



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Efecto de Gas1 soluble recombinante en glioblastoma inducido por terapia génica no viral y  
localización de Gas1 soluble endógeno en el líquido cefalorraquídeo y plexo coroideo de la rata adulta**

TESIS

Que presenta

**M. en C. ALBERTO EDUARDO AYALA SARMIENTO**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Directores de Tesis

**Dr. José Víctor Segovia Vila**

**Dr. Daniel Martínez Fong**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**DICIEMBRE, 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada (#244983) durante la realización del proyecto doctoral

Al Instituto Carlos Slim de la Salud por la Beca Carlos Slim Excelencia. Folio: 132049797

Al Instituto de Ciencia y Tecnología (ICyT) del Distrito Federal por el apoyo al proyecto “Alcances del NTS-poliplex en la terapia génica para los tipos de cáncer que expresan el receptor NTSR1” ICyTDF 2010-2012

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo al proyecto “Neurotensin-polyplex: Tool for a novel gene therapy of nonsmall cell lung cancer”. Proyecto de Cooperación Bilateral México-Francia. Conacyt-ANR # 142947

Al Dr. José Víctor Segovia Vila

Al Dr. Daniel Martínez Fong

## **DEDICATORIAS**

A mi pequeña y nueva familia, Diana, Julieta y el nuevo invitado

A mis padres y hermanas

A mis amigos y socios académicos

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	Gas1 .....	3
<b>3.2</b>	Gas1, una proteína terapéutica .....	4
<b>3.3</b>	Gas1 soluble recombinante, una proteína con mayor efecto terapéutico.....	4
<b>3.4</b>	Cáncer .....	5
<b>3.5</b>	Gliomas .....	5
<b>3.6</b>	Patogénesis molecular del glioma .....	7
<b>3.7</b>	Neuropéptidos y sus receptores como factores de crecimiento para células cancerosas.....	8
<b>3.8</b>	Neurotensina y sus receptores .....	9
<b>3.9</b>	Receptores a neurotensina en astrocitos y astrocitomas.....	10
<b>3.10</b>	Terapia contra glioblastomas.....	10
<b>3.11</b>	Terapia génica .....	11
<b>3.12</b>	Terapia génica en cáncer .....	11
<b>3.13</b>	Vectores para terapia génica .....	12
<b>3.14</b>	NTS-poliplex .....	12
<b>3.15</b>	Gas1 soluble endógeno.....	14
<b>4</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>7</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>8</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>8.1</b>	Plásmidos .....	17
<b>8.2</b>	Líneas celulares y cultivos primarios.....	17

<b>8.3</b>	Experimentos con animales .....	17
	Extracción de ARN y RT-PCR .....	18
<b>8.4</b>	Formación de las nanopartículas del NTS-poliplex .....	19
<b>8.5</b>	Entrega de genes utilizando el NTS-poliplex.....	19
<b>8.6</b>	Expresión de Gas1 recombinante y $\beta$ -galactosidasa .....	20
<b>8.7</b>	Viabilidad celular.....	20
<b>8.8</b>	Efecto del medio condicionado con tGas1 .....	20
<b>8.9</b>	Inmunofluorescencia en células y tejido .....	21
<b>8.10</b>	Activación de ERK 1/2 .....	22
<b>8.11</b>	Western Blot .....	22
<b>8.12</b>	Obtención de fluidos corporales.....	23
<b>8.13</b>	Medición de la concentración Gas1 soluble endógeno .....	23
<b>8.14</b>	Inmunoprecipitación.....	23
<b>8.15</b>	Análisis estadístico .....	24
<b>9</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>9.1</b>	Expresión del NTSR2 y del vNTSR2 en los cultivos primarios de astrogliá y en las células de glioblastoma C6.....	25
<b>9.2</b>	Internalización del NTS-poliplex en las células C6 .....	26
<b>9.3</b>	Activación de ERK 1/2 inducida por los receptores NTSR2 y vNTSR2 en las células C6 .....	28
<b>9.4</b>	La activación de ERK 1/2 requiere de la internalización de los receptores NTSR2 y vNTSR2....	29
<b>9.5</b>	Expresión de genes mediados por el NTS-poliplex .....	30
<b>9.6</b>	Expresión y efecto de Gas1 soluble recombinante utilizando al NTS-poliplex como vector.....	31
<b>9.7</b>	La línea celular de ratón NIH/3T3 secreta dos isoformas endógenas de Gas1.....	33
<b>9.8</b>	Gas1 soluble endógeno está presente en el líquido cefalorraquídeo de la rata adulta .....	35
<b>9.9</b>	Expresión de Gas1 en el plexo coroideo .....	36
<b>9.10</b>	Expresión de Gas1 en el estroma del plexo coroideo .....	38
<b>9.11</b>	Expresión perivascular de Gas1 en el hígado de la rata adulta .....	40

<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>13</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>59</b>

## 1 RESUMEN

La proteína del arresto del crecimiento específico 1 (Gas1) puede promover proliferación y supervivencia celular en el desarrollo embrionario así como arresto y muerte celular en la etapa adulta. Estos fenómenos antagónicos se deben a que Gas1 sinergiza con Sonic hedgehog (Shh) y porque inhibe la señalización del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Gas1 se encuentra anclada a la membrana celular externa por un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI), pero también se pueden producir versiones solubles de la proteína que actúan de manera autocrina y paracrina. Las primeras formas solubles de Gas1 se produjeron por ingeniería genética al escindir la secuencia de anclaje a GPI, lo que promovió su secreción al espacio extracelular. Una de estas formas solubles recombinantes demostró un eficaz efecto antitumoral en modelos de terapia génica viral. Posteriormente se demostró que las células mesangiales del riñón expresan y liberan Gas1 soluble de manera endógena en la orina. Con base en estos antecedentes, se decidió evaluar el efecto de Gas1 soluble recombinante en células de glioblastoma por medio de terapia génica no viral y localizar a Gas1 soluble endógeno en los fluidos corporales de la rata adulta. Para el primer objetivo, se utilizó el poliplex de neurotensina (NTS-poliplex), un vector no viral, que transfiere genes vía la endocitosis del receptor a NTS tipo 1 (NTSR1). Interesantemente, en el caso de células de glioblastoma, la transferencia génica por el NTS-poliplex se llevó a cabo de manera específica a través de la endocitosis de los receptores a NTS tipo II (NTSR2/vNTSR2), fenómeno que no sucede en células astrogliales sanas. La transfección de Gas1 soluble recombinante por el NTS-poliplex disminuyó la viabilidad celular tanto en el cultivo productor como en el cultivo receptor de glioblastoma. Estos resultados apoyan al sistema no viral NTS-poliplex-Gas1 soluble como una nueva terapia para glioblastomas. En el segundo objetivo, demostramos por primera vez la presencia de Gas1 soluble endógeno en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de la rata adulta y su expresión en el plexo coroideo, el principal productor de LCR. Estos resultados sugieren que Gas1 soluble, presente en el LCR, realiza una acción fisiológica en el sistema nervioso central vía el sistema glinfático. En conjunto, nuestros resultados demuestran la relevancia de Gas1 soluble ya sea el recombinante para utilizarse en diversos modelos de terapia génica contra el cáncer o el endógeno para ejercer un rol fisiológico en el sistema nervioso central, función que queda para aclararse en estudios futuros.

## 2 ABSTRACT

The growth arrest specific 1 (Gas1) protein promotes proliferation and cell survival during embryonic development as well as arrest and cell death in adulthood. These antagonistic phenomena result from the dual effect of Gas1, which synergizes with Sonic hedgehog (Shh) and inhibits glial-derived neurotrophic factor (GDNF) signaling. Gas1 is localized anchored to the outer cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol residue (GPI), but soluble versions of this protein can also be produced to act in autocrine and paracrine manner. The first soluble forms of Gas1 were engineered by cleaving the GPI anchor sequence, which promoted its secretion to the extracellular space. One of those recombinant forms showed an effective antitumor effect in viral gene therapy models. Later on, it was shown that kidney mesangial cells produce endogenous soluble Gas1 and release it to urine. Based on these antecedents, we decided to evaluate the effect of recombinant soluble Gas1 in glioblastoma cells by using nonviral gene therapy and determine the location of endogenous soluble Gas1 in body fluids of the adult rat. For the first objective, the neurotensin-polyplex (NTS-polyplex), a non-viral vector that transfers genes via NTS receptor type 1 (NTSR1) endocytosis, was used. Interestingly, in the case of glioblastoma cells, NTS-polyplex-mediated gene transfer was specifically carried out via NTS receptors type II (NTSR2 / vNTSR2) endocytosis, phenomenon that does not occur in healthy astroglial cells. Transfection of recombinant soluble Gas1 by NTS-polyplex significantly decreased cell viability in both the producer culture and the receiver glioblastoma culture. These results support the nonviral system NTS-polyplex-soluble Gas1 as a new therapy for glioblastomas. In the second objective, we demonstrate for the first time the presence of endogenous soluble Gas1 in the cerebrospinal fluid (CSF) of the adult rat and its expression in the choroid plexus, the major producer of CSF. These results suggest that soluble Gas1 is present in CSF and plays a physiological role in the central nervous system (CNS) through the glymphatic system. Taken together, our results demonstrate the relevance of soluble Gas1 either the recombinant form for its use in various models of cancer gene therapy or the endogenous one to exert a physiological role in the CNS, function that remains to be elucidated by future studies.

### 3 ANTECEDENTES

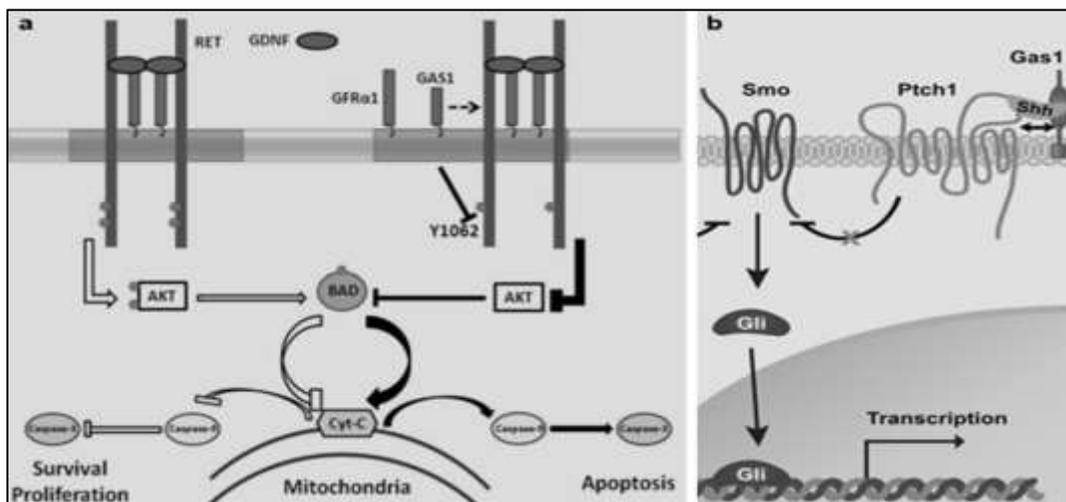
#### 3.1 Gas1

La proteína del arresto del crecimiento específico 1 o Gas1 (Growth Arrest Specific 1), es una proteína de 345 aminoácidos, con peso molecular de 37 kDa, N-glicosilada y que se ancla a la membrana celular externa por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) [6]. El gen se aisló de fibroblastos que entran en la etapa G0 del ciclo celular cuando se les retiran los factores de crecimiento [7], el gen carece de intrones y contiene un solo exón [8]. La proteína tiene un dominio N-terminal hidrofóbico, donde hay una secuencia señal que es requerida para guiar a Gas1 al retículo endoplasmático (R.E.) donde es cortada y glicosilada. En su extremo C-terminal hidrofóbico Gas1 tiene una secuencia consenso donde se une el GPI (glicosilfosfatidilinositol) [6]. Se ha reportado que Gas1 es estructuralmente similar a la familia de receptores del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF por sus siglas en inglés), a estos receptores se les denomina GFR $\alpha$ s. Cabe mencionar que la señalización llevada a cabo por la familia de ligandos de GDNF (GFLs por sus siglas en inglés) y sus receptores está asociada principalmente a la sobrevivencia y mantenimiento de las neuronas [9].

Gas1 se expresa en varios tejidos durante el desarrollo como son músculo esquelético, hígado, corazón y en algunas zonas del SNC (cerebelo, hipocampo, entre otras) [10, 11]. Se le considera una proteína pleiotrópica ya que ha mostrado tener diferentes funciones en distintos escenarios, por ejemplo durante la embriogénesis su expresión ha sido asociada a proliferación celular [5, 12] mientras que en el adulto y en tumores se le ha asociado a arresto y muerte celular [13-15].

Se han realizado estudios con el fin de elucidar las vías de señalización en las que participa Gas1 para comprender mejor su acción pleiotrópica. Gas1 se asocia con la inhibición de la señalización llevada a cabo por los GFLs y sus receptores GFR $\alpha$ , por lo que se propone que por su similitud a los GFR $\alpha$ , Gas1 puede antagonizar el efecto mediado por los GFLs [4, 9, 16, 17], figura 1 a.

Otra vía en la que se involucra a Gas1 es la vía mediada por Sonic hedgehog (Shh), que es una proteína que se secreta y se une a su receptor Patched (Patch) y de esta forma activa a Smoothen (Smo), un receptor acoplado a proteína G. Así se modula una cascada de señalización que activa a la familia del factor de transcripción Gli y por ende la regulación de genes relacionados al desarrollo embrionario [18], figura 1 b. Shh es esencial para el desarrollo del sistema nervioso central y se le asocia con el origen y progresión de diferentes tumores [10]. Primero se observó que Gas1 se puede unir a Shh y que la interacción entre ambos produce un efecto antagónico [19]. Contrariamente, trabajos recientes indican que hay un efecto cooperativo entre estas 2 moléculas en el desarrollo embrionario [18, 20].



