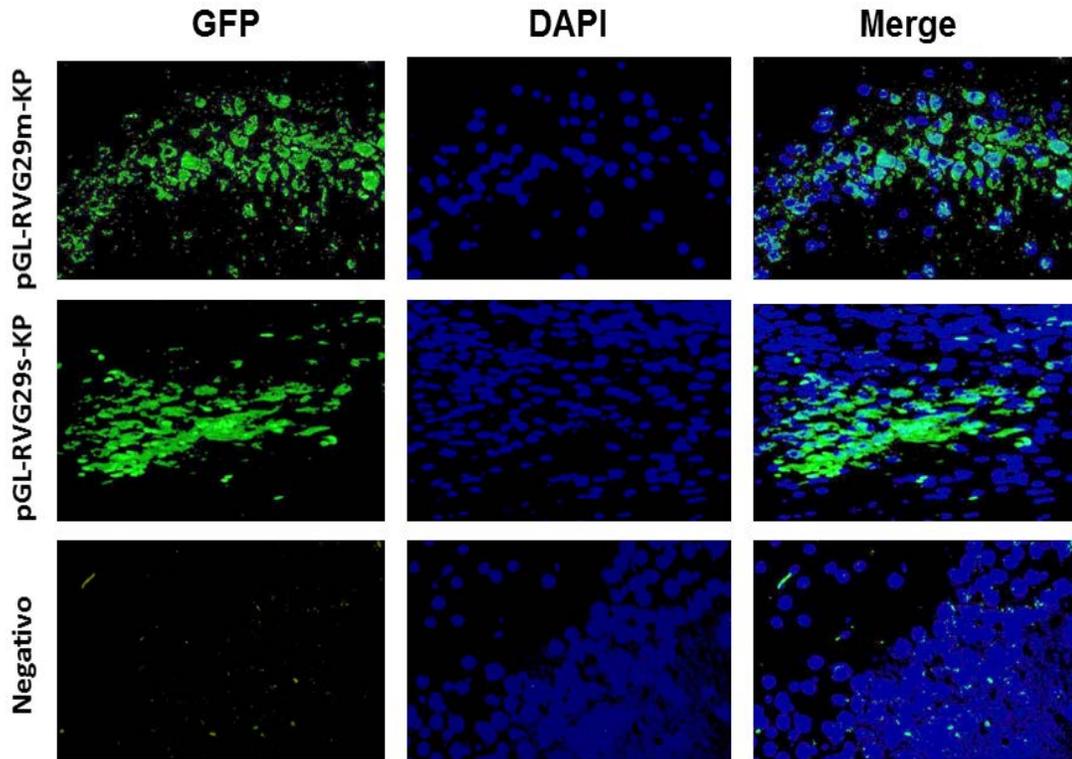


Figura 20. Los complejos RVG29 tienen la capacidad de transfectar células en hipocampo a los 4 días post-inyección. Expresión del gen reportero GFP por IF en la región de hipocampo de cortes de cerebros murino transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP, el control negativo fue inyectado con PBS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m. Microscopía de fluorescencia.

Para determinar los diferentes tipos celulares que expresaran el gen reportero GFP, se sacrificaron los ratones a los cuales se les inyectaron los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP en las regiones de corteza, hipocampo y cuerpo estriado a los 4 y 20 días post-inyección. Se observó positividad a los 4 días post-inyección tanto en neuronas como en células de la glía en la corteza (Figura 21), hipocampo (Figura 22) y cuerpo estriado (Figura 23). Se observó una mayor expresión en los ratones inyectados con pGL-RVG29m-KP a diferencia de los ratones inyectados con pGL-RVG29s-KP, lo cual se confirmó al realizar el análisis estadístico del conteo de células GFP+ por grupo en corteza y cuerpo estriado a los 4 días, como se muestra en las figura 21b y 23b, respectivamente. No se

observó diferencia significativa entre los ratones inyectados con los diferentes complejos RVG29 en la región de hipocampo a los 4 días (Figura 22b).

Para determinar la duración de la expresión del gen reportero en las regiones de estudio, se sacrificaron los animales inyectados con los complejos RVG29 a los 20 días post-inyección. La expresión del gen reportero se mantiene al menos hasta los 20 días post-inyección con los complejos RVG29 en las regiones de la corteza (Figura 21), hipocampo (Figura 22) y cuerpo estriado (Figura 23). Al realizar el análisis estadístico, el conteo de células GFP+ es mayor en el grupo de ratones inyectados con los complejos pGL-RVGm-KP que en los inyectados con pGL-RVGs-KP en todas las regiones de interés. Además, la disminución en el grupo inyectado con pGL-RVGm-KP disminuye aproximadamente 20% a los 20 días con respecto al grupo mutante analizado a los 4 días. Esta disminución es mucho menor a la observada en los grupos inyectados con el complejo silvestre a los 4 y 20 días (Figura 21b, 22b, 23b).

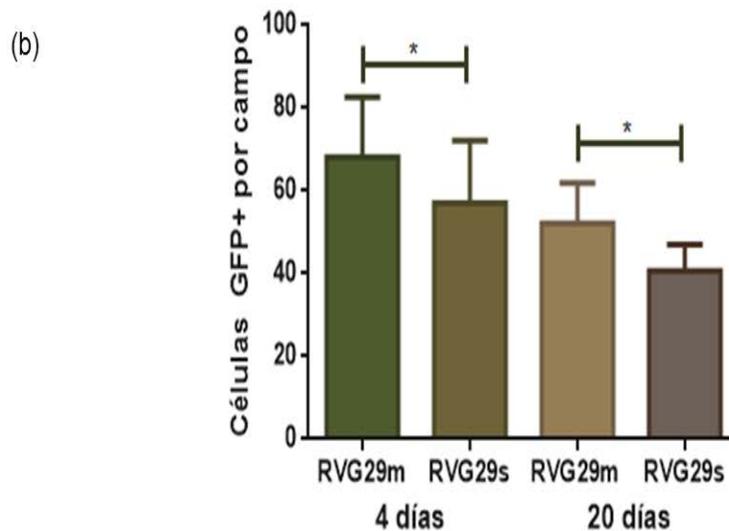
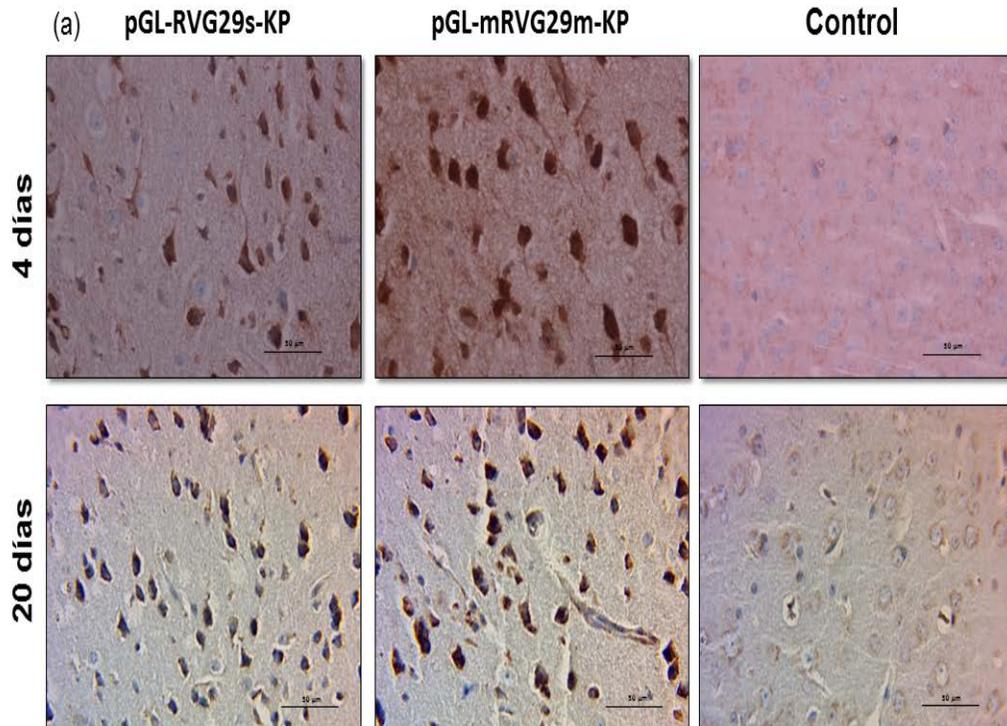


Figura 21. Expresión de GFP en neuronas de corteza de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29. (a) Expresión del gen reportero GFP por IHQ en la región de corteza de cortes de cerebros murino transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP, el control negativo no fue inyectado. (b) Conteo de células GFP+ por campo de ratones inyectados en la región de corteza con los diferentes complejos RVG29. Los resultados se muestran como media \pm SD (n= 2; 8 campos por n), *P <0.05. Escala 50 μ m. Microcopia de campo claro.