**Figura 1.** Esquemas de mecanismos moleculares de acción de Gas1. (a) Gas1 y la vía de señalización GDNF/GFR $\alpha$ 1. En ausencia de Gas1 (lado izquierdo) el GDNF se une a su receptor GFR $\alpha$ 1 que a su vez fosforila y activa a RET lo que conlleva a la activación de AKT que luego fosforila a Bad impidiendo que se libere el citocromo-c y por ende que no se activen las caspasas. En presencia de Gas1 (lado derecho) se inhibe la fosforilación de RET en la tirosina 1062 (Y1062) promoviendo que el citocromo-c se libere de la mitocondria y se activen las caspasas, promoviendo apoptosis. (b) Gas1 y la vía de señalización de Shh. En ausencia de Shh, Ptch1 (receptor de Shh) inhibe constitutivamente a Smo pero una vez que Shh se une a Ptch1 se inhibe el efecto inhibitorio que se tenía sobre Smo y se inicia una cascada de señalización que culmina en la activación del factor de transcripción Gli el cual promueve transcripción de genes relacionados con proliferación y supervivencia celular. Gas1 se puede unir a Shh y así aumentar la señalización de esta vía. Imágenes modificadas de Zarco N. [4] y de Izzi L [5]

### 3.2 Gas1, una proteína terapéutica

Se ha demostrado que la sobreexpresión de Gas1 suprime la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y de fibrosarcomas [21], además, se ha visto que promueve apoptosis y arresto celular en modelos de gliomas murinos y en cultivos primarios de gliomas humanos [22-25]. Estos estudios demuestran que Gas1 es una proteína con potencial terapéutico contra el cáncer.

### 3.3 Gas1 soluble recombinante, una proteína con mayor efecto terapéutico

Una de las estrategias para obtener una distribución más completa y homogénea del agente terapéutico es usar moléculas solubles que pueden ser liberadas por las células que expresen el transgén [26] y de esta forma poder difundir en el tumor, mejorando el efecto del tratamiento. Cuando se modificó a Gas1

por ingeniería genética en su dominio C-terminal para que no se anclará a la membrana celular se comprobó que la proteína se puede secretar y seguir manteniendo su funcionalidad [27].

En 2011 se comprobó que la forma soluble de Gas1 recombinante (tGas1) promueve arresto celular y apoptosis en la línea celular de glioma C6, tanto en las células donde se transfectó directamente a tGas1 (cultivo productor) como en las células a las cuales se les transfirió el medio condicionado con tGas1 (cultivo receptor). Se observó *in vivo* que los tumores que recibieron tratamiento de tGas1 tenían una reducción en el tamaño de la masa celular, demostrando que Gas1 soluble es una mejor opción para una terapia contra gliomas [14].

### 3.4 Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades con mayor impacto en el mundo, en el 2007 se le atribuyeron 7.9 millones de muertes, lo que representa un 13% del total de las defunciones. Para el 2030 se estima un incremento del 45% [28]. El cáncer empieza cuando el número de células incrementa fuera de lo normal [29]. Estas células forman tumores, aquellos tumores que crecen sin invadir tejidos adyacentes se les ha clasificado como benignos y los que invaden tejidos adyacentes y dan lugar a metástasis se les ha denominado tumores malignos. La mayoría de los tumores se originan a partir de tejido epitelial, denominados carcinomas [30]. El resto de tumores se originan de tejidos no epiteliales. Estos han sido clasificados en 3 grupos [30]:

- 1) Los que se originan de tejido conectivo, el cual tiene origen del mesodermo. También denominados sarcomas.
- 2) Aquellos que se originan de tejidos hematopoyéticos. Ejemplo: linfomas.
- 3) Los que se originan de aquellas células que forman varios componentes del sistema nervioso central y periférico. Comúnmente denominados tumores neuroectodermales. Ejemplo: gliomas.

### 3.5 Gliomas

Los gliomas son tumores del sistema nervioso central (SNC) que surgen de células derivadas de la glía. El sistema nervioso tiene 2 tipos de células: las neuronas y las gliales. Las células gliales pueden ser clasificadas en 3 tipos: astrocitos, oligodendrocitos y microglía [31]. Los diferentes tipos de tumores de origen neuroepitelial han sido clasificados de acuerdo a los tipos celulares predominantes dentro de la masa tumoral (Tabla 1) o por las modificaciones moleculares que presentan (Tabla 2). Por ejemplo, los

astrocitomas están compuestos principalmente por células derivadas de astrocitos, el oligodendroglioma por células derivadas de oligodendrocitos, entre otros mostrados en la tabla 1. Para la clasificación molecular se considera que los gliomas tipo 1 y tipo 2 tienen mutaciones en el gen que codifica para la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH 1/2), el glioma tipo 1 tiene un buen pronóstico mientras que el glioma tipo 2 tiene un pronóstico intermedio; el glioma tipo 3 no tiene mutaciones en IDH 1/2 y es el que tiene el peor pronóstico (Tabla 2) [32, 33].

Los gliomas han recibido una graduación, en una escala del 1 al 4, según su malignidad. Los tumores de grado 1 son benignos y pueden ser removidos quirúrgicamente; los de grado 2 son tumores de bajo grado de malignidad pero no son curables solo por cirugía; los de grado 3 son tumores malignos y conllevan a la muerte del individuo en pocos años y los de grado 4 son altamente malignos, usualmente resistentes a quimioterapia y radioterapia, además que son letales en un periodo de 9 a 12 meses [34].

Tabla 1. Clasificación de tumores cerebrales de acuerdo a la OMS (modificada de Vescovi [35])	
<p>Tumor Astrocítico</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Astrocitoma pilocítico (grado 1)</li> <li>• Astrocitoma difuso (grado 2)</li> <li>• Astrocitoma anaplásico (grado 3)</li> <li>• Glioblastoma (grado 4)</li> </ul> <p>Tumor oligodendrial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligodendroglioma</li> </ul> <p>Glioma mixto</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligoastrocitoma</li> </ul>	<p>Tumor ependimal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ependimoma</li> </ul> <p>Tumor mixto y neuronal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gangliocitoma</li> </ul> <p>Tumor glial/neuronal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor neuroepitelial disembrionario</li> <li>• Ganglioglioma</li> </ul>

Tabla 2. Clasificación molecular de gliomas (modificada de Wen y Reardon[36])				
Glioma	Marcador	Mutaciones Adicionales	Clasificación Histológica	Pronóstico
Tipo I	Mutaciones en IDH 1/2 (80%)	TERT, CIC, FUBP1, NOTCH 1	Oligoastrocitoma	Bueno
Tipo II	Mutaciones en IDH 1/2 (80%)	TP53, ATRX	Astrocitoma	Intermedio
Tipo III	Ausencia de mutaciones en IDH 1/2 (20%)	TERT, EGFR, CDKN2A, MDM4, PTEN, NF1	Glioblastoma	Malo

Los astrocitomas son la forma más común de neoplasias primarias del SNC [37]. Dentro de los astrocitomas el glioblastoma representa aproximadamente el 54% de todos los gliomas [38] y tiene la mayor frecuencia de diagnóstico de tumores cerebrales primarios, con una incidencia de 3 a 4 casos por cada 100,000 habitantes [38]. Los glioblastomas primarios que ocurren *de novo* (ejemplo: sin evidencia de un precursor menos maligno) son la mayoría (>90%) de los casos. Los glioblastomas secundarios que aparecen tras la progresión de un astrocitoma de menor grado son generalmente más frecuentes en pacientes jóvenes [39].

Los tumores primarios del SNC ocupan el séptimo lugar de incidencia en cáncer en México, siendo el glioblastoma el más frecuente y mortal [40]. El glioblastoma es altamente agresivo y el más maligno de todos los gliomas, asociándolo a una supervivencia muy baja [41]. Las características típicas de la enfermedad incluyen proliferación celular, tendencia a necrosis, angiogénesis significativa, resistencia a apoptosis y una amplia alteración genómica [42].

### 3.6 Patogénesis molecular del glioma

El cáncer se produce por series de mutaciones genéticas y/o modificaciones epigenéticas que ocurren en pocas o incluso en una sola célula fundadora. Ahora se sabe que la desregulación de la expresión de oncogenes, protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores favorece la transformación maligna de células normales [40, 43]. Eventualmente estas células adquieren un potencial ilimitado e incontrolable de proliferación [44]. Dos modelos hipotéticos podrían explicar este fenómeno, el primero

es el modelo estocástico y el segundo el jerárquico. En el modelo estocástico se propone que todas las células en un tumor tienen un potencial tumorigénico similar, en el cual su activación es desincronizada y con menor frecuencia en ciertas células [45]. Por otro lado, en el modelo jerárquico se propone que solo un pequeño subconjunto de células dentro del tumor tienen capacidad significativa de proliferación y la particular habilidad de generar nuevos tumores y que el resto de las células del tumor son células en diferenciación o totalmente diferenciadas [45]. El modelo jerárquico se ajusta con la teoría de las células troncales cancerígenas que actualmente está apoyada por una plétora de observaciones [35].

Actualmente hay un debate sobre el origen de las células neurales troncales cancerígenas. Por una parte se propone que las propias células troncales neurales pueden acarrear ciertas mutaciones que les provoquen un proceso de transformación hacia la gliomagénesis y por otro lado se propone que las mutaciones genéticas promueven desdiferenciación de células maduras como astrocitos u oligodendrocitos y las convierten a un estado mucho más inmaduro con propiedades similares a una célula troncal [34].

Se han documentado varias vías de señalización implicadas en la gliomagénesis, las cuales están involucradas en generar cambios en el ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento, la sobrevivencia y la migración [34, 35, 37, 46, 47]. Algunas de las principales vías afectadas son las mediadas por p53 [48], EGFR [34, 35], el receptor Notch [48], PTEN [49] y Wnt- $\beta$ catenina [50], entre otras.

### **3.7 Neuropéptidos y sus receptores como factores de crecimiento para células cancerosas**

Los neuropéptidos son mensajeros moleculares que regulan múltiples funciones en el SNC y en la periferia por medio de receptores en las células blanco, la mayoría de los cuales están acoplados a proteínas G. La unión de estos neuropéptidos con sus receptores dispara la activación de diferentes vías de señalización que se ven involucradas en distintos procesos celulares [43]. A estos péptidos se les considera factores de crecimiento potentes en células normales y además participan en la estimulación autocrina y paracrina favoreciendo la proliferación y migración de células tumorales [51]. Algunos neuropéptidos como la bombesina, la sustancia P y la neurotensina tienen la capacidad de modificar el comportamiento biológico de astrocitomas [51, 52].

### 3.8 Neurotensina y sus receptores

La neurotensina (NTS) es un neuropéptido de 13 aminoácidos que se descubrió en 1973 en el hipotálamo de ternero [53]. Este neuropéptido está ampliamente distribuido tanto en el SNC como en el periférico [52, 54]. Se le ha descrito una función dual como neuromodulador en el SNC y como de hormona en la periferia [55]. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de la neurotensina en el cerebro y en los órganos periféricos han sido abundantemente documentadas. Entre los efectos generales con los que se relaciona a la neurotensina se encuentran: actuar como neuromodulador de la transmisión dopaminérgica, ejercer potentes efectos analgésicos y producir hipotermia [56, 57]. En la periferia, la NTS actúa como modulador paracrino y endocrino del tracto digestivo y del sistema cardiovascular [55]. Después de que se demostrara que la neurotensina inducía crecimiento en tejidos normales, se propuso su participación en el crecimiento de tumores benignos [58]. Este efecto se extendió a células cancerosas de diferentes orígenes como son: páncreas, colon y próstata [59]. Dentro de los tumores del SNC se ha visto que la neurotensina participa en la proliferación celular de astrocitomas [60] y recientemente se ha implicado en la migración de células de glioblastoma [52].

La actividad de la NTS es mediada por sus receptores específicos (NTSR por sus siglas en inglés). Actualmente se conocen 4 tipos de receptores a NTS: el NTSR1 y NTSR2 de alta y baja afinidad respectivamente que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs por sus siglas en inglés), mientras que el NTSR3 (sortilina/gp95) y el NTSR 4 (sorLA/LR11) no están acoplados a proteínas G y sólo tienen un dominio transmembranal [61, 62]. Estos últimos dos receptores se localizan en el sistema nervioso y tejido adiposo, pero su papel fisiológico no es claro aún [62]. En el SNC y en la periferia, la mayoría de los efectos conocidos de la NTS son mediados a través del receptor a neurotensina de alta afinidad o NTSR1, el cual es endocitado por la vía de la clatrina después de la estimulación por su agonista [63]. Se presume que el efecto carcinogénico mediado por la neurotensina se debe a la expresión anormal del NTSR1 [64]. La contribución del complejo NTS/NTSR1 en la estimulación del crecimiento tumoral ha sido reportado en varios estudios [65-67]. Datos clínicos han sido esenciales para identificar la expresión del NTSR1 como un marcador de mal pronóstico en células cancerígenas de mama, pulmón y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [58], además el "Cancer Gene Anatomy Project" considera al NTSR1 como un marcador de tumores cancerosos primarios [68]. En cambio, la sobreexpresión del receptor a neurotensina de baja afinidad o NTSR2 en células cancerígenas se ha reportado solo una vez [69], pero poco o nada se sabe de su rol en la biología del cáncer.