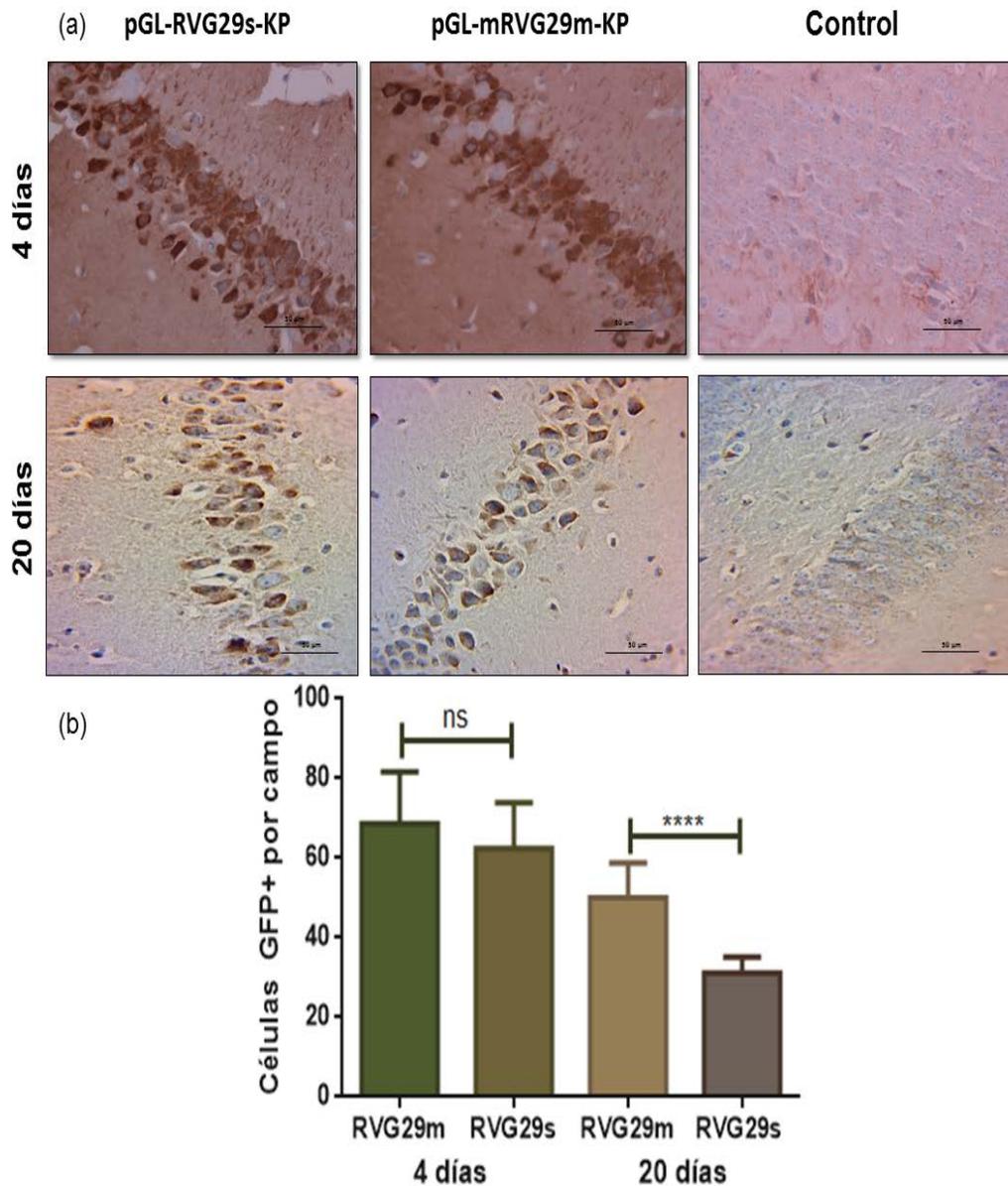


Figura 22. Expresión de GFP en neuronas de hipocampo de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29. (a) Expresión del gen reportero GFP por IHQ en la región de hipocampo de cortes de cerebros murino transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP o pGL-RVG29m-KP, el control negativo no fue inyectado. (b) Conteo de células GFP+ por campo de ratones inyectados en la región de hipocampo con los diferentes complejos RVG29. Los resultados se muestran como media \pm SD (n= 2; 8 campos por n), ****P < 0.001. Escala 50 μ m. Microcopia de campo claro.

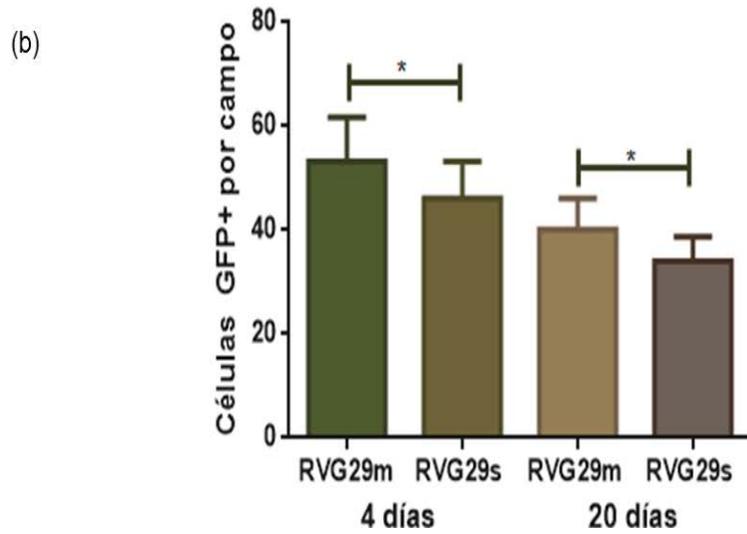
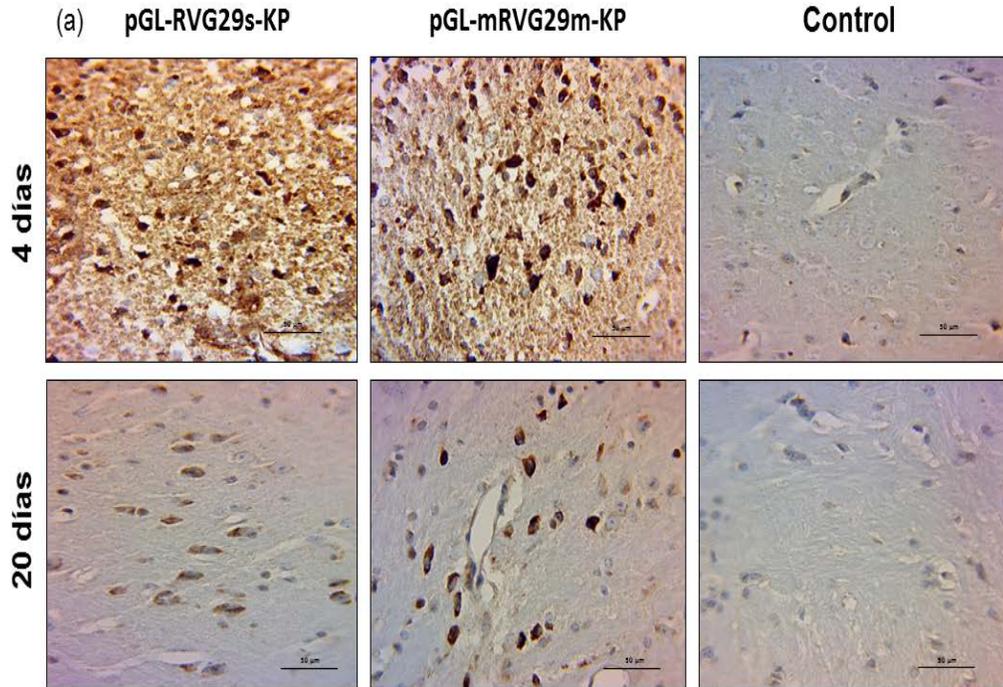


Figura 23. Expresión de GFP en células de cuerpo estriado de cerebro murino inyectados con los complejos RVG29. (a) Expresión del gen reportero GFP por IHQ en la región de cuerpo estriado de cortes de cerebros murino transfectados con los complejos pGL-RVG29s-KP ó pGL-RVG29m-KP, el control negativo no fue inyectado. (b) Conteo de células GFP+ por campo de ratones inyectados en la región de cuerpo estriado con los diferentes complejos RVG29. Los resultados se muestran como media \pm SD (n= 2; 8 campos por n), *P <0.05. Escala 50 μ m. Microcopia de campo claro.

Nos preguntamos si al realizar inyecciones con los complejos RVG29 en otras regiones del cerebro podemos encontrar la expresión del gen reportero en el hipocampo, para esto se realizaron inyecciones con el complejo pGL-RVG29m-KP en cerebro de ratones en la región del ventrículo derecho. Se examinó por medio de IHQ la expresión del gen reportero a los 4 días post-inyección con el complejo, y se encontró su expresión en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo (Figura 24).