Además de la importancia en la biología del cáncer, el NTSR1 es importante desde el punto de vista tecnológico debido a su propiedad de endocitarse al ser activado por su ligando la NTS, la cual es

aprovechada para realizar transferencia de genes terapéuticos en modelos animales de enfermedades cancerosas [43, 70]. Esta propiedad biotecnológica se utilizó para la realización de esta tesis como se abordará más adelante.

### **3.9** Receptores a neurotensina en astrocitos y astrocitomas

Estudios autoradiográficos y electrofisiológicos evidenciaron que los astrocitos en cultivos de explantes de varias zonas del SNC de rata expresan receptores a neurotensina [71]. Años más tarde se identificaron por microscopía electrónica sitios de unión a neurotensina y se caracterizaron los receptores de alta afinidad a NTS (NTSR1) principalmente en neuronas [72]. En el 2000 se demostró que la neurotensina regulaba el calcio intracelular en astrocitos a través de receptores funcionales a neurotensina, y por medio de ensayos farmacológicos se concluyó que el efecto era mediado por el NTSR1 [73]. También hay reportes que demuestran la expresión del receptor de baja afinidad a NTS (NTSR2) en astrocitos e incluso se afirma que es más común encontrar la expresión del NTSR2 que el NTSR1 en este tipo celular [74, 75]. Los reportes respecto a la expresión de NTSR1 en astrocitomas son escasos. En 1999 se detectó al NTSR1 en el 43% de astrocitomas resecados quirúrgicamente de pacientes [76]. Recientemente se observó que la neurotensina es capaz de participar en la migración celular de la línea U373 de glioblastoma, además que se detectó el ARN mensajero del NTSR1 [52]. La evidencia sugiere que el complejo NTS/NTSR1 participa al menos en la regulación intracelular de calcio en astrocitos y favorece la proliferación y la migración de los astrocitomas. No hay reportes que indiquen la participación del NTSR2 en la progresión de los astrocitomas.

### **3.10** Terapia contra glioblastomas

Los tratamientos actuales contra glioblastomas incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, aunque se han hecho algunos avances en años recientes los tratamientos siguen siendo paliativos para la mayoría de los pacientes al no existir aún una cura [41].

El tratamiento estándar para pacientes con un diagnóstico de glioblastoma consiste en la resección quirúrgica de la masa tumoral, 6 semanas de radioterapia post cirugía junto con quimioterapia con el agente alquilante temozolamida y enseguida 6 meses más de tratamiento exclusivo con temozolamida [38, 77].

Actualmente se están desarrollando y probando fármacos que actúan sobre algunas proteínas específicas que participan en vías de señalización de glioblastomas, principalmente contra receptores que favorecen ya sea angiogénesis, migración o proliferación celular del tumor [38]. Aunado a estos avances, la terapia génica ha surgido como alternativa para tratar enfermedades como el cáncer.

### 3.11 Terapia génica

La terapia génica se define como la transferencia de material genético a células con el fin de tratar enfermedades, incluyendo el cáncer [78, 79]. El material genético puede ser transferido por medio de un vector, el cual es el vehículo usado para entregar la secuencia genética de interés a la célula [40, 80]. Los principales vectores utilizados se agrupan en 2 tipos: los métodos fisicoquímicos (no virales) y los virales. Al final de la transferencia génica, lo que se busca es modular la expresión de determinadas proteínas que están alteradas o expresar proteínas con un efecto terapéutico conocido [81]. La transferencia de material genético dentro de las células puede ser *in vivo* (cuando el gen es introducido directamente a las células del paciente) o *ex vivo* (cuando el tejido es removido, manipulado *in vitro* con el material genético y las células son reintroducidas al paciente) [80]. Al principio la terapia génica fue concebida como un tratamiento contra enfermedades monogénicas, que son causadas por la mutación de un sólo gen [82]. Sin embargo en la actualidad el 64% de los protocolos de terapia génica pertenecen a tratamientos contra el cáncer [83].

### 3.12 Terapia génica en cáncer

El enfoque que se tiene de la terapia génica contra el cáncer varía respecto a las enfermedades monogénicas, ya que no se trata de modificar un solo defecto genético, la estrategia general que se utiliza en cáncer es la de manipular genéticamente a las células para concederles nuevas propiedades contra la patología oncológica [40]. En la actualidad ya se han desarrollado diferentes estrategias de terapia génica contra el cáncer[80], como:

- Adicionar o restaurar genes supresores de tumores
- Eliminar el protooncogén defectuoso o proteínas estimuladoras de crecimiento tumoral
- Inducir un incremento en la inmunogenicidad de células tumorales
- Inducción de proteínas proapoptóticas

### 3.13 Vectores para terapia génica

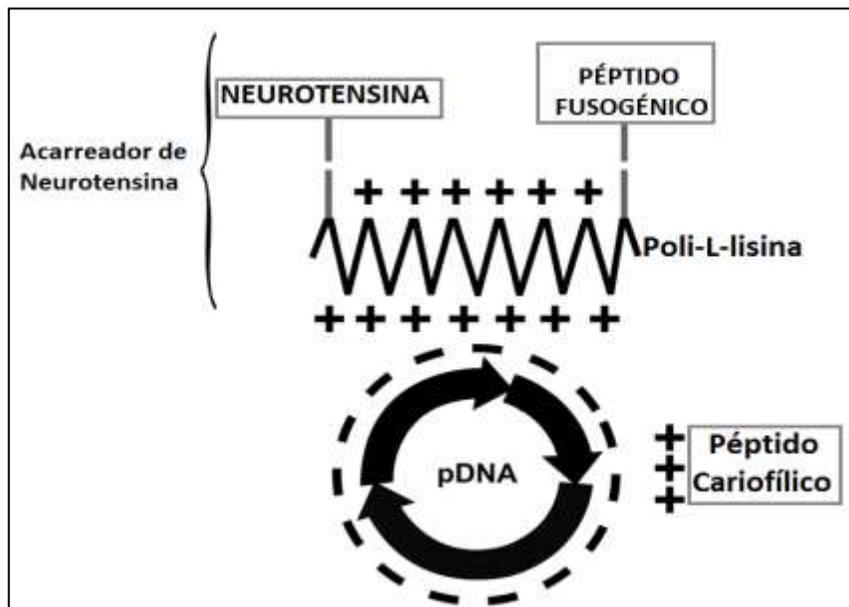
En la terapia génica contra el cáncer se emplean vectores virales y no virales [84]. Los virus son estructuras que han evolucionado durante millones de años para introducir su material genético en las células que infectan, es por eso que constituyen sistemas muy eficaces para transferir genes, ya que son capaces de infectar una proporción elevada de células diana [85]. Los vectores virales son actualmente los más utilizados en terapia génica contra el cáncer, los más empleados son: adenovirus, retrovirus, virus del herpes simple y adeno-asociados [80]. Pero aunque los vectores virales han mostrado ser muy eficientes para transfectar genes, su uso en la clínica se encuentra aún limitado debido a su toxicidad e inmunogenicidad, una regulación complicada y su gran costo de producción a gran escala [86].

En el caso de vectores no virales, se han incorporado diversas tecnologías para mimetizar la capacidad de los virus para transferir genes. La baja toxicidad e inmunogenicidad, falta de patogenicidad, el no haber un límite en cuanto al tamaño de ADN que pueden transferir, su sencillez de preparar y de fácil producción hacen a los vectores no virales una alternativa atractiva respecto a los virus [87]. Se han clasificado a los vectores no virales en los siguientes grupos:

1. ADN desnudo, acarreador: no tiene
2. Lipoplex, acarreador: Lípido catiónico
3. Poliplex, acarreador: Polímero catiónico

### 3.14 NTS-poliplex

El poliplex de neurotensina (NTS-poliplex) es un sistema específico de transferencia de genes a células que expresan e internalizan el NTSR1. Este sistema no viral consiste de una cadena de poli-L-lisina, NTS, un péptido fusogénico (PF), un péptido cariofílico (PK) y un plásmido que contiene la secuencia codificante de la proteína de interés (transgén) [70]. En la figura 2, se esquematiza la constitución del NTS-poliplex. La NTS y el PF se unen a la poli-L-lisina de manera covalente mediante una reacción química, a esta fusión de 3 componentes se le denomina acarreador de neurotensina. El ADN plasmídico se une electrostáticamente al acarreador de neurotensina y de igual manera el PK se une al plásmido.



**Figura 2.** Representación esquemática de la conformación del NTS-poliplex.  
Imagen modificada de Martínez-Fong D [3]

La descripción de los componentes del NTS-poliplex son los siguientes:

**NTS:** Es una molécula de dirección que promueve la internalización del NTS-poliplex por medio de su receptor de alta afinidad NTSR1 (receptor que según la evidencia está presente en la mayoría de tumores malignos)[74, 88].

**Poli-L-lisina:** Es un polímero formado por la conjugación de varios repetidos de lisina, lo que le da la propiedad de ser un polication [89] con capacidad para unirse al ADN electrostáticamente.

**PF:** Es un péptido de 22 aminoácidos que se obtiene del N-terminal de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza, el cual es sensible al cambio del pH de los endosomas lo que le permite al NTS-poliplex fusionarse a la bicapa lipídica y escapar del endosoma [90].

**PK:** Es un péptido de 21 aminoácidos que se obtiene de la proteína Vp1 de la cápside del virus 40 vacuolado del simio (SV40), este péptido contiene una señal de localización nuclear [91], que favorece que el material genético sea transportado al núcleo.

Se ha comprobado que el NTS-poliplex tiene la capacidad de transfectar células cancerosas que expresan e internalizan el NTSR1 tanto en modelos *in vitro* [90] como *in vivo* [92], además se ha demostrado que puede transfectar genes reporteros y terapéuticos a través del torrente sanguíneo en un modelo murino de neuroblastoma [70]. Esta propiedad del NTS-poliplex es lo que determina su utilización en este proyecto pues una de las perspectivas de este trabajo es la de desarrollar modelos de terapia génica no viral alternos a los realizados con tGas1 y vectores virales.

### 3.15 Gas1 soluble endógeno

Una característica común de las proteínas ancladas por GPI es que éstas se pueden encontrar en la naturaleza tanto unidas a la célula como también en el espacio extracelular de forma soluble [93, 94]. Las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) son las encargadas de liberar a las proteínas ancladas por GPI debido a que realizan un corte en el grupo fosfato de la cadena del fosfatidilinositol (PI) [94, 95]. En el caso de Gas1 solo existe un reporte que describe una forma soluble endógena que es secretada por las células mesangiales del riñón la cual mantiene sus propiedades biológicas de promover arresto celular. En ese mismo trabajo se reporta la presencia de Gas1 soluble tanto en el suero sanguíneo como en la orina de la rata adulta [96], pero las funciones que Gas1 lleva a cabo en estos fluidos corporales aún no se ha podido dilucidar y se desconoce si Gas1 se encuentra en otros fluidos corporales.

#### 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gas1 es una proteína anclada a la membrana celular que puede promover tanto proliferación celular en el desarrollo embrionario como arresto celular en el adulto. Esta última característica promueve el que Gas1 sea empleada como una proteína terapéutica contra el cáncer. Además, se ha demostrado que se pueden producir formas solubles funcionales de la proteína ya sea por ingeniería genética (recombinante) o de forma natural (endógena).

En el caso de Gas1 soluble recombinante se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre glioblastomas en modelos de terapia génica viral. Los glioblastomas son los tumores primarios más frecuentes del SCN los cuales son muy agresivos y con un mal pronóstico. En la terapia génica viral los vectores utilizados son virus los cuales son muy eficientes para transfectar, pero tienen ciertas desventajas (toxicidad, regulación, producción costosa a gran escala, etc.) que ha conllevado a que se desarrollen vectores alternativos no virales.

El NTS-poliplex es un vector no viral que puede transferir genes a células cancerígenas que expresan e internalizan el NTSR1 y hay evidencia que sugiere la expresión de dicho receptor en células de glioblastoma.

Por los antecedentes mencionados se plantea utilizar el NTS-poliplex con la secuencia que codifica para el fragmento soluble de Gas1 recombinante como un primer abordaje de terapia génica antitumoral no viral *in vitro*.

Por otro lado se sabe de la presencia de Gas1 soluble endógeno en la orina y suero sanguíneo de la rata adulta, pero se desconoce su función y la presencia de dicha proteína en otros fluidos corporales. Debido a esto, es de interés analizar la presencia de Gas1 soluble en otros fluidos corporales de la rata adulta, como el líquido cefalorraquídeo y buscar su fuente productora como un primer intento de entender la función de Gas1 soluble en el SNC.

## 5 HIPÓTESIS

- Las células de glioblastoma expresan e internalizan a los receptores de neurotensina por lo que pueden ser transfectadas con el NTS-poliplex y la secuencia que codifica para Gas1 soluble recombinante.
- Gas1 soluble endógeno está presente en el líquido cefalorraquídeo y la fuente productora es el plexo coroideo de la rata adulta.

## 6 OBJETIVO GENERAL

Crear nuevas formas de transfección de Gas1 soluble recombinante en modelos de terapia génica no viral y generar nuevo conocimiento sobre la localización de Gas1 soluble endógeno en fluidos del SNC.

## 7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia e internalización de los receptores a neurotensina
- Demostrar la funcionalidad del NTS-poliplex en la transferencia génica a través de genes reporteros en células de glioblastoma.
- Transfectar y evaluar el efecto de Gas1 soluble recombinante en células de glioblastoma utilizando al NTS-poliplex como vector no viral.
- Observar en un modelo *in vitro* la expresión y liberación de Gas1 soluble endógeno.
- Demostrar la presencia de Gas1 soluble endógeno en el LCR de la rata adulta.
- Determinar el patrón de expresión de Gas1 en plexo coroideo, el principal productor del LCR.

## **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Plásmidos**

Se emplearon los siguientes plásmidos: El pEGFP-N1 (4.7 kpb) que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés; Clontech), el pLenti6.3/V5-GW/lacZ (10.8 kpb) que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa (Invitrogen) y el pLenti6.3/TO/V5- tGas1 (8.7 kpb) que codifica para tGas1 de humano, este fue previamente desarrollado en el laboratorio [97].

### **8.2 Líneas celulares y cultivos primarios**

La línea celular C6 de glioblastoma de rata y la línea CHO/K1 de ovario de hámster se cultivaron con el medio DMEM F-12K; la línea celular de neuroblastoma de ratón N1E-115 se cultivaron con el medio DMEM HG sin piruvato de sodio; los cultivos primarios de astrogliá de rata y la línea celular de fibroblastos de ratón NIH/3T3 se cultivaron con el medio DMEM HG. Los medios de cultivos se suplementaron con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico/antimicótico. En el caso de la línea celular NIH/3T3 se les retiró el medio cuando éstas alcanzaron una confluencia del 70-80% y eventualmente se les agregó medio fresco bajo en suero (0.5%) o bien se les retiró el medio cuando éstas alcanzaron una confluencia del 100% y posteriormente se les agregó medio fresco (10% suero) con un tiempo de incubación de 72 horas, ambas condiciones se utilizaron como control positivo para la expresión de Gas1. Como control negativo se decidió retirar el medio cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 20-30% para agregarles medio fresco alto en suero (30%) con un tiempo de incubación de 6 horas. Todos los medios y suplementos fueron obtenidos de Gibco. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, en una atmosfera con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, con una humedad relativa del 95%.

### **8.3 Experimentos con animales**

Todos los procedimientos en animales se realizaron de acuerdo a la actual legislación mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los institutos nacionales de salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) y por las pautas internas del CINVESTAV. Se utilizaron ratas Wistar de edades comprendidas desde los días posnatales 0, 2, 7 (P0, P2, P7) hasta adultas (210-230 g). Las ratas se anestesiaron y sacrificaron por decapitación, los cerebros

e hígados se removieron inmediatamente y las diferentes regiones se disecaron y seccionaron, en un plato de vidrio frío bajo la guía de un microscopio, para su posterior análisis por PCR, western blot y ELISA. Los cultivos primarios enriquecidos de astrogía se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de ratas de 2 días de nacidas y se prepararon como se describió previamente [98]: se expuso la masa cerebral y se removieron las meninges para obtener las cortezas cerebrales las cuales se seccionaron y cortaron en piezas pequeñas para después depositarlas en 4 mL de medio DMEM HG para su posterior digestión con 1.25 mg/mL de tripsina (Invitrogen) durante 10 minutos. Después, el medio se reemplazó por medio fresco y las células se disgregaron suavemente con una punta de pipeta de 5 mL. La suspensión celular se filtró por un colador de nylon con poros de 40  $\mu$ m (BD Biosciences) para después ser sembradas en cajas Petri cubiertas con 10mg/mL de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron sembradas en medio DMEM HG suplementado en la mismas condiciones que las líneas celulares. Para los ensayos de inmunofluorescencia, se disecaron los cerebros de las ratas P0 y P7 y se incubaron en paraformaldehído (PFA) 4% toda la noche. A las ratas adultas se les inyectó una sobredosis de pentobarbital (80 mg/kg) y posteriormente se perfundieron intracardialmente con solución salina y PFA 4%. El cerebro y el hígado se incubaron con PFA durante 24 horas y se mantuvieron en sacarosa al 20% a 4°C.

#### Extracción de ARN y RT-PCR

El ARN total de las células o del tejido se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen). En resumen, 5  $\mu$ g de ARN total se trató con ADNasa I (Biolabs) para ser transcrito en reversa con la enzima reverso transcriptasa SuperScriptII (Invitrogen) utilizando un oligo específico para el NTSR1 (5'GCTGACGTAGAAGAG3') o 50 pmol de oligo dT, después se amplificaron 2 $\mu$ l de ADNc por PCR. Se utilizaron seis pares de oligos sentido y antisentido. El primer par (5'GCTGACGTAGAAGAG3' y 5'GGCAGCCAGCAGACCACAAA3') permitió la amplificación del fragmento de ADNc del NTSR1 con un tamaño predicho de 620 pb. El segundo par (5'GAGCTGTGCGCCTACGCCAC3' y 5'GGCATGGTACGGCAGCCA3') permitió la amplificación de dos fragmentos de ADNc con tamaños predichos de 600 pb para el NTSR2 y de 418 pb para la isoforma corta de dicho receptor (vNTSR2). El tercer par (5'CAGCTCCTGGAGTCTGTGCT3' y 5'GAGTATGT AGGGTCTTCTGGGTT3') permitió la amplificación del ADNc de la NTS con un tamaño predicho de 438 pb [99]. El cuarto par (5'ACGCAGGCCTCGAGCAGCTTG3' y 5'CTGTGCCTGCTGCTGGCGATGC3') permitió la amplificación del fragmento de ADNc de Gas1 humano con un tamaño predicho de 604 pb [97]. El quinto par (5'GACCCCGTTTGCCTGTTTTC3' y 5'CAGTGCTCCCGATCATCTCC3') permitió la amplificación del fragmento de ADNc de Gas1 de rata con un

tamaño predicho de 157 pb. El sexto par amplificó el fragmento de ADN de  $\beta$ -actina (377 pb) previamente descrito [14].

#### **8.4 Formación de las nanopartículas del NTS-poliplex**

Los procedimientos detallados para la síntesis del acarreador de NTS para la posterior formación de las nanopartículas del NTS-poliplex se han descrito previamente [100, 101]. En resumen, las nanopartículas del NTS-poliplex resultan a partir de la compactación de un plásmido de ADN (pDNA por sus siglas en inglés) con el péptido cariofílico (PK) Vp1 SV40 (SynPepCorp) y con el acarreador de NTS por medio de uniones electrostáticas. El acarreador de NTS es un conjugado de poli-L-lisina, NTS (Sigma-Aldrich) y un péptido fusogénico (PF) HA2 derivado de la hemaglutinina (SynPep) que se enlaza entre sí de manera covalente [90, 100]. Se usaron los criterios de micro ensayos de retardo y retención [90] para determinar la razón molar óptima entre el plásmido a usar, el PK y el acarreador de NTS, las cuales fueron: 6 nM de pEGFP-N1: 6  $\mu$ M de PK: 162 nM de acarreador de NTS; 6 nM de pLenti6.3/TO/V5-tGAS1: 6  $\mu$ M de PK: 234 nM de acarreador de NTS y por último 6 nM de pLenti6.3/V5-GW/lacZ: 6  $\mu$ M PK: 234 nM de acarreador de NTS, resultados de tesis de maestría [102].

#### **8.5 Entrega de genes utilizando el NTS-poliplex**

Los experimentos de transfección e internalización se realizaron en células con una confluencia del 70-80% que se sembraron en cubreobjetos de vidrio (12 mm diámetro) tratados con poli-lisina y montados en platos de 24 pozos. El NTS-poliplex marcado con yoduro de propidio (PI por sus siglas en inglés) y el plásmido acarreado pEGFP-N1 se usaron para los ensayos de internalización y bloqueo farmacológico, previamente descritos [90, 103]. Para los ensayos de internalización, las células de glioblastoma C6 y las células de astrogliá se incubaron durante 15 minutos con el NTS-poliplex marcado con PI. Se llevó a cabo un ensayo de bloqueo farmacológico usando 10 $\mu$ M de levocabastina (Sigma-Aldrich), un agonista no peptídico del NTSR2, 30 minutos antes y durante 15 minutos de la incubación del NTS-poliplex marcado con PI para determinar si la internalización del NTS-poliplex procedía por medio de los receptores NTSR2. Al final de la incubación las células se lavaron tres veces con amortiguador de sales de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) y procesadas para su marcaje en inmunofluorescencia.

La expresión de la GFP en las células C6 y las células de astrogliá se evaluó 36 horas después de su exposición con el NTS-poliplex acarreado el plásmido pEGFP-N1. Se repitió el mismo procedimiento para

observar la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en las células C6 utilizando el plásmido pLenti6.3/V5-GW/lacZ. Las células expuestas solamente con el complejo PK-pDNA (en ausencia del acarreador de NTS) se consideraron como control negativo tanto de la internalización como de la expresión de genes reporteros. Al final, las células se procesaron para inmunofluorescencia como se describe más adelante.

## **8.6** Expresión de Gas1 recombinante y $\beta$ -galactosidasa

La expresión de Gas1 recombinante se evaluó en los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizando un ELISA de Gas1 de humano DuoSet siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems). Se llevó a cabo la tinción de X-gal para evaluar la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa [104] en las células C6 transfectadas con el NTS-poliplex. Las células positivas a  $\beta$ -galactosidasa (azul por tinción de X-gal) se contaron utilizando microscopía de campo claro.

## **8.7** Viabilidad celular

Se realizó un ensayo de reducción de sales de tetrazolio (MTT por sus siglas en inglés) [23] para determinar el efecto sobre la viabilidad celular mediado por la expresión de tGas1 en las células C6. Se sembraron 20,000 células C6 en platos de 24 pozos, para después ser transfectadas con el plásmido pLenti6.3/TO/V5-tGas1 o el plásmido pLenti6.3/V5-GW/lacZ utilizando el NTS-poliplex. Treinta y seis horas después se evaluaron las células viables midiendo la conversión de las sales de tetrazolio (MTT) a formazán. La absorbancia se leyó a 595 nm utilizando un lector de microplacas automatizado (BioRad).

## **8.8** Efecto del medio condicionado con tGas1

Se colectaron los medios condicionados de las células C6 previamente transfectadas con el NTS-poliplex y los plásmidos que codifican para tGas1 y  $\beta$ -galactosidasa a las 36 horas. Los medios fueron centrifugados y filtrados en poros de 0.22  $\mu$ m (Millipore), rápidamente, estos medios condicionados se agregaron a cultivos celulares de C6 independientes (no transfectados) los cuales estuvieron expuestos a los medios condicionados durante 36 horas para su posterior evaluación de viabilidad celular, previamente descrita [14, 97, 105], utilizando la técnica de MTT.

## 8.9 Inmunofluorescencia en células y tejido

Las células C6 y las células de astrogliá se fijaron con 4% de PFA y lavaron tres veces con PBS. Las células C6 no se permeabilizaron y se tiñeron directamente con faloidina Alexa fluor 488 (Invitrogen). Los cultivos primarios de astrogliá se permeabilizaron una vez con PBS Triton X-100 (PBS-T) al 0.05% durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS, se pre incubaron con PBS conteniendo 10% de suero normal de caballo (NHS por sus siglas en inglés) durante 30 minutos y se lavaron de nueva cuenta con PBS para su posterior incubación toda la noche a 4°C con el anticuerpo de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés; 1:1000; Dako) diluido en PBS con 1.5% de NHS. Después de lavar tres veces con PBS, el anticuerpo primario se reveló con un anticuerpo secundario anti burro conjugado a un fluoróforo Alexa 488 (diluido 1:2000; Invitrogen) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Por último, ambos tipos celulares se contra tiñeron con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) y se montaron en portaobjetos de vidrio usando Vectashield para su posterior examinación por microscopía confocal. Para los tejidos se utilizaron cortes coronales congelados de cerebro e hígado de 20 µm de grosor que se colectaron en un criostato y se preservaron a -70°C. Las rebanadas se permeabilizaron con PBS-T 0.2% durante 1 h y posteriormente se incubaron con una solución de bloqueo (BSA 1% y PBS-T 0.2%) durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C toda la noche en solución de bloqueo, utilizando los siguientes anticuerpos: cabra anti-Gas1 de ratón (1:50; R&D), ratón anti-Claudina-2 (1:100; Invitrogen), ratón anti-RECA-1 (1:100; Hylcut Biotechnology), conejo anti-NG2 (1:100; Millipore) y un ratón anti-α-SMA (1:100; Invitrogen). A continuación, las rebanadas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: anti-cabra Alexa 594 (Life Technologies), anti-ratón Alexa 488 (Life Technologies) y anti-conejo Alexa 488 (Life Technologies) para la detección de los anticuerpos primarios. Después de lavar, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando Vectashield con DAPI para teñir los núcleos. Durante el período de incubación con los anticuerpos primarios se tuvieron unas muestras en las que se omitieron uno o ambos anticuerpos primarios para verificar la ausencia de reacción cruzada de los anticuerpos secundarios. Las imágenes de confocal se capturaron con un microscopio confocal de láser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) utilizando los objetivos 20X, 40X y 63X. Las imágenes se adquirieron simultáneamente para ambos fluoróforos (Alexa 488 y Alexa 594). Todas las imágenes se presentaron como proyección máxima a excepción de los cortes ortogonales (corte individual) y se procesaron en el software LAS AF Lite versión 2.3.0.

### 8.10 Activación de ERK 1/2

Las células C6 y las células de astrogía se cultivaron hasta que tuvieron una confluencia de aproximadamente el 70% en medio DMEM libre de suero durante toda la noche para después ser estimuladas por varios intervalos de tiempo (0-60 minutos) con NTS (0.1  $\mu$ M) a 37°C con medio libre de suero. En experimentos similares la células C6 se incubaron de igual manera con levocabastina (0.1  $\mu$ M) por diferentes intervalos (0-60 min) a 37°C en medio libre de suero. En otros experimentos las células C6 se pre incubaron en ausencia o presencia de sacarosa (0.45 M), para inhibir la endocitosis [106], durante 30 minutos antes de la estimulación con NTS (10 minutos) co-incubada con sacarosa. Todas las reacciones previas se detuvieron aspirando el medio del cultivo celular y lavando con PBS frío, posteriormente las células se lisaron a 4°C.