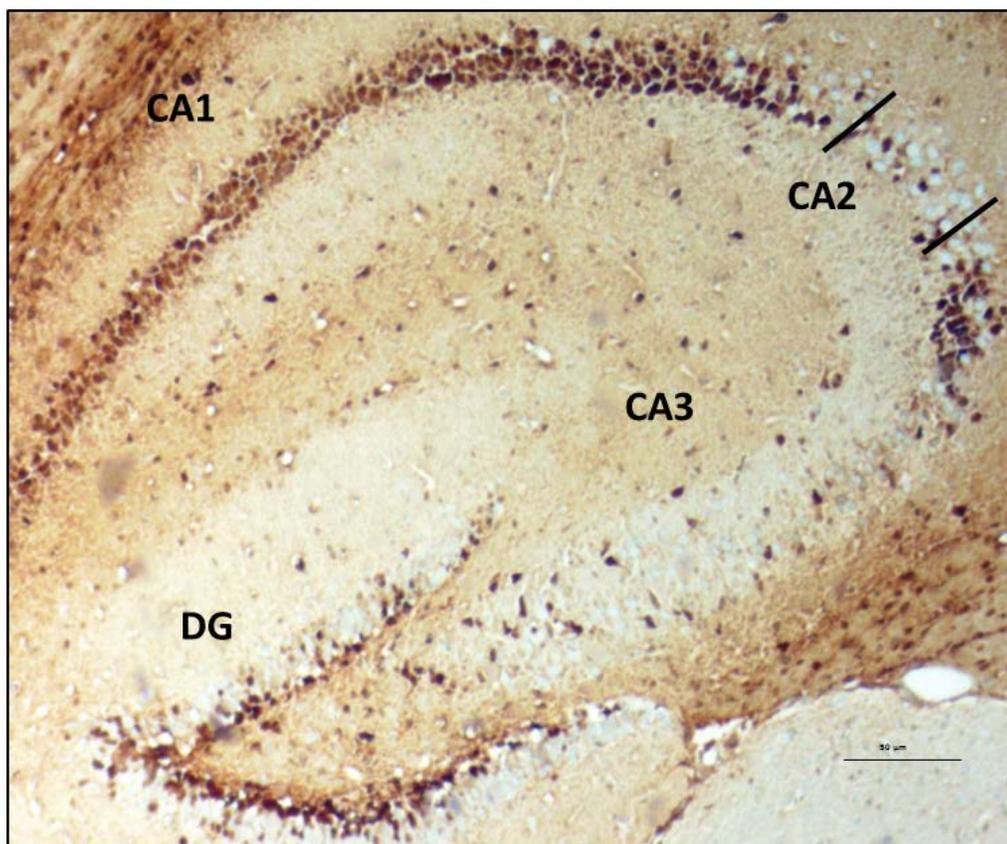


Figura 24. Transfección celular por el complejo pGL-RVG29m-KP en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo al realizar la inyección en ventrículos. Expresión del gen reportero GFP por IHQ en la región de hipocampo de cortes de cerebros murino transfectados con el complejo pGL-RVG29m-KP en ventrículo derecho. Escala 50 μm. CA, cuerno de Amón; GD, giro dentado.

7.8 El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar astrocitos, oligodendrocitos y microglía de corteza e hipocampo

Se procedió a identificar los diferentes tipos celulares que estaban siendo transfectados por el complejo pGL-RVG29m-KP. Los ratones fueron inyectados con el complejo pGL-RVG29m-KP en las regiones de cerebro: corteza e hipocampo, a los 4 días post-inyección los animales fueron sacrificados y se detectaron por IF diferentes tipos celulares del SNC como: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Para la detección de los astrocitos fue analizada la expresión del gen reportero GFP y su co-localización con las células previamente marcadas con GFAP, marcador específico para astrocitos. En la figura 25 se puede observar la localización de ambos marcadores en corteza e hipocampo. Estos resultados nos indican que el complejo pGL-RVG29m-KP tiene capacidad de transfectar astrocitos de corteza e hipocampo en cerebro murino.

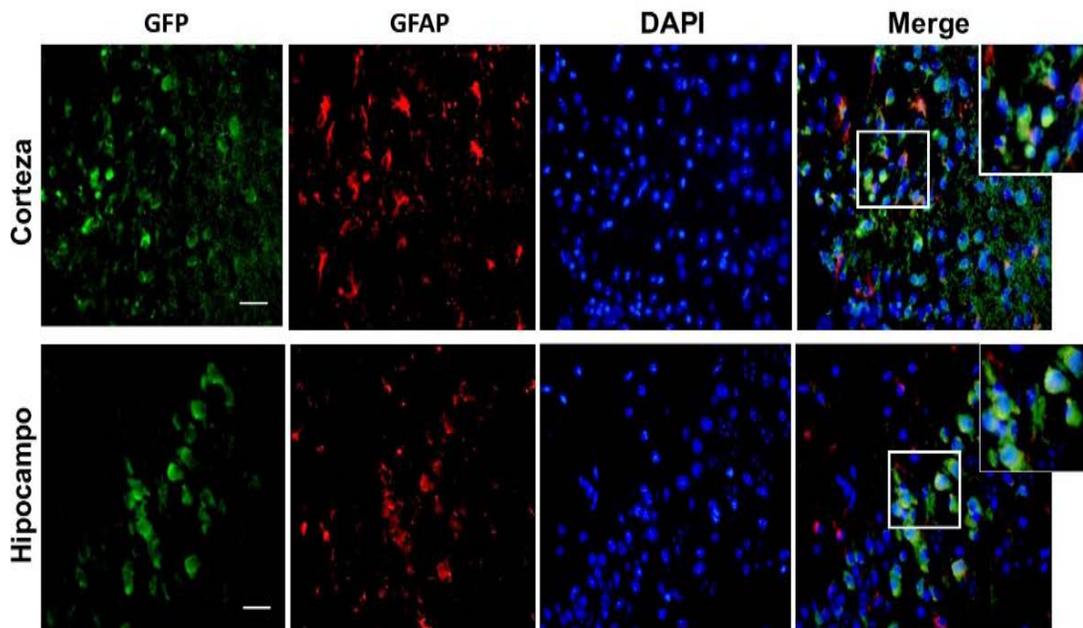


Figura 25. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar astrocitos de corteza e hipocampo. Expresión del gen reportero GFP y del marcador GFAP (astrocitos) por IF en las regiones de corteza e hipocampo de cortes de cerebro murino

transfectados con el complejo pGL-RVG29m-KP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m.

Para la identificación de los oligodendrocitos se utilizó el marcador CNpase, específico para este tipo celular. Se analizó la expresión de GFP y su co-localización con CNpase (oligodendrocitos). En la figura 26 se observa la localización de ambos marcadores en corteza. De manera interesante, el complejo pGL-RVG29m-KP es capaz de transfectar oligodendrocitos de la corteza en cerebro murino, diferente a lo encontrado *in vitro* donde los OPCs no fueron transfectados por los complejos RVG29.

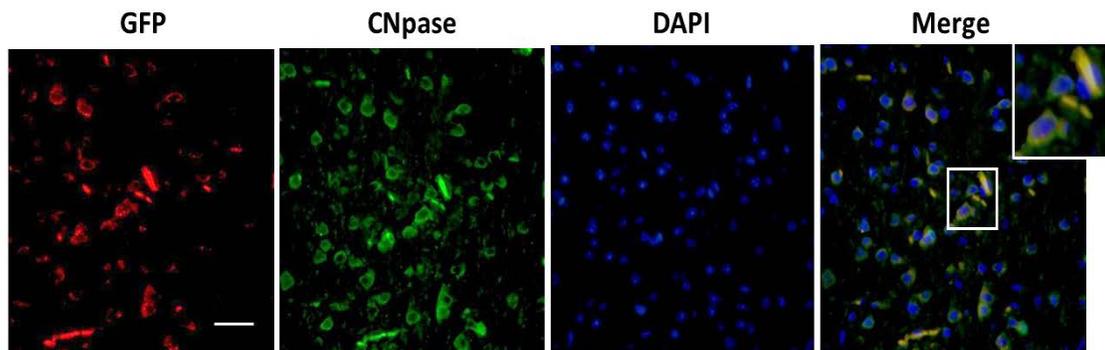


Figura 26. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar oligodendrocitos en corteza de cerebro murino. Expresión del gen reportero GFP y CNpase (oligodendrocitos) por IF en la región de corteza de cortes de cerebro murino transfectados con el complejo pGL-RVG29m-KP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m.

El último tipo celular que fue analizado fue la microglía, que es importante en los procesos de inflamación que se encuentran involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. La microglía también fue analizada con un anticuerpo específico para este tipo celular (anti-Iba1) y su co-localización con GFP en corteza puede ser observada en la figura 27. Estos resultados indican que también la microglía puede ser transfectada por el complejo pGL-RVG29m-KP.