### 8.11 Western Blot

La extracción de proteína total se realizó utilizando un amortiguador de lisis con un inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostic) en el que el extracto celular o tisular se centrifugó a 8,000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se almacenó hasta su utilización. Para la detección de ERK 1/2 se utilizaron 20  $\mu$ g de proteína total para su posterior separación en geles SDS-PAGE al 12% y su sucesiva transferencia a membranas de nitrocelulosa las cuales se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente en un amortiguador de sales de Tris (TBS por sus siglas en inglés) con leche al 5% y 0.1% de Tween, posteriormente se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo de ratón contra ERK 1/2 fosforilado (1:2000; Cell Signaling) o con el anticuerpo de conejo contra ERK 1/2 total (1:2000; Cell Signaling). La detección se realizó con los anticuerpos anti ratón o anti conejo conjugados con peroxidasa (1:5000; Jackson ImmunoResearch); se utilizó el sistema ECL (Roche Diagnostics) para la detección de los anticuerpos secundarios. Para la detección de Gas1 de ratón y rata se utilizaron 5 y 50  $\mu$ g de proteína total de extracto celular y de cerebro respectivamente. A continuación, la separación de proteínas se realizó en geles de SDS-PAGE (12%) y se transfirieron a membranas de PVDF para la subsecuente detección de Gas1 utilizando el anticuerpo de cabra anti- Gas1 de ratón (1:500; R&D), posteriormente se utilizó un anticuerpo de conejo anti-cabra (1:5000). Se detectó  $\beta$ -Actina como control de carga [107]. Las imágenes se capturaron digitalmente con el BioDoc-It Imaging System (UVP). Los valores de la razones de las densitometrías tanto de los niveles de ERK 1/2 fosforilada y los niveles de ERK 1/2 total como los de Gas1 y  $\beta$ -Actina se determinaron utilizando el software ImageJ 1.50i (NIH).

### **8.12** Obtención de fluidos corporales

Para obtener la orina se introdujeron ratas adultas en cajas metabólicas durante 24 h y se colectó la orina libre de heces, como se describió previamente [96]. Para la obtención del plasma sanguíneo los animales se anestesiaron con pentobarbital y con una jeringa #18 se recolectó la sangre a partir del ventrículo izquierdo del corazón, después se le agregó EDTA como anticoagulante y se separó el plasma sanguíneo por centrifugación [108]. El líquido cefalorraquídeo (LCR) se colectó a partir de la cisterna magna siguiendo técnicas previamente descritas [109-111]. En resumen, se anestesiaron los animales con ketamina (66 mg/kg) y xilacina (13 mg/kg), después se les realizó una incisión en la base del cráneo hasta exponer la duramadre y observar la vasculatura de la piamadre junto con el espacio subaracnoideo donde se insertó una capilar. Por diferencias de presión el LCR fluyó fuera del espacio subaracnoideo, además se succionó más LCR con una jeringa conectada al capilar permitiendo obtener volúmenes aproximados de 200  $\mu$ l de LCR. Todos los fluidos se almacenaron a -20°C hasta su subsecuente análisis por ELISA.

### **8.13** Medición de la concentración Gas1 soluble endógeno

Las concentraciones de Gas1 en los sobrenadantes de los cultivos celulares, de los lisados tisulares y de los fluidos corporales se determinaron utilizando un ELISA de Gas1 de ratón DuoSet siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems). No fue necesario hacer diluciones para los fluidos corporales para realizar los ensayos de ELISA. Se utilizaron medios frescos con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (0.5, 10 y 30%) como controles negativos de los medios condicionados de las células NIH/3T3.

### **8.14** Inmunoprecipitación

Se colectó el medio condicionado de las células NIH/3T3 que previamente estaban a una confluencia del 100% y que fueron incubadas con medio (10% suero) hasta 72 h. Posteriormente, el medio se centrifugó, se filtró en poros de 0.22  $\mu$ m (Millipore) y se concentró hasta 10 veces (10X) utilizando un Centricon (Millipore) con un tamaño de poro de 10,000 Da (NMWL por sus siglas en inglés). Los lisados celulares y los medios condicionados concentrados se clarificaron durante 3h con la proteína agarosa A (Roche Diagnostic) a 4°C, después las soluciones se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos para incubarse 3h con el anticuerpo de cabra anti-Gas1 de ratón (R&D Systems) o con el anticuerpo de cabra anti-SOX-2 (Santa Cruz) el cual se utilizó como control negativo de la

inmunoprecipitación. Nuevamente se agregó proteína agarosa A y se incubó a 4°C toda la noche, al final la proteína agarosa A se procesó de acuerdo al protocolo del fabricante (Roche Diagnostic) y las muestras inmunoprecipitadas se analizaron por western blot.

### **8.15** Análisis estadístico

Se utilizó el software GrapPad Prism (versión 5.0). Todos los valores representan la media  $\pm$  SEM. La diferencia entre la cinética de activación de ERK 1/2 entre las células C6 y células de astrogía se analizó aplicando un ANOVA de dos vías. Para el resto de los experimentos, la diferencia entre los grupos fueron analizados aplicando un ANOVA de una vía. Cuando el ANOVA arrojó una diferencia significativa se realizó una comparación entre las medias usando una prueba post hoc de Bonferroni. Se consideró significativo una  $P < 0.05$ .

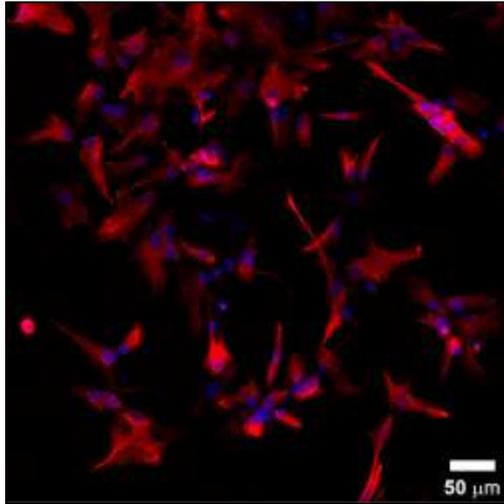
## 9 RESULTADOS

### 9.1 Expresión del NTSR2 y del vNTSR2 en los cultivos primarios de astrogía y en las células de glioblastoma C6

Se realizaron ensayos de RT-PCR en cultivos primarios enriquecidos de astrogía y de células de glioblastoma C6 con el fin de evaluar la expresión de la NTS y de sus receptores putativos tipo GPCR (Figura 3). Los oligos respectivos para los NTSR2 amplificaron 2 bandas, una de 600 y otra de 418 pb tanto en las células de astrogía como en las C6. Ambas bandas corresponden con las variantes NTSR2 y vNTSR2 amplificadas también en el cerebelo de rata (control positivo) [112, 113]. No se detectó ninguna señal en los dos tipos celulares usando los oligos del NTSR1, sin embargo, si se detectó un fragmento amplificado de 620 pb en las células N1E-115 (control positivo) [92]. Las células CHO fueron utilizadas como control negativo tanto para el NTSR1 como para los NTSR2 [114]. Finalmente, tampoco se observó una señal correspondiente a la NTS (438 pb) ni en las células de glía ni en las C6, pero si se detectó dicho fragmento en la células HT29 (control positivo) [115]. Una señal de la banda correspondiente a  $\beta$ -actina fue detectada en todos los extractos. Cabe mencionar que se obtuvo un cultivo celular enriquecido de células de astrogía con un 96% de células positivas a GFAP (Figura 4).



**Figura 3.** Expresión de los ARNm de NTSR2 y vNTSR2 en células de astrogía y células de glioblastoma C6. Geles representativos mostrando los productos de RT-PCR para el NTSR1 (620 pb), el NTSR2 (600 pb), el vNTSR2 (418 pb), la NTS (438 pb) y  $\beta$ -actina (377 pb). Las células N1E-115, el cerebelo y las células HT29 se utilizaron como controles positivos como se observa en los encabezados. Las células CHO se utilizaron como control negativo. MPM= marcador de peso molecular

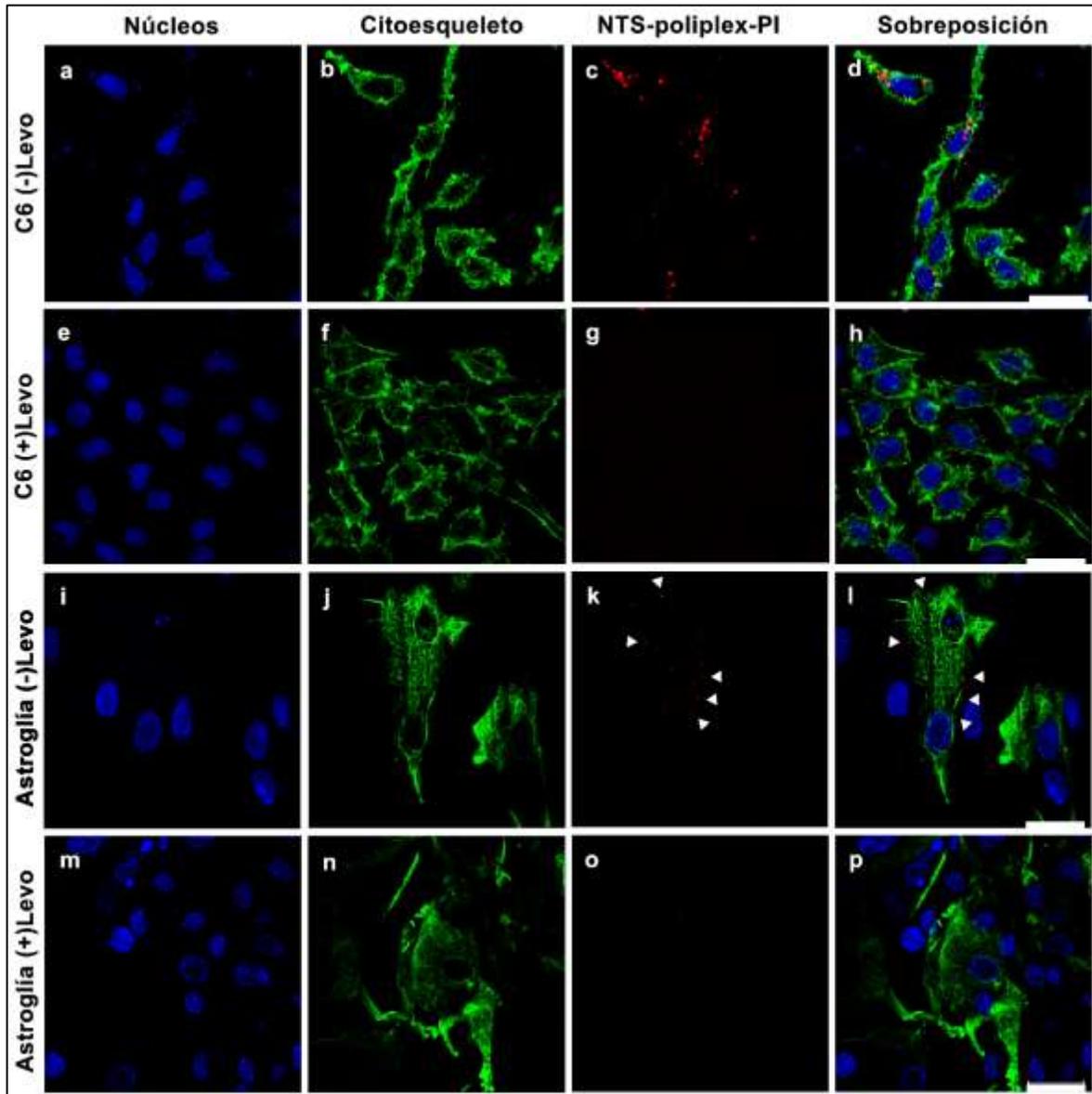


**Figura 4.** Cultivo celular enriquecido de astroglia. El citoesqueleto se tiñó contra GFAP en rojo. Los núcleos se contratiñeron en azul con Hoechst 33258. Barra de calibración 50  $\mu\text{m}$

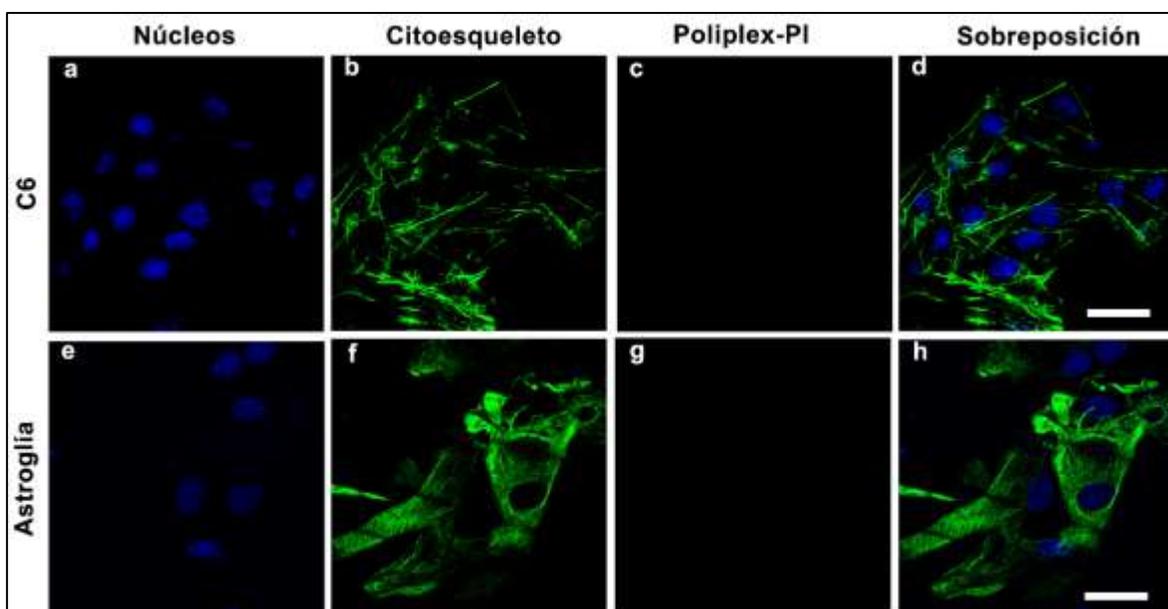
## 9.2 Internalización del NTS-poliplex en las células C6