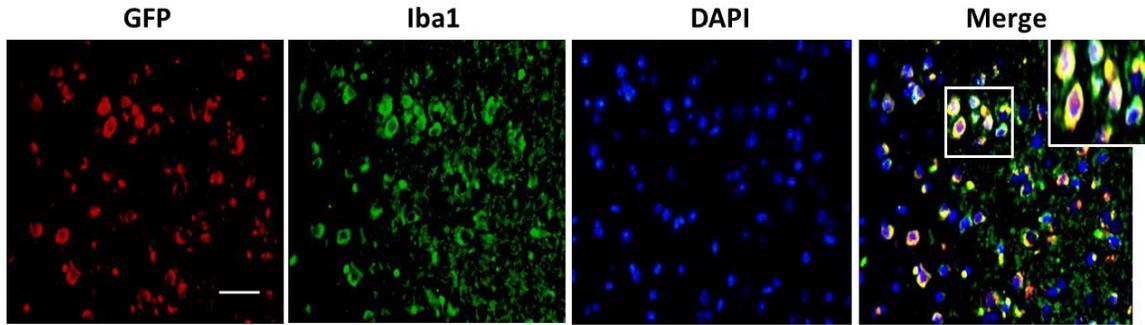


Figura 27. El complejo pGL-RVG29m-KP tiene la capacidad de transfectar microglía de la corteza de cerebro murino. Expresión del gen reportero GFP y del marcador para microglía (Iba1) por IF en la región de la corteza de cerebro murino transfectado con el complejo pGL-RVG29m-KP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala 50 μ m.

8. Discusión

Uno de los principales desafíos en las enfermedades neurodegenerativas es encontrar un tratamiento efectivo y específico que detenga la pérdida celular. Para que un vector pueda ser efectivo en terapia génica, primero debe ser capaz de llegar a las células blanco. Después de eso, debe de atravesar una serie de barreras físicas como la membrana celular, el citoplasma, y finalmente, la envoltura nuclear (Hardee, Arevalo-Soliz *et al.* 2017). El péptido RVG29 ha atraído la atención por su capacidad para cruzar la BHE (Kumar, Wu *et al.* 2007). Hasta el momento, se ha estudiado el péptido RVG29 como vehículo de entrega para diversas moléculas cargo (Rohn, Suttkus *et al.* 2012, Kim, Choi *et al.* 2013, Gao, Wang *et al.* 2014, Liu, Li *et al.* 2015). En este estudio propusimos aumentar la capacidad del péptido RVG29 para transportar moléculas cargo hacia el cerebro introduciendo la mutación Asn194Lys en este CPP. Se demostró que el péptido RVG29m aumenta la capacidad de transportar moléculas cargo a los dos tipos de células del SNC más abundantes, las neuronas y los astrocitos *in vitro*, además de la microglía y oligodendrocitos *in vivo*.

Nuestros resultados mostraron que el complejo pGL-RVG29m tiene una mejor internalización en cultivos de fenotipo neuronal que los complejos sin la mutación Asn194Lys. Aunque el receptor responsable de la captación del virus de la rabia todavía no se ha identificado, el receptor de acetilcolina (nAChR) se ha propuesto como el receptor del virus de la rabia (Lentz 1991). Debido a que RVG es el componente proteico por el cual el virus de la rabia interactúa con nAChR, se ha propuesto que la internalización del péptido RVG29 es un mecanismo mediado por nAChR (Kumar, Wu *et al.* 2007, Kim, Ye *et al.* 2010). En el caso de otro péptido derivado de RVG (RDP), también utilizado como vector de DNA plasmídico, se ha propuesto que el mecanismo de internalización celular se basa en la endocitosis mediada por receptores dependientes de clatrina (Fu, Zhao *et al.* 2013). La eficiencia de transfección celular del complejo pGL-RVG29m-KP fue menor que la obtenida con el reactivo de transfección comercial Turbofect (control positivo). Sin

embargo, la especificidad celular y las características no citotóxicas e inmunogénicas de este complejo pGL-RVG29m le confieren ventajas que lo convierten en un buen candidato para la administración génica mediante la administración sistémica.

La integración de NLS con construcciones de DNA no vírico puede ser útil para aplicaciones terapéuticas. Las NLS se han utilizado para promover y mejorar la importación nuclear de plásmidos. (Navarro-Quiroga, Antonio Gonzalez-Barrios *et al.* 2002, Hebert 2003, Mesika, Kiss *et al.* 2005). Se ha encontrado un aumento de la transfección celular al agregar una NLS (KP) al complejo RVG29 tipo salvaje, pero en contra de lo esperado, en la transfección celular la eficiencia con el complejo pGL-RVG29m-KP permaneció muy similar a la observada con el complejo RVG29m. Se ha descrito que el KP facilita no sólo la entrada nuclear de DNA plasmídico sino también su migración a través del citoplasma hacia el núcleo. Este mecanismo es el mismo que los virus de DNA utilizan para atravesar el citoplasma a lo largo de microtúbulos e impulsados por dineína para transferir su DNA al núcleo celular (Mesika, Kiss *et al.* 2005).

Es posible que la adición del KP al complejo pGL-RVG29 sea el responsable del aumento observado en la transfección celular. Nuestros resultados sugieren que el péptido RVG29m tiene la capacidad de potenciar la importación nuclear de plásmidos. Y puesto que la eficacia de transfección del péptido mutante fue mayor, ésta puede ser la razón por la que la adición del KP al complejo pGL-RVG29m tiene un efecto bajo sobre la eficiencia de la transfección. A pesar de todo esto, observamos una buena eficiencia usando el péptido RVGm sin la adición del KP al complejo, y tiene la ventaja de simplificar el sistema, ya que no se añade un componente más, como el KP.

Dado que el principal receptor involucrado en la internalización celular de RVG, es el nAChR, el CPP RVG puede ser usado como transportador de diversas moléculas cargo, ya que en todo el SNC existen células que expresan nAChRs.

Los núcleos celulares del SNC que tienen una alta densidad de nAChRs incluyen los ganglios basales, los núcleos talámicos, el hipocampo, el hipotálamo, el cerebelo, la comisura habenuar, el núcleo accumbens, la sustancia negra, el área tegmental ventral, el campo retrorubral, el núcleo interpeduncular (Deutch, Holliday *et al.* 1987) y la corteza (Eggermann, Kremer *et al.* 2014). Las células microgliales, los astrocitos y las células endoteliales también expresan nAChRs en el SNC (Green and Loewenstein 1988, Kumar, Wu *et al.* 2007, De Jaco, Bernardini *et al.* 2016). La astrogliosa desempeña un papel esencial en la homeostasis del SNC y representa un blanco terapéutico importante en la terapia génica para las enfermedades neurodegenerativas.

Se encontró que el complejo pGL-RVG29m-KP puede internalizar el gen reportero GFP en cultivos primarios de astrocitos y también en astrocitos de corteza e hipocampo de cerebro murino. Es posible que el tropismo de RVG no sólo esté vinculado a las neuronas, sino también a las células gliales. Los nAChRs gliales participan en la neuroprotección inducida por factores neurotróficos (Sadigh-Eteghad, Majdi *et al.* 2016). Sin embargo, las células gliales también son responsables de la progresión de la EP y desempeñan un papel importante en el inicio de la respuesta tisular temprana. En particular, la disfunción temprana y la acumulación de α -sinucleína en astrocitos protoplasmáticos provoca el reclutamiento de células de microglía que atacan neuronas seleccionadas causando los síntomas clínicos de la EP (Halliday and Stevens 2011).

La apoptosis de los astrocitos ha demostrado desempeñar un papel importante en la lesión del SNC. Encontrar un sistema anti-apoptótico en astrocitos podría conducir al desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades neurodegenerativas (Takuma, Baba *et al.* 2004). Se ha propuesto que la nicotina suprime la apoptosis astrocítica a través de la vía mitocondrial por medio de la estimulación de α 7-nAChRs (Liu, Zeng *et al.* 2015), y RVG29m podría ser utilizado para evadir la apoptosis de astrocitos. Otras células del SNC que presentan nAChR son las de la microglía (Shytle, Mori *et al.* 2004, Parada, Egea *et al.* 2013).

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos regulados por ligando, y la endocitosis dependiente de clatrina es el principal mecanismo de internalización cuando los ligandos entran en las células (Ulens, Hogg *et al.* 2006Ulens, Hogg *et al.* 2006). Se ha determinado que la captación celular de RVG es una endocitosis mediada por clatrina y caveolas relacionada con nAChR (Liu, Huang *et al.* 2009). Se sabe que para una endocitosis eficaz se necesitan dos componentes del citoesqueleto, los microtúbulos y los filamentos de actina. En este estudio, la internalización del complejo RVG29 se inhibió *in vitro* mediante la adición de un agente despolimerizante de microtúbulos, la colchicina, lo que sugiere que la vía endocitosis está involucrada en la internalización de los complejos RVG. También se utilizaron inhibidores químicos de la endocitosis mediada por clatrina, como la sacarosa hipertónica que atrapa la clatrina en microtrampas y la depleción de potasio que provoca la formación de agregados de clatrina. Nuestros resultados confirmaron la ruta endocítica que siguen los complejos RVG29 en la internalización celular.