Las células se incubaron con el NTS-poliplex marcado con PI en presencia o ausencia de levocabastina con el fin de determinar la internalización de la NTS por medio de los receptores NTSR2. Después de 15 minutos de incubación con el NTS-poliplex marcado con PI los análisis de microscopía confocal muestran puntos de PI dentro de las células C6 (Figura 5 a-d). La fluorescencia del PI estuvo ausente en las células C6 que fueron pre y co-incubadas con levocabastina (10 $\mu\text{M}$ ), un agonista no-peptídico específico de los NTSR2 [116, 117] (Figura 5 e-h), confirmando que los NTSR2 están mediando la internalización de la NTS como se ha mostrado previamente [113]. Experimentos similares se llevaron a cabo en cultivos primarios de células de astroglia. Las células positivas a GFAP incubadas con el NTS-poliplex marcado con PI mostraron puntos rojos solo en la periferia de la célula, este resultado muestra que no se lleva a cabo la internalización de los receptores NTSR2 en las células gliales (Figura 5 i-l). Además, no se detectó fluorescencia de PI cuando las células de astroglia fueron pre y co-incubadas con levocabastina (Figura 5 m-p). Esto confirma que las células de astroglia no pueden internalizar a la NTS por medio de sus receptores NTSR2 y vNTSR2, como se había demostrado previamente [74, 103]. Por otra parte, en ausencia del acarreador de NTS no se detectó marca de PI ni en las células de astroglia ni en las células C6 (Figura 6), confirmando que es necesario el acoplamiento de la NTS al poliplex para que pueda

interactuar con las células por medio de los NTSR2 ya que ninguna población celular expresa al NTSR1. Estos resultados muestran que las células de glioblastoma C6 son capaces de internalizar al NTS-poliplex por medio de los receptores NTSR2.



**Figura 5.** Internalización del NTS-poliplex en las células de glioblastoma C6. Micrografías representativas de secciones horizontales de microscopía confocal en células C6 incubadas con el NTS-poliplex marcado con PI en ausencia (a-d) o presencia (e-h) de levocabastina; cultivos primarios de astroglía incubados con NTS-poliplex marcado con PI en ausencia (i-l) o presencia (m-p) de levocabastina. El citoesqueleto se tiñó con faloidina en las células C6 y con GFAP en las células de astroglía. Levo = levocabastina. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las cabezas de flechas indican puntos fluorescentes de PI. *Barra de calibración* 25  $\mu$ m



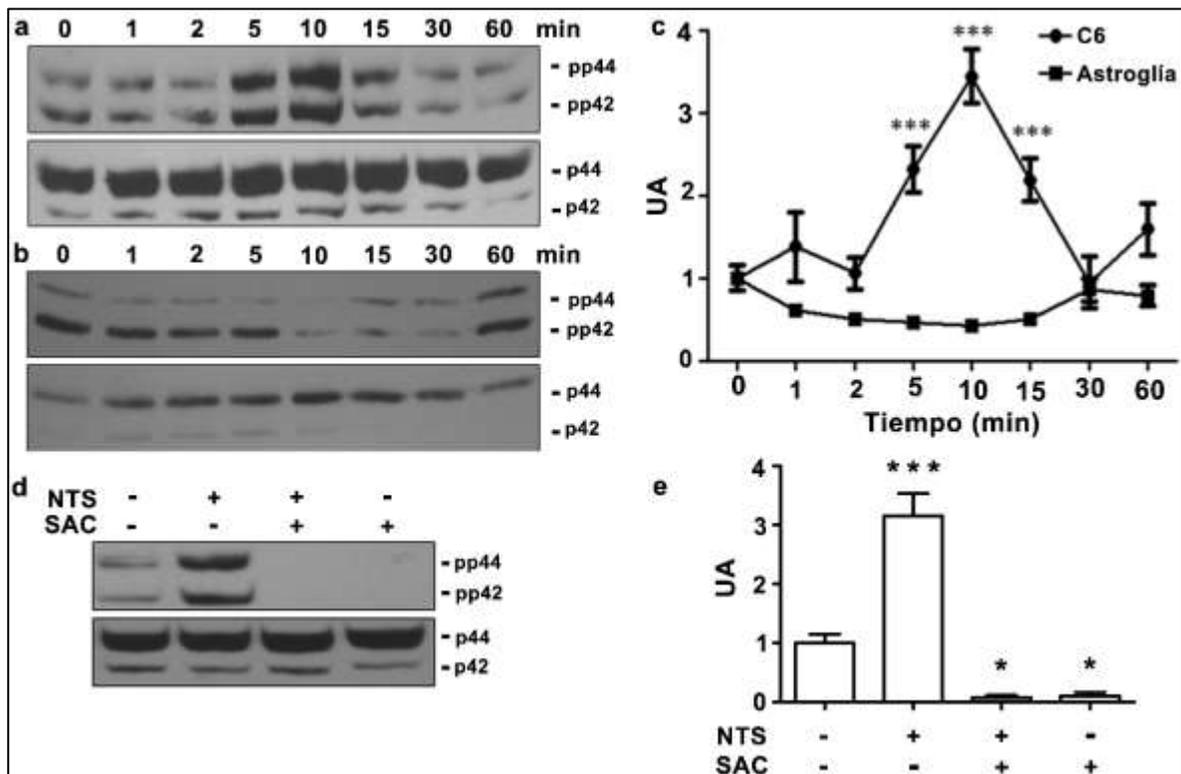
**Figura 6.** Ausencia de internalización del poliplex sin el acarreador de NTS. El citoesqueleto se tiñó con faloidina en las células C6 (a-d) y con GFAP en las células de astroglía (e-h). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33258. Barra de calibración 25  $\mu\text{m}$

### 9.3 Activación de ERK 1/2 inducida por los receptores NTSR2 y vNTSR2 en las células C6

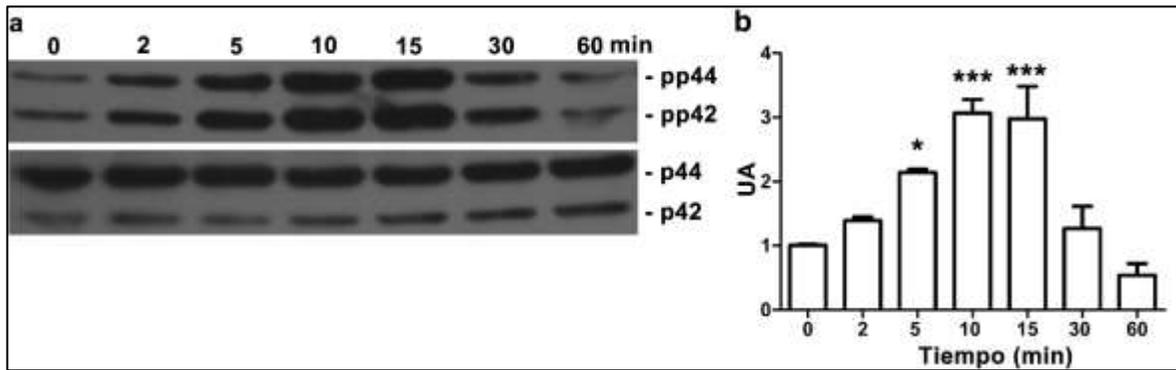
Las células de astroglía y C6 se estimularon con NTS (0.1  $\mu\text{M}$ ) por períodos que van desde 0 hasta 60 minutos para determinar si el NTSR2 y el vNTSR2 expresados endógenamente están acoplados a la vía de señalización de ERK 1/2. Los análisis de western blot sobre la fosforilación de ERK 1/2 mostraron que la NTS incrementó el nivel de fosforilación de ERK 1/2 en las células de glioblastoma C6 y que esta fosforilación fue robusta a partir de los 5 minutos post estimulación, alcanzó un pico máximo a los 10 minutos y se mantuvo activada hasta los 15 minutos (Figura 7 a, c). También, se observó una activación significativa de ERK 1/2 desde los 5 hasta los 15 minutos después de la estimulación con levocabastina (0.1 $\mu\text{M}$ ) (Figura 8 a, b), un ligando específico de los NTSR2 que activa a ERK 1/2 [112-114], lo que demostró que la activación de ERK 1/2 en las células C6 es mediada por los receptores NTSR2 y vNTSR2. Por otro lado no hubo fosforilación de ERK 1/2 en las células de astroglía durante los mismos períodos de estimulación con NTS (Figura 7 b, c). Este resultado es intrigante ya que indica que los receptores NTSR2 y vNTSR2 de las células sanas de astroglía no están acoplados a la vía de señalización de ERK 1/2 aunque sean los mismos receptores expresados que en las células de glioblastoma C6.

#### 9.4 La activación de ERK 1/2 requiere de la internalización de los receptores NTSR2 y vNTSR2

Las células C6 se pre incubaron en presencia o ausencia de sacarosa (0.45 M) y se estimularon durante 10 minutos con NTS (0.1  $\mu$ M) para determinar si la internalización de los receptores NTSR2/vNTSR2 inducida por ligando es necesaria para activar ERK 1/2. En ausencia de sacarosa la NTS disparó la activación de ERK 1/2 pero en presencia de sacarosa el efecto de la NTS sobre ERK 1/2 se abolió completamente (Figura 7 d, e). Esto confirmó que la internalización de los receptores NTSR2/vNTSR2 es necesaria para la activación de ERK 1/2.



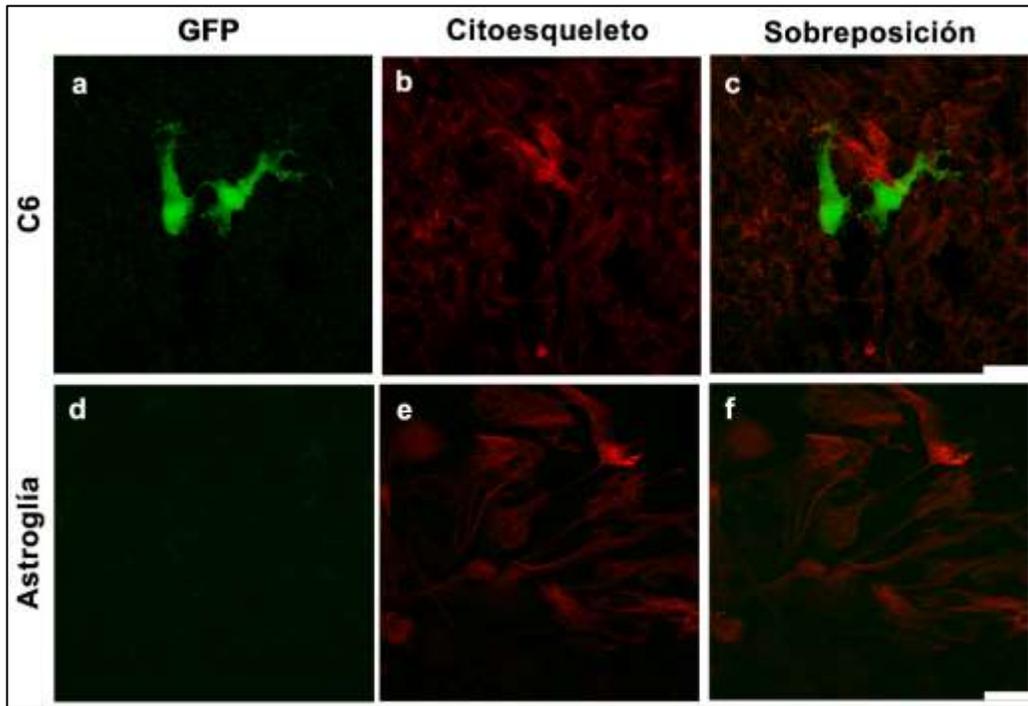
**Figura 7.** Participación de los receptores NTSR2 y vNTSR2 en la activación de ERK 1/2 dependiente de la internalización de NTS en las células de glioblastoma C6. Western blot representativo de las células C6 (a) y de astroglía (b) mostrando los niveles de fosforilación de ERK 1/2 (paneles superiores) y de ERK 1/2 total (paneles inferiores) después de la estimulación con la NTS (0.1  $\mu$ M) de 0 hasta 60 minutos. (c) Análisis densitométrico de la activación de ERK 1/2 en las células de glioma C6 (puntos) y células de astroglía (cuadrados). UA = Unidades arbitrarias de la razón entre ERK 1/2 fosforilado y ERK 1/2 total. (d) Western blot representativo de las células C6 pre incubadas por 30 minutos con o sin de sacarosa (SAC) 0.45 M seguida por la incubación de la NTS durante 10 minutos (0.1  $\mu$ M); panel superior = ERK 1/2 fosforilado; panel inferior = ERK 1/2 total. (e) Análisis densitométrico de la activación de ERK 1/2. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  comparado con los controles de células de astroglía (c) o células sin tratamiento (e). Los análisis densitométricos fueron analizados por un ANOVA de dos vías (c) o de una vía (e) para su posterior prueba post hoc de Bonferroni



**Figura 8.** Efecto de la levocabastina (0.1  $\mu$ M) en la fosforilación de ERK 1/2 en las células C6. (a) Panel superior = ERK 1/2 fosforilado; panel inferior = ERK 1/2 total. (b) Análisis densitométrico. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  comparados con los controles de células sin tratamiento.

## 9.5 Expresión de genes mediados por el NTS-poliplex

Se procedió a usar al NTS-poliplex para determinar si este vector no viral es capaz de transfectar a las células de glioblastoma C6. Las células C6 expresaron a la GFP 36 horas después de su incubación con el NTS-poliplex acarreando al plásmido pEGFP-N1 (Figura 9 a-c). Como era de esperar, no hubo expresión de la GFP en células sanas de astrogía (Figura 9 d- f) al no ser capaces de internalizar al NTS-poliplex marcado con PI. Este resultado no solo demostró que la transfección en células C6 es mediada por los receptores NTSR2/vNTSR2 sino que también indicó la selectividad del NTS-poliplex para transferir genes a las células de glioblastoma C6 y no así a las células sanas de astrogía.

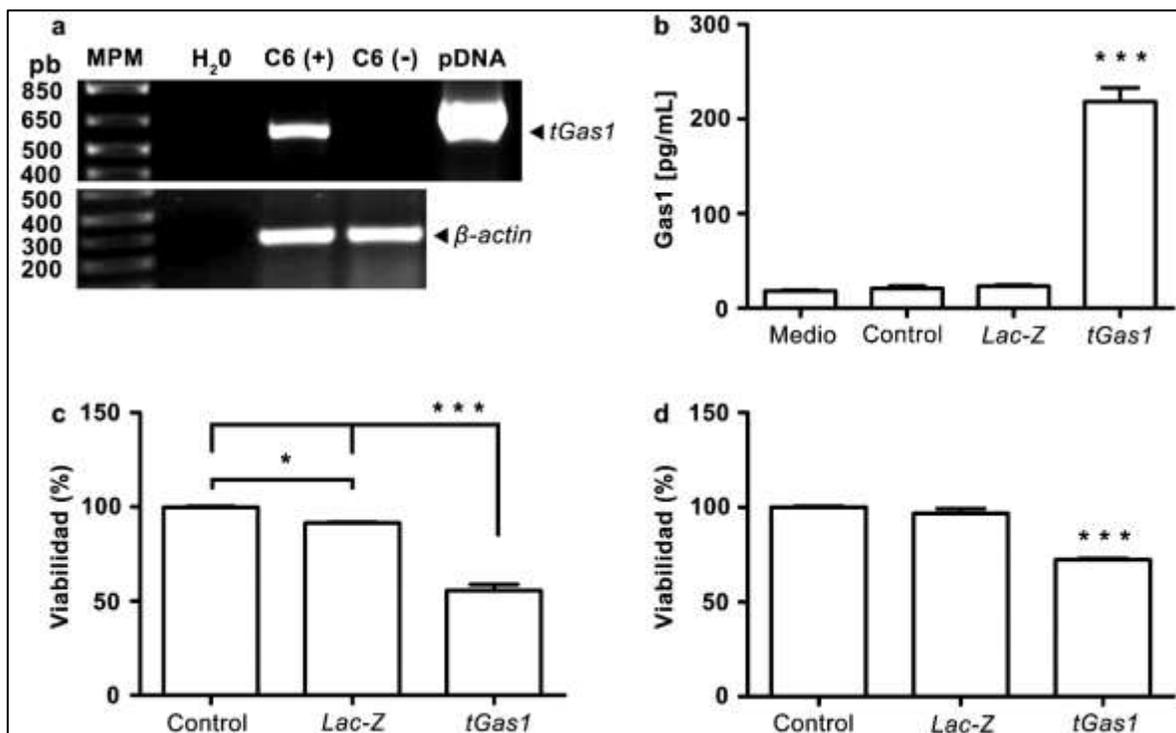


**Figura 9.** Transfección de las células de glioblastoma C6 con el NTS-poliplex. Micrografías representativas de microscopía confocal de células C6 (a-c) y de células de astroglía (d-f) 36 horas después de la exposición con el NTS-poliplex acarreando al plásmido pEGFP-N1. El citoesqueleto se tiñó con faloidina en las células C6 y con GFAP en las células de astroglía. Barra de calibración 25 µm

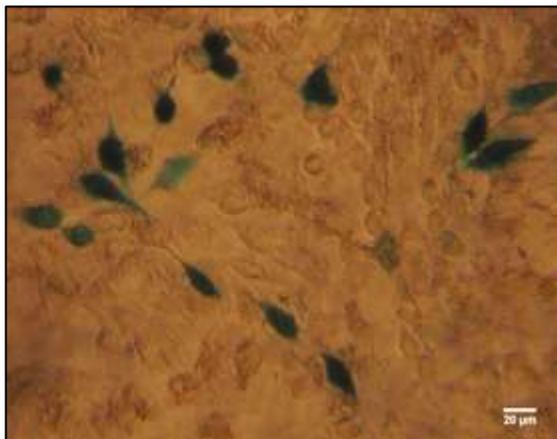
## 9.6 Expresión y efecto de Gas1 soluble recombinante utilizando al NTS-poliplex como vector

Se decidió transfectar un agente pro-apoptótico aprovechando la transfección específica del NTS-poliplex en células de glioblastoma. Se transfirió un plásmido que codifica para una forma soluble de Gas1 de humano, denominada tGas1, por medio del NTS-poliplex. Los análisis de RT-PCR mostraron la expresión de tGas1 (604 pb) en las células C6 transfectadas con el plásmido (pLenti6.3/TO/V5-tGAS1) que contiene a tGas1, no así en las células C6 sin transfectar (Figura 10 a). Se detectó a la proteína secretada de tGas1 en el medio condicionado de las células C6 transfectadas ( $218 \pm 14$  pg/mL) utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA pos sus siglas en inglés) específico para Gas1; en cambio no se detectó a tGas1 en los medios condicionados controles (Figura 10 b). Con el fin de evaluar la viabilidad celular se decidió emplear como controles a las células C6 sin transfectar y aquellas transfectadas con la secuencia codificante para  $\beta$ -galactosidasa (NTS-poliplex acarreando el plásmido pLenti6.3/V5-GW/lacZ). Después de la transfección de tGas1, los ensayos de MTT mostraron que la viabilidad celular disminuyó un  $44 \pm 3$  % en las células C6 al ser comparadas con los controles (Figura 10 c). Se apreció una reducción

mínima en la viabilidad celular pero significativa cuando se transfectó el plásmido que codifica para  $\beta$ -galactosidasa, esto se pudo deber a que el mismo proceso de transfección puede inducir un insulto a las células como ya se ha descrito anteriormente con vectores no virales [118, 119] (Figura 10 c). La viabilidad celular también disminuyó en un  $28 \pm 0.6 \%$  en los cultivos celulares receptores, es decir, cultivos independientes de células C6 que no fueron transfectadas directamente pero que si recibieron el medio condicionado de células transfectadas y productoras de tGas1 (Figura 10 d). La tinción de X-gal demostró la expresión efectiva de  $\beta$ -galactosidasa ( $\sim 13 \%$ ) en las células C6 (Figura 11). Estos datos indican la factibilidad de transferir selectivamente transgenes terapéuticos a células de glioblastoma por medio del NTS-poliplex.



**Figura 10.** Efecto de la expresión de tGas1 en la viabilidad celular de las células C6. (a) Geles representativos mostrando los productos de RT-PCR para tGas1 (604 pb) y para  $\beta$ -actina (377 pb) 36 horas después de la exposición con NTS-poliplex acarreando al plásmido que codifica para tGas1. MPM = marcador de peso molecular; C6 (+) = células transfectadas; C6 (-) = células sin transfectar; pDNA = plásmido pLenti6.3/TO/V5-tGAS1. (b) Niveles de la proteína de tGas1 evaluados por ELISA en el medio condicionado. Medio= DMEM F-12K; control = medio condicionado de células sin transfectar; Lac-Z = medio condicionado de células transfectadas con Lac-Z; tGas1 = medio condicionado de células transfectadas con tGas1. (c) Viabilidad celular utilizando el ensayo de colorimetría por MTT a las 36 h en células C6 (productoras) después de la transfección con el plásmido pLenti6.3/TO/V5-tGAS1 o (d) en células C6 (receptoras) después de su exposición con medio condicionado proveniente de células productoras. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  comparado con los controles de medios condicionados (b) o de células sin presencia de tGas1 (c y d). Se aplicó un ANOVA de una vía para su posterior prueba post hoc de Bonferroni

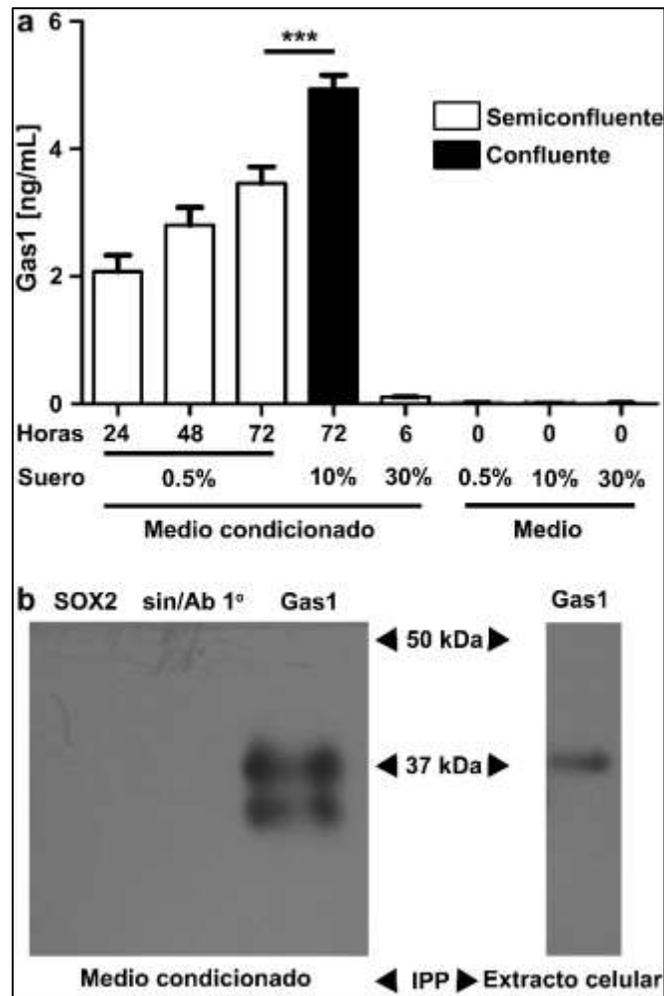


**Figura 11.** Expresión de  $\beta$ -galactosidasa en azul (tinción de X-gal) en células C6 transfectadas con el NTS-poliplex y Lac-Z. Barra de calibración 20  $\mu$ m

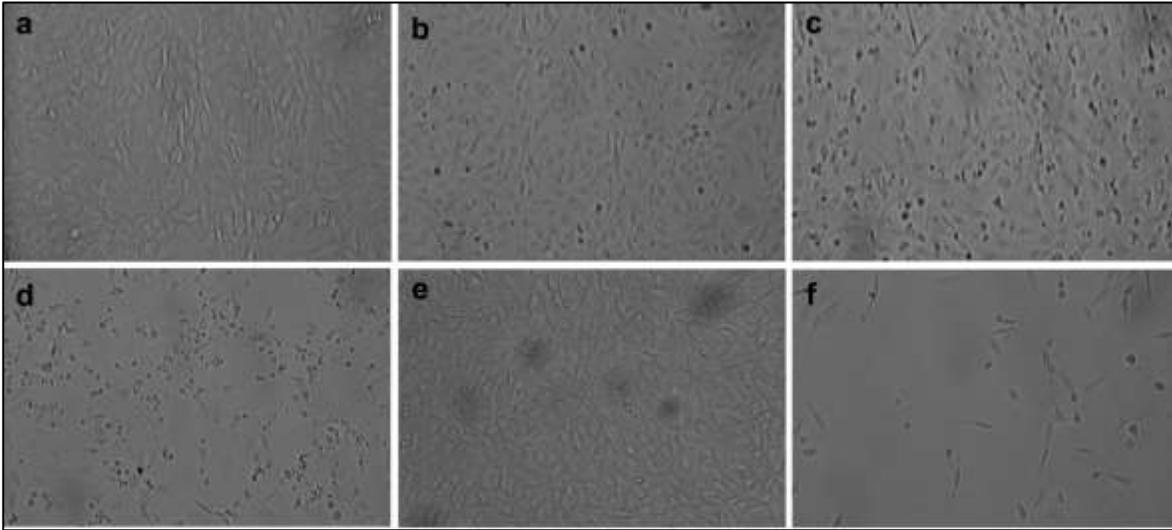
### 9.7 La línea celular de ratón NIH/3T3 secreta dos isoformas endógenas de Gas1