Es importante probar la estabilidad en suero de los complejos péptido-DNA para una aplicación satisfactoria en estudios *in vivo*. La pérdida de la integridad de los complejos puede ser visualizada por la separación y degradación de sus componentes a las 24 h. Nuestras observaciones indican que los complejos de RVG29 son estables en suero durante al menos 18 h, lo que sugiere una posible protección contra las nucleasas séricas del DNA plasmídico con los péptidos RVG29 y KP. La estabilidad observadas ería suficiente para la aplicación de estos complejos RVG29 *in vivo* y su propagación a través del cerebro.

Se encontró que los complejos RVG29 pueden internalizarse a células astrogiales tanto *in vitro* como en cerebro murino. De manera interesante, no se encontró transfección en OPCs *in vitro*, pero se encontró transfección de oligodendrocitos en cerebro murino. Se ha encontrado que los OPCs expresan nAChRs en la fase de diferenciación (Marinelli, Bertalot *et al.* 2016). Sin embargo,

todavía no se ha identificado cuáles son las subunidades de nAChR que son capaces de vincular RVG. Es posible que RVG29m y RVG29s no se unan a todas las subunidades nAChR. Dado a que los OPCs aún están en fase de maduración, no expresen el receptor requerido para la internalización celular de los complejos RVG29. Sin embargo, en oligodendrocitos maduros ya se encuentra presente el receptor requerido en este tipo celular, y por lo tanto los complejos RVG29 son capaces de transfectar oligodendrocitos en cerebro murino como lo observamos en nuestro estudio. Castañeda-Castellanos observó que el virus de la rabia puede infectar células que no expresan nAChRs, como las células de Schwann y fibroblastos (Castellanos *et al.* 2002). Esto sugiere que un mecanismo diferente también puede estar involucrado en la internalización RVG29.

Por otro lado, se demostró la capacidad de los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP en la entrega de moléculas a células del cerebro murino hasta los 20 días post-inyección. La disminución de la expresión de células GFP+ en los ratones inyectados con el complejo mutante disminuye un 20% a los 20 días con respecto a los ratones analizados a los 4 días post-inyección. Es necesario evaluar a tiempos más prolongados la eficiencia de transfección de los complejos RVG29, así como la entrega de otras moléculas cargo hacia el cerebro y su administración transvascular.

En nuestro estudio se logró transfectar las células de la microglía con el complejo pGL-RVG29m-KP *in vivo*. La activación de la microglía aparece como un evento temprano en los casos de EP y en modelos animales de EP incluyendo los modelos de neurotoxicidad. El marcador Iba1 que utilizamos en este estudio identifica la microglía reactiva, por lo tanto, es un buen marcador para identificar este estado de la microglía. Recientemente, se ha propuesto enfocarse en el conocimiento de la activación de la microglía y la capacidad de manipular este tipo celular como posible blanco terapéutico (Blaylock 2017).

En este trabajo se inyectaron los complejos RVG29 en cuerpo estriado, ya que existe una vía que transmite dopamina desde la sustancia nigra hasta el cuerpo

estriado, y es una vía neuronal asociada con el control motor y retrógrada. Se ha comprobado la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta al inyectar en cuerpo estriado la toxina 6-OHDA que es usada para inducir parkinsonismo en modelos animales (Becker, Demirbas *et al.* 2017). Se espera como perspectiva el analizar la expresión de un gen terapéutico en sustancia nigra al ser inyectado con el complejo RVG29m-KP en cuerpo estriado.

Otra región del cerebro donde se inyectaron los complejos RVG29 y que de forma interesante se encontró expresión del gen reportero GFP en diversos tipos celulares fue la corteza. Se ha demostrado que la inervación de la vía dopaminérgica se ve reducida en la corteza motora y pre-frontal en la EP (Gaspar, Duyckaerts *et al.* 1991), es por eso que resulta de interés para la transfección en terapia génica.

Por otro lado, una de las regiones que se ve afectada principalmente en la EA es el hipocampo (Fujikawa, Higuchi *et al.* 2017). En la cual, en nuestro estudio encontramos expresión del gen reportero al inyectar en CA1 del hipocampo. De manera interesante, al inyectar en el ventrículo derecho se encontró expresión en las regiones CA1, CA3 Y DG del hipocampo. Recientemente, se ha reportado que al estimular DG en un modelo animal de la EA se puede restaurar la memoria (Perusini, Cajigas *et al.* 2017).

Por lo tanto, el complejo RVG29m-KP, que diseñamos en nuestro estudio, representa una estrategia prometedora para la entrega de moléculas terapéuticas, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP.

9. Conclusiones

Demostramos una mayor capacidad de transfección celular del péptido RVG29 modificado por la introducción de la mutación Asn194Lys. El nuevo complejo pGL-RVG29m tiene una mayor capacidad de transfección celular que el complejo pGL-RVG29s (tipo silvestre). También hemos demostrado que la adición de KP al complejo pGL-RVG29s aumenta su capacidad de transfección celular. Estos nuevos complejos tienen especificidad para transfectar astrocitos y células SH-SY5Y.

Determinamos que los complejos pGL-RVG29s-KP y pGL-RVG29m-KP tienen la capacidad de entregar moléculas de DNA a células del cerebro murino a partir del segundo día de post-inyección, y la expresión del gen reportero se observó hasta por 20 días post-inyección en las regiones de corteza, cuerpo estriado y en hipocampo en las regiones CA1, CA3 y DG. Además, el complejo pGL-RVGm-KP tiene la capacidad de transfectar astrocitos, microglía y oligodendrocitos en cerebro murino.

Estos resultados tienen un potencial prometedor para la terapia génica dirigida al cerebro para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

10. Perspectivas

- Dilucidar el mecanismo de internalización del complejo mRVG29-KP.
- Desarrollar un complejo mRVG29-KP que sea capaz de entregar moléculas de DNA al cerebro por vía intravenosa.
- Realizar la administración del complejo mRVG29-KP con factores neurotróficos en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.
- Determinar el máximo tiempo de expresión del complejo mRVG29-KP *in vivo*.

11. Bibliografía

1. Albertini, A. A., R. W. Ruigrok and D. Blondel (2011). "Rabies virus transcription and replication." Adv Virus Res **79**: 1-22.
2. Amand, H. L., K. Fant, B. Norden and E. K. Esbjorner (2008). "Stimulated endocytosis in penetratin uptake: effect of arginine and lysine." Biochem Biophys Res Commun **371**(4): 621-625.
3. Anson, D. S. (2004). "The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery." Genet Vaccines Ther **2**(1): 9.
4. Azimi, N., G. Yadollahikhales, J. P. Argenti and M. G. Cunningham (2017). "Discrepancies in stereotaxic coordinate publications and improving precision using an animal-specific atlas." J Neurosci Methods **284**: 15-20.
5. Becker, B., M. Demirbas, S. Johann, A. Zendedel, C. Beyer, H. Clusmann, S. J. Haas, A. Wree, S. K. H. Tan and M. Kipp (2017). "Effect of Intrastratial 6-OHDA Lesions on Extrastratial Brain Structures in the Mouse." Mol Neurobiol.
6. Blaylock, R. L. (2017). "Parkinson's disease: Microglial/macrophage-induced immunoexcitotoxicity as a central mechanism of neurodegeneration." Surg Neurol Int **8**: 65.
7. Buckingham, S. D., A. K. Jones, L. A. Brown and D. B. Sattelle (2009). "Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection." Pharmacol Rev **61**(1): 39-61.
8. Carvey, P. M., B. Hendey and A. J. Monahan (2009). "The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective." J Neurochem **111**(2): 291-314.
9. Castaneda-Castellanos, D. R., J. E. Castellanos and H. Hurtado (2002). "Differential use of the nicotinic receptor by rabies virus based upon substrate origin." J Neurovirol **8**(2): 150-154.
10. Cherian, S., R. Singh, K. P. Singh, G. B. Manjunatha Reddy, Anjaneya, G. V. Ravi Kumar, T. G. Sumithra and R. P. Singh (2015). "Phylogenetic

- analysis of Indian rabies virus isolates targeting the complete glycoprotein gene." Infect Genet Evol **36**: 333-338.
11. Chiou, H. C., M. V. Tangco, S. M. Levine, D. Robertson, K. Kormis, C. H. Wu and G. Y. Wu (1994). "Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers." Nucleic Acids Res **22**(24): 5439-5446.
 12. De Jaco, A., L. Bernardini, J. Rosati and A. M. Tata (2016). "Alpha-7 Nicotinic Receptors in Nervous System Disorders: From Function to Therapeutic Perspectives." Cent Nerv Syst Agents Med Chem.
 13. Deshayes, S., M. C. Morris, G. Divita and F. Heitz (2005). "Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics." Cell Mol Life Sci **62**(16): 1839-1849.
 14. Deutch, A. Y., J. Holliday, R. H. Roth, L. L. Chun and E. Hawrot (1987). "Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8697-8701.
 15. Eggermann, E., Y. Kremer, S. Crochet and C. C. Petersen (2014). "Cholinergic Signals in Mouse Barrel Cortex during Active Whisker Sensing." Cell Rep.
 16. Faber, M., M. L. Faber, A. Papaneri, M. Bette, E. Weihe, B. Dietzschold and M. J. Schnell (2005). "A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity." J Virol **79**(22): 14141-14148.
 17. Felten, D. and R. Józefowicz (2003). Netter's Atlas of Human Neuroscience, Icon Learning Systems.
 18. Ferreira-Vieira, T. H., I. M. Guimaraes, F. R. Silva and F. M. Ribeiro (2016). "Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System." Curr Neuropharmacol **14**(1): 101-115.
 19. Fu, A., Y. Wang, L. Zhan and R. Zhou (2012). "Targeted delivery of proteins into the central nervous system mediated by rabies virus glycoprotein-derived peptide." Pharm Res **29**(6): 1562-1569.

20. Fu, A., M. Zhang, F. Gao, X. Xu and Z. Chen (2013). "A novel peptide delivers plasmids across blood-brain barrier into neuronal cells as a single-component transfer vector." PLoS One **8**(3): e59642.
21. Fu, A., Z. Zhao, F. Gao and M. Zhang (2013). "Cellular uptake mechanism and therapeutic utility of a novel peptide in targeted-delivery of proteins into neuronal cells." Pharm Res **30**(8): 2108-2117.
22. Fujikawa, R., S. Higuchi, M. Nakatsuji, M. Yasui, T. Ikedo, M. Nagata, K. Hayashi, M. Yokode and M. Minami (2017). "Deficiency in EP4 Receptor-Associated Protein Ameliorates Abnormal Anxiety-Like Behavior and Brain Inflammation in a Mouse Model of Alzheimer Disease." Am J Pathol.
23. Futaki, S. (2005). "Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 547-558.
24. Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura (2001). "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery." J Biol Chem **276**(8): 5836-5840.
25. Gao, Y., Z. Y. Wang, J. Zhang, Y. Zhang, H. Huo, T. Wang, T. Jiang and S. Wang (2014). "RVG-peptide-linked trimethylated chitosan for delivery of siRNA to the brain." Biomacromolecules **15**(3): 1010-1018.
26. Gaspar, P., C. Duyckaerts, C. Alvarez, F. Javoy-Agid and B. Berger (1991). "Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease." Ann Neurol **30**(3): 365-374.
27. Gotti, C., M. Zoli and F. Clementi (2006). "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance." Trends Pharmacol Sci **27**(9): 482-491.
28. Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-1188.
29. Halliday, G. M. and C. H. Stevens (2011). "Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease." Mov Disord **26**(1): 6-17.

30. Hanham, C. A., F. Zhao and G. H. Tignor (1993). "Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor." J Virol **67**(1): 530-542.
31. Hansen, S. H., K. Sandvig and B. van Deurs (1993). "Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors." J Cell Biol **123**(1): 89-97.
32. Hardee, C. L., L. M. Arevalo-Soliz, B. D. Hornstein and L. Zechiedrich (2017). "Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy." Genes (Basel) **8**(2).
33. Hebert, E. (2003). "Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy?" Biol Cell **95**(2): 59-68.
34. Heitz, F., M. C. Morris and G. Divita (2009). "Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics." Br J Pharmacol **157**(2): 195-206.
35. Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.
36. Jackson, A. C. (2016). "Human Rabies: a 2016 Update." Curr Infect Dis Rep **18**(11): 38.
37. Kim, J. Y., W. I. Choi, Y. H. Kim and G. Tae (2013). "Brain-targeted delivery of protein using chitosan- and RVG peptide-conjugated, pluronic-based nano-carrier." Biomaterials **34**(4): 1170-1178.
38. Kim, S. S., C. Ye, P. Kumar, I. Chiu, S. Subramanya, H. Wu, P. Shankar and N. Manjunath (2010). "Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment." Mol Ther **18**(5): 993-1001.
39. Kuan, W. L., E. Poole, M. Fletcher, S. Karniely, P. Tyers, M. Wills, R. A. Barker and J. H. Sinclair (2012). "A novel neuroprotective therapy for Parkinson's disease using a viral noncoding RNA that protects mitochondrial complex I activity." J Exp Med **209**(1): 1-10.
40. Kumar, P., H. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar and N. Manjunath (2007). "Transvascular delivery of

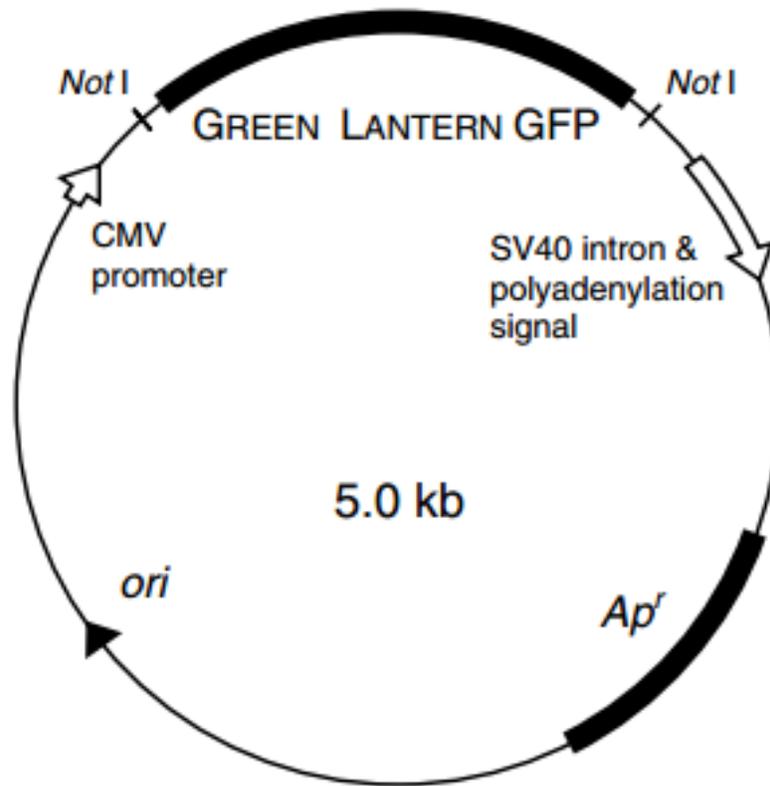
- small interfering RNA to the central nervous system." Nature **448**(7149): 39-43.
41. Lafon, M. (2005). "Rabies virus receptors." J Neurovirol **11**(1): 82-87.
42. Larkin, J. M., M. S. Brown, J. L. Goldstein and R. G. Anderson (1983). "Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts." Cell **33**(1): 273-285.
43. Lentz, T. L. (1991). "Structure-function relationships of curaremimetic neurotoxin loop 2 and of a structurally similar segment of rabies virus glycoprotein in their interaction with the nicotinic acetylcholine receptor." Biochemistry **30**(45): 10949-10957.
44. Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith, J. Crick and G. H. Tignor (1982). "Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?" Science **215**(4529): 182-184.
45. Li, N., H. Yang, Z. Yu, Y. Li, W. Pan, H. Wang and B. Tang (2017). "Nuclear-targeted siRNA delivery for long-term gene silencing." Chem Sci **8**(4): 2816-2822.
46. Liu, Y., R. Huang, L. Han, W. Ke, K. Shao, L. Ye, J. Lou and C. Jiang (2009). "Brain-targeting gene delivery and cellular internalization mechanisms for modified rabies virus glycoprotein RVG29 nanoparticles." Biomaterials **30**(25): 4195-4202.
47. Liu, Y., D. Li, Z. Liu, Y. Zhou, D. Chu, X. Li, X. Jiang, D. Hou, X. Chen, Y. Chen, Z. Yang, L. Jin, W. Jiang, C. Tian, G. Zhou, K. Zen, J. Zhang, Y. Zhang, J. Li and C. Y. Zhang (2015). "Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse." Sci Rep **5**: 17543.
48. Liu, Y., X. Zeng, Y. Hui, C. Zhu, J. Wu, D. H. Taylor, J. Ji, W. Fan, Z. Huang and J. Hu (2015). "Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease." Neuropharmacology **91**: 87-96.

49. Lobsiger, C. S. and D. W. Cleveland (2007). "Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease." Nat Neurosci **10**(11): 1355-1360.
50. Marinelli, C., T. Bertalot, M. Zusso, S. D. Skaper and P. Giusti (2016). "Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage." Front Cell Neurosci **10**: 27.
51. McGowan, J. W., G. L. Bidwell, 3rd and P. J. Vig (2015). "Challenges and new strategies for therapeutic peptide delivery to the CNS." Ther Deliv **6**(7): 841-853.
52. Mesika, A., V. Kiss, V. Brumfeld, G. Ghosh and Z. Reich (2005). "Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein." Hum Gene Ther **16**(2): 200-208.
53. Navarro-Quiroga, I., J. Antonio Gonzalez-Barrios, F. Barron-Moreno, V. Gonzalez-Bernal, D. B. Martinez-Arguelles and D. Martinez-Fong (2002). "Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal." Brain Res Mol Brain Res **105**(1-2): 86-97.
54. Parada, E., J. Egea, I. Buendia, P. Negro, A. C. Cunha, S. Cardoso, M. P. Soares and M. G. Lopez (2013). "The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2." Antioxid Redox Signal **19**(11): 1135-1148.
55. Pardridge, W. M. (2002). "Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 131-139.
56. Perez-Martinez, F. C., J. Guerra, I. Posadas and V. Cena (2011). "Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system." Pharm Res **28**(8): 1843-1858.
57. Perusini, J. N., S. A. Cajigas, O. Cohensedgh, S. C. Lim, I. P. Pavlova, Z. R. Donaldson and C. A. Denny (2017). "Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice." Hippocampus.

58. Piasek, A. and J. Thyberg (1979). "Effects of colchicine on endocytosis and cellular inactivation of horseradish peroxidase in cultured chondrocytes." J Cell Biol **81**(2): 426-437.
59. Rohn, S., A. Suttkus, T. Arendt and U. Ueberham (2012). "RVG peptide as transfection reagent for specific cdk4 gene silencing in vitro and in vivo." J Drug Target **20**(4): 381-388.
60. Sadigh-Eteghad, S., A. Majdi, J. Mahmoudi, S. E. Golzari and M. Talebi (2016). "Astrocytic and microglial nicotinic acetylcholine receptors: an overlooked issue in Alzheimer's disease." J Neural Transm (Vienna).
61. Schlachetzki, F., Y. Zhang, R. J. Boado and W. M. Pardridge (2004). "Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach." Neurology **62**(8): 1275-1281.
62. Shytle, R. D., T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A. A. Silver, P. R. Sanberg and J. Tan (2004). "Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors." J Neurochem **89**(2): 337-343.
63. Son, S., W. Hwang do, K. Singha, J. H. Jeong, T. G. Park, D. S. Lee and W. J. Kim (2011). "RVG peptide tethered bioreducible polyethylenimine for gene delivery to brain." J Control Release **155**(1): 18-25.
64. St Pierre, C. A., D. Leonard, S. Corvera, E. A. Kurt-Jones and R. W. Finberg (2011). "Antibodies to cell surface proteins redirect intracellular trafficking pathways." Exp Mol Pathol **91**(3): 723-732.
65. Takuma, K., A. Baba and T. Matsuda (2004). "Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection." Prog Neurobiol **72**(2): 111-127.
66. Ulens, C., R. C. Hogg, P. H. Celie, D. Bertrand, V. Tsetlin, A. B. Smit and T. K. Sixma (2006). "Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3615-3620.
67. World-Health-Organization. (2015). "Ageing and health." Retrieved May, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/es/>.

68. Wu, S. P., A. L. Fu, Y. X. Wang, L. P. Yu, P. Y. Jia, Q. Li, G. Z. Jin and M. J. Sun (2006). "A novel therapeutic approach to 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats via supplementation of PTD-conjugated tyrosine hydroxylase." Biochem Biophys Res Commun **346**(1): 1-6.
69. Xu, L., C. Alarcon, S. Col and J. Massague (2003). "Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import." J Biol Chem **278**(43): 42569-42577.
70. Zhang, D., J. Wang and D. Xu (2016). "Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems." J Control Release **229**: 130-139.
71. Zhong, H., A. Takeda, R. Nazari, H. Shio, G. Blobel and N. R. Yaseen (2005). "Carrier-independent nuclear import of the transcription factor PU.1 via RanGTP-stimulated binding to Nup153." J Biol Chem **280**(11): 10675-10682.
72. Zhu, S. and C. Guo (2016). "Rabies Control and Treatment: From Prophylaxis to Strategies with Curative Potential." Viruses **8**(11).
73. Zou, L., Y. Tao, G. Payne, L. Do, T. Thomas, J. Rodriguez and H. Dou (2017). "Targeted delivery of nano-PTX to the brain tumor-associated macrophages." Oncotarget **8**(4): 6564-6578.
74. Zou, Z., Z. Sun, P. Li, T. Feng and S. Wu (2016). "Cre Fused with RVG Peptide Mediates Targeted Genome Editing in Mouse Brain Cells In Vivo." Int J Mol Sci **17**(12).

12. Anexos



CURRICULUM VITAE

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Sheila Adela Villa Cedillo

Fecha de Nacimiento: 12 de Marzo de 1987

Email: sheila.adela@gmail.com

Educación

- 2013 – 2017: Doctorado en Ciencias con orientación en Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- 2010 – 2012: Maestría en Investigación Clínica y epidemiológica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México.
- 2004 – 2009: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango, México.

Participación en congresos

- Cartel: **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Zavala-Flores Laura Mireya, Acosta-Espinoza Esrom Jared, Rivera-Chávez Luis Felipe, García-García Aracely, Rodríguez-Rocha Humberto, Loera-Arias María de Jesús, Montes de Oca-Luna Roberto, Saucedo-Cárdenas Odila: "Evaluación de la habilidad del péptido RVG como transportador de DNA para terapia génica en enfermedades neurodegenerativas". III Taller de Habilidades Profesionales para Jóvenes Científicas, Guadalajara, Jalisco, 7 -19 de Septiembre 2016.
- Cartel: Rivera Chávez, Luis Felipe; **Villa Cedillo, Sheila Adela**; Villanueva Olivo, Arnulfo; Saucedo Cárdenas, Odila; Zavala Flores, Laura Mireya. "Análisis del efecto apoptótico de la glibenclamida en células de fenotipo neuronal" XXII Foro Norte de Investigación en Salud, Monterrey, N.L., 25-27 de Mayo 2016.
- Cartel: Esrom Jared Acosta Espinoza, Martínez-Rodríguez Héctor Ramón, Zavala-Flores Natalia, Montes de Oca Carlos Roberto, Sánchez-Sánchez Leyla Leticia, **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Saucedo-Cárdenas Odila. "Frequency of the polymorphism 5-httlpr in patients with parkinson's disease" Ist Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry. Puebla, México, April 2-6 2016.
- Cartel: **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Zavala-Flores Laura Mireya, Acosta-Espinoza Esrom Jared, Rivera-Chávez Luis Felipe, García-García Aracely, Rodríguez-Rocha Humberto, Loera-Arias María de Jesús, Montes de Oca-Luna Roberto, Saucedo-Cárdenas Odila: "Evaluation of the RVG peptide ability as a DNA carrier for gene therapy in neurodegenerative diseases" Ist Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry. Puebla, México, April 2-6 2016.

- Cartel: **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Zavala-Flores Laura, Montes de Oca-Luna Roberto, Saucedo-Cárdenas Odila. "Evaluación de la capacidad del péptido RVG como vehículo terapéutico para enfermedades neurodegenerativas". XXVII Congreso Nacional de Investigación en Medicina, Monterrey, N.L., 7-10 Octubre 2015.
- Cartel: **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Nava -Hernández Martha Patricia, Saucedo-Cárdenas Odila. "Evaluación del daño morfológico en la médula espinal de ratas wistar expuestas a plomo". XX Foro Nacional de Investigación en Salud. Oaxtepec, Morelos, 21-23 Septiembre 2012.
- Cartel: **Villa-Cedillo Sheila Adela**, Bustamante-Gómez José Benjamín, Pang-Martínez Yolanda, Martínez-Ordaz Verónica. "Detección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en un grupo de mujeres embarazadas de la ciudad de torreón, Coahuila". XX Foro Nacional de Investigación en Salud. Oaxtepec, Morelos, 21-23 Septiembre 2012.

Publicaciones

- **Villa-Cedillo SA**, Rodríguez-Rocha H, Zavala-Flores LM, Montes-de-Oca-Luna R, García-García A, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cárdenas O (2017). Asn194Lys mutation in RVG29 peptide increases GFP transgene delivery by endocytosis to neuroblastoma and astrocyte cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. DOI: 10.1111/jphp.12766.
- Ramos-Treviño, J, Bassol-Mayagoitia, S, Ruiz-Flores, P, Espino-Silva, PK, Saucedo-Cárdenas, O, **Villa-Cedillo, SA**, Nava-Hernández, MP (2017). In vitro evaluation of damage by heavy metals in tight and gap junctions of sertoli cells. *DNA and Cell Biology* (Aceptado).
- **Villa-Cedillo SA**, Saucedo-Cárdenas O (2017). Gene therapy with neurotrophic factors for neurodegenerative diseases. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. (Aceptado)
- Martínez-Romero, A., **Villa-Cedillo, SA.**, Bustamante-Gómez, JB., Ortega-Sánchez, JL., García-Luján, C., Alba-Romero, JJ. (2009). Specific detection of anti hiv-1 and anti hiv-2 antibodies by antigens with improved immunoreactivity. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. ISSN: 0186-3131 2009 8:223-227.

Reconocimientos

- Estudiante Distinguido en el Doctorado en Ciencias con orientación en Morfología durante el ciclo escolar 2014-2015. Facultad de Medicina U.A.N.L.

Asn194Lys mutation in RVG29 peptide increases GFP transgene delivery by endocytosis to neuroblastoma and astrocyte cells

Sheila Adela Villa-Cedillo^a , Humberto Rodríguez-Rocha^a, Laura Mireya Zavala-Flores^b, Roberto Montes-de-Oca-Luna^a, Aracely García-García^a, Maria de Jesus Loera-Arias^a and Odila Saucedo-Cárdenas^{a,b}

^aDepartamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, and ^bDepartamento de Genética Molecular, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Monterrey, Mexico

Keywords

cell-penetrating peptides; DNA delivery; mutant RVG; neurodegenerative diseases; SH-SY5Y

Correspondence

Odila Saucedo-Cárdenas, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico.
E-mail: odilam@gmail.com

Received February 27, 2017

Accepted May 13, 2017

doi: 10.1111/jphp.12766

Abstract

Objectives A cell-penetrating peptide-based delivery system could target specific types of cells for therapeutic genes delivery. To increase the gene delivery efficiency into neuronal phenotype cells, we introduced an Asn194Lys mutation to RVG29 peptide derived from rabies virus glycoprotein and added a nuclear localization signal to enhance its nuclear import.

Methods Mutant RVG or wild-type RVG peptide, a karyophilic peptide (KP) and a plasmid encoding green fluorescent protein (pGL) were bound by electrostatic charges to form four different kinds of RVG complexes. Immunofluorescence was used to assess the gene transfection efficiency into astrocytes, oligodendrocyte precursor cells (OPCs), SH-SY5Y, HeLa and NIH/3T3 cells. The cellular uptake mechanism of RVG29 complexes was examined using endocytosis inhibitors.

Key findings The mRVG29 peptide has the ability to enhance the nuclear import of plasmids. The Asn194Lys mutation in RVG29 peptide of the pGL-mRVG29 complex and the addition of KP to the pGL-RVG29-KP complex increased the capacity to deliver DNA by endocytosis in astrocytes and SH-SY5Y cells.

Conclusions The complexes pGL-mRVG29 and pGL-RVG29-KP have specificity for transfecting astrocytes and SH-SY5Y cells. The karyophilic capacity of this new mRVG peptide render it promising candidate to act as gene delivery vector into the brain cells.

Introduction

Safe, specific and high gene transfection within the central nervous system (CNS) remains a major challenge for the treatment of neurodegenerative diseases. The blood–brain barrier (BBB) is one of the main obstacles to sending therapeutic molecules to the brain in neurological diseases.^[1] Lipid-soluble drugs larger than 40 Da are not able to cross the BBB.^[2] To overcome this barrier, viral and nonviral vectors have been developed to deliver therapeutic genes to the CNS.^[3]

Although viral vectors efficiently transfect cells, immunogenicity and cytotoxicity are problems that need to

be overcome. An alternative for transporting therapeutic molecules across the BBB is the use of nonviral vectors such as cell-penetrating peptides (CPPs) composed of short sequences of less than 40 amino acids. The CPPs have the ability to cross cellular membranes efficiently with low cytotoxicity and can be synthesized easily.^[4,5] However, they have low specificity and penetrate effectively into most types of cells.^[6] A peptide-based delivery system may be specific when directed towards a particular cell type for the delivery of therapeutic molecules.

The peptide HIV TAT (human immunodeficiency virus-1 trans-acting activator of transcription) is one of the most studied and used CPPs to transport



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2060
www.afmac.org.mx

Expediente: 621

México, D.F. a 28 de junio de 2017

M. en C. Odila Saucedo Cárdenas

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste
Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León

Presente

Estimada maestra Saucedo:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Revisiones Bibliográficas** intitulado:

"Terapia génica con factores neurotróficos para enfermedades neurodegenerativas"

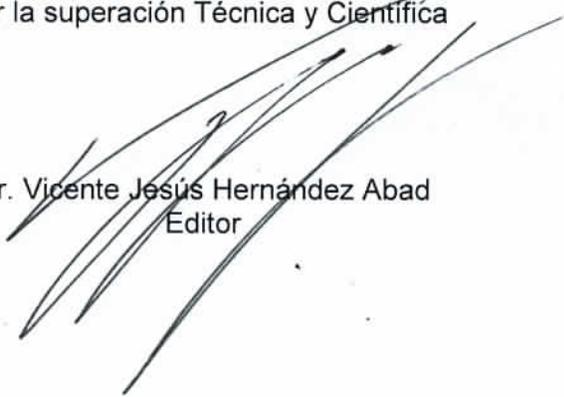
de los autores *Villa-Cedillo Sheila Adela, Saucedo-Cárdenas Odila*, ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 48, No. 3 julio-septiembre 2017.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica


Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Editor

Terapia génica con factores neurotróficos para enfermedades neurodegenerativas.

Gene therapy with neurotrophic factors for neurodegenerative diseases.

Revisión bibliográfica

Villa-Cedillo Sheila Adela², Saucedo-Cárdenas Odila^{1,2*}.

- 1 Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Departamento de Genética Molecular.
- 2 Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Histología.

Autor corresponsal:

***Odila Saucedo Cárdenas.** Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Col. Independencia, Monterrey, Nuevo León, México 64720. Telephone: (81) 8 190 40 36 Fax: (81) 8 190 40 35

E-mail address: odilam@gmail.com

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas (ENGs) están muy ligadas al inevitable proceso de envejecimiento y representan un grave problema de salud. Se caracterizan por la muerte progresiva de neuronas y aún no existe un tratamiento eficaz que detenga este proceso degenerativo. La terapia génica se perfila como una estrategia prometedora en el tratamiento de ENGs. Los factores neurotróficos desempeñan un papel muy importante en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las neuronas. Sus efectos neuroprotectores y neuroregenerativos los hacen buenos candidatos terapéuticos para las ENGs. Entre estos factores están el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), neurturina (NTN), el factor neurotrófico dopamina conservado (CDNF), y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). En esta revisión se aborda el panorama actual en terapia génica con factores neurotróficos para las ENGs más frecuentes.

Palabras Clave: Enfermedades neurodegenerativas, terapia génica, factores neurotróficos.

Mary Ann Liebert, Inc.

Copyright Transfer Agreement

Article Title: IN VITRO EVALUATION OF DAMAGE BY HEAVY METALS IN TIGHT AND GAP JUNCTIONS OF SERTOLI CELLS

Name of Author: Dr. Sheila Villa-Cedillo

Journal Name: DNA and Cell Biology

1. The Contribution

The Author(s) hereby affirm(s):

- A. The Contribution entitled "IN VITRO EVALUATION OF DAMAGE BY HEAVY METALS IN TIGHT AND GAP JUNCTIONS OF SERTOLI CELLS" is to be published in DNA and Cell Biology.
- B. Applicable Supplementary Material shall be published with Contribution in DNA and Cell Biology.

2. Obligations of the Authors(s)

The Author(s) warrant(s):

- A. Contribution and Supplementary Material is original and no part has been plagiarized, fabricated, or manipulated.
- B. All individuals identified as Authors* contributed to the Contribution, and all individuals who contributed are listed as Authors on the Contribution. [*See below for definition of "Author."]
- C. Contribution is not under consideration in another publication and has not been published elsewhere, or in any other language.
- D. Contribution and Supplementary Material contains no libelous or unlawful statements; does not infringe upon the rights (including without limitation the copyright, patent, or trademark rights) or the privacy of others; does not contain material or instructions that might cause harm or injury.
- E. If applicable, Contribution meets all ethical guidelines and/or Internal Review Board approval in the treatment of human and animal studies (see Instructions for Authors), or meets the requirements set forth by the Declaration of Helsinki.
- F. Names and all identifying features or information have been removed from the Contribution's figures, tables, text, and Supplemental Material.
- G. Obtained re-use permission for excerpts from copyrighted works owned by third parties and attribution to the sources have been included in the Contribution.
- H. Author(s) have disclosed any conflicts of interest within the Contribution as a paragraph before the reference section.
- I. All contributing Authors are aware of the rights and conditions set forth in this agreement.
- J. The Authors(s) will indemnify Mary Ann Liebert, Inc., against any costs, expenses, or damages, which may incur, or of which Mary Ann Liebert, Inc., may become liable as a result from any breach of these warranties contained herein. These representations and warranties may be extended to third parties by Mary Ann Liebert, Inc.

***Authorship is defined as:**

- **Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND**
- **Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND**
- **Final approval of the version to be published; AND**
- **Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are**