Gas1 se ha descrito principalmente como una proteína anclada a la membrana por medio de un GPI [6], por otro lado hay solo un reporte que muestra una forma soluble de Gas1 la cual es expresada y secretada de manera endógena por células mesangiales del riñón [96]. Para corroborar que Gas1 soluble se puede secretar de manera endógena se decidió utilizar la línea celular de fibroblastos de ratón NIH/3T3 debido a que está bien documentado que esta línea celular expresa Gas1 anclada a la membrana de manera endógena cuando se encuentran en arresto celular [7, 120]. Se realizaron ensayos de ELISA utilizando un kit comercial el cual contiene un anticuerpo anti-Gas1 de ratón que se ha probado previamente en ratones knockout de Gas1 [12]. Se decidió arrestar a las células mediante condiciones distintas con las cuales se ha demostrado que las células NIH/3T3 expresan a Gas1. La primera condición es cuando a las células se les priva de suero (0.5%) y la segunda condición es cuando las células se inhiben por contacto al alcanzar la confluencia en el plato de cultivo inclusive con 10% de suero [7]. Después de colectar el medio en estas condiciones se procedió a realizar ensayos de ELISA. Se logró detectar y comprobar que la línea celular NIH/3T3 secreta Gas1 soluble endógeno en ambas condiciones de arresto celular y se comprobó que la concentración más alta de Gas1 en los medios condicionados fue en los cultivos en donde se encuentran en arresto por confluencia aún en presencia de 10% de suero (Figura 12 a). Fue esa condición con la cual se trabajó para realizar los ensayos de inmunoprecipitación para determinar el peso molecular de Gas1 soluble en el medio debido a que contiene la concentración más alta de Gas1 y porque hay pocas células muertas cuando se compara con la condición en la cual se privó a las células de suero durante 72h (Figura 13), esto redujo la probabilidad de detectar a Gas1 en el medio que se pudo liberar

del citoplasma de las células muertas, falso positivo. Ensayos previos de western blot mostraron que solo cuando el medio condicionado se concentró (10X) se pudo detectar a Gas1 (datos no mostrados), por lo que el medio se concentró previamente antes de ser inmunoprecipitado. Curiosamente, después de la inmunoprecipitación de Gas1 en el medio, se logró observar la presencia de dos isoformas de Gas1, una de 37 kDa y otra de 34 kDa aproximadamente, mientras que solo una forma de Gas1 (37 kDa) se observó cuando la inmunoprecipitación se llevó a cabo directamente del extracto celular (Figura 12 b).



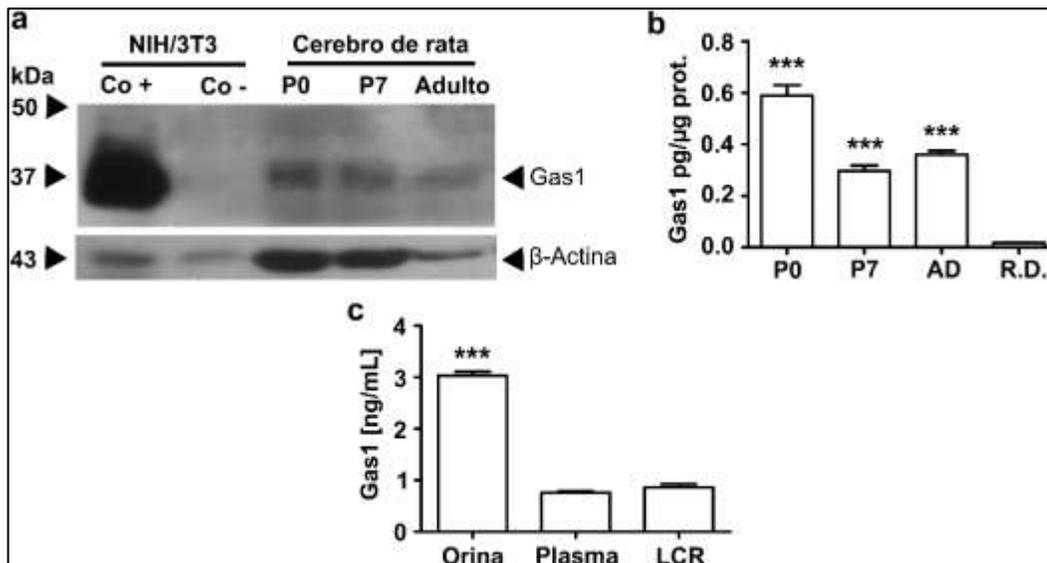
**Figura 12.** Las células NIH/3T3 secretan dos isoformas de Gas1. (a) Niveles de la proteína Gas1 soluble evaluados por ELISA en el medio condicionado de las células NIH/3T3 en diferentes condiciones. Se utilizó medio fresco con distintas concentraciones de suero (0.5, 10 y 30 %) como control negativo. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$  comparando el medio condicionado de las células NIH/3T3 con 0.5 % suero y 72 h de incubación contra el medio condicionado de las células NIH/3T3 en confluencia total con 10 % suero y 72 h de incubación. Se aplicó un ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni. (b) Análisis por western blot de la inmunoprecipitación (IPP) de Gas1 tanto del medio condicionado como del extracto celular de las células NIH/3T3. SOX-2: control negativo para la realización de la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-SOX-2; sin/Ab 1°: ausencia de cualquier anticuerpo primario; Gas1: IPP realizada con el anticuerpo primario anti-Gas1



**Figura 13.** Células NIH/3T3 en diferentes condiciones de cultivo celular. Células NIH/3T3 en condiciones normales de cultivo celular (a), con 0.5 % de suero por 24 h (b), 48 h (c) y 72 h (d), en confluencia total por 72 h con 10% de suero (e) y en semiconfluencia por 6 h con 30% de suero (f). Microscopía de campo claro, amplificación magnificación 10X

## 9.8 Gas1 soluble endógeno está presente en el líquido cefalorraquídeo de la rata adulta

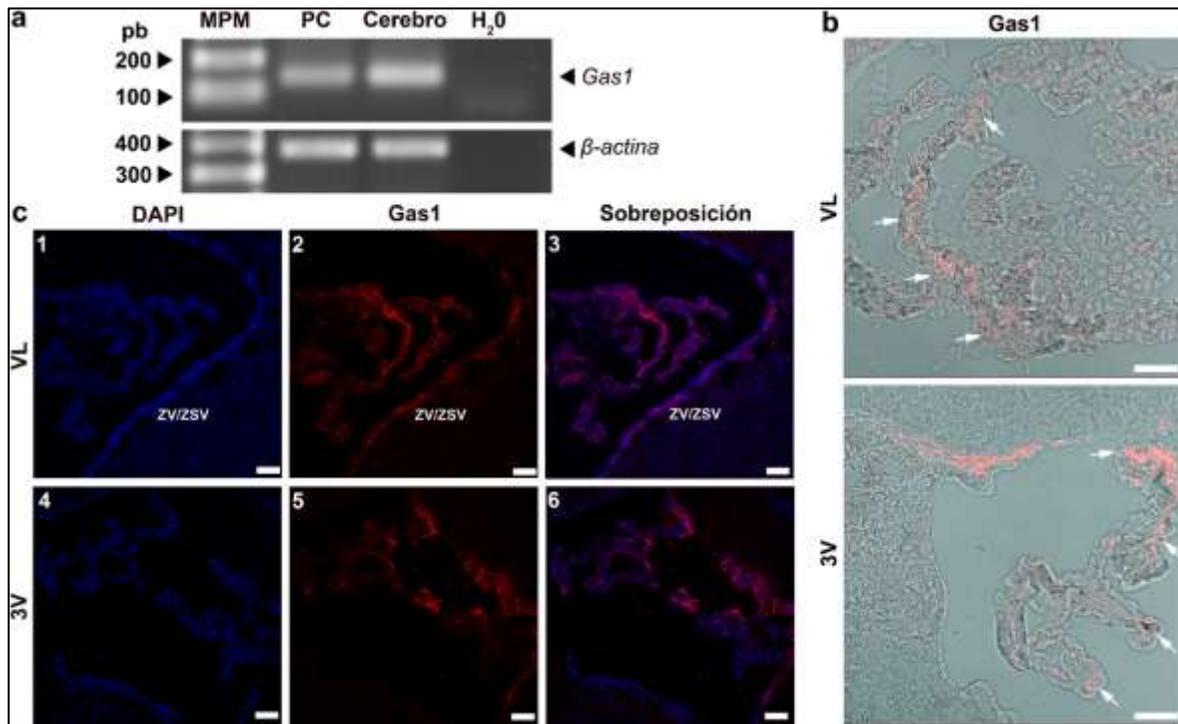
Para confirmar si el anticuerpo de anti-Gas1 de ratón reconoce a la misma proteína de la rata se decidió realizar ensayos de western blot y ELISA utilizando extractos de cerebro de rata en P0, P7 y adulta ya que en estas etapas se expresa la misma proteína en el ratón [121, 122]. Se observó una banda correspondiente a Gas1 (37 kDa) en todos los extractos de cerebro de rata correspondiente al control positivo, células NIH/3T3 en confluencia total (Figura 14 a). Se detectó también a  $\beta$ -Actina como control de carga en todos los carriles y se pudo observar una señal menos intensa en el control positivo y negativo. Esto se debe a que se cargó menor cantidad de proteína en los controles debido a que las células NIH/3T3 expresan niveles muy altos de Gas1 [7, 120]. Después se confirmó por ELISA la expresión y cuantificación de Gas1 en los diferentes estadios del cerebro de la rata y se logró comprobar que en P0 es cuando se expresan los niveles más altos de Gas1 (Figura 14 b). Al comprobar que el anticuerpo de ratón reconoce a Gas1 de rata se decidió obtener los fluidos corporales de la rata adulta para confirmar la presencia de Gas1 en la orina y plasma sanguíneo, previamente descritos [96]. Además se obtuvo el líquido cefalorraquídeo para determinar si Gas1 soluble está presente en este fluido tan importante del SNC. Se demostró por ELISA la presencia de Gas1 en la orina, en el plasma sanguíneo y por primera vez en el líquido cefalorraquídeo. La concentración más alta de Gas1 soluble fue en la orina y no se encontró diferencia significativa entre la concentración del plasma sanguíneo y el LCR (Figura 14 c).



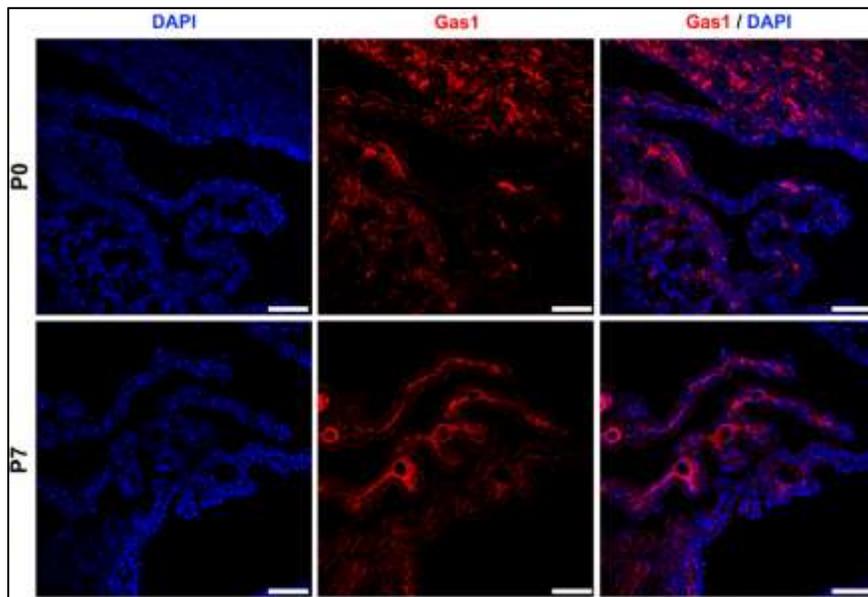
**Figura 14.** Gas1 se expresa en el cerebro y está presente en el líquido cefalorraquídeo de la rata adulta. (a) Análisis por western blot de la expresión de Gas1 a diferentes edades. Co (+) = Control positivo, células NIH/3T3 en confluencia. Co (-) = Control negativo, células NIH/3T3 en semiconfluencia con 30 % de suero. Cerebro de rata de posnatal 0 (P0), posnatal 7 (P7) y adulto. (b) Concentración de la proteína Gas1 en el cerebro de rata en P0, P7 y adulto (AD) evaluado por ELISA. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$  comparado con el control negativo, reactivo diluyente (R.D.). Se aplicó un ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni. (c) Concentración de Gas1 soluble en fluidos corporales de la rata adulta. Plasma sanguíneo (Plasma) y líquido cefalorraquídeo (LCR). Los valores representan las medias  $\pm$  SEM, para la orina y el plasma ( $n=3$ ) y para LCR ( $n=5$ ). \*\*\*  $P < 0.001$  comparación entre los 3 fluidos. Se aplicó un ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni

## 9.9 Expresión de Gas1 en el plexo coroideo

Después de encontrar a Gas1 soluble en el LCR, se decidió buscar la expresión de la proteína en el plexo coroideo (PC) puesto que esta estructura produce sus propias proteínas que pueden ser liberadas al LCR independientemente de aquellas proteínas filtradas provenientes del plasma sanguíneo [123]. Se realizaron ensayos de RT-PCR como primer abordaje para evaluar la expresión de Gas1 en el PC y se observó claramente una banda de 157 pb que corresponde a *gas1* tanto en el PC como en el cerebro de rata, control positivo (Figura 15 a). Se decidió entonces confirmar la expresión de la proteína por inmunofluorescencia y se pudo apreciar la expresión de Gas1 en el PC tanto de los ventrículos laterales (VL) y del tercer ventrículo (3V) de la rata adulta (Figura 15 b y c). También se pudo apreciar la expresión de Gas1 en la zona ventricular y en la zona subventricular (ZV/ZSV). A la par se observó la expresión de Gas1 en el PC de las ratas P0 y P7 (Figura 16).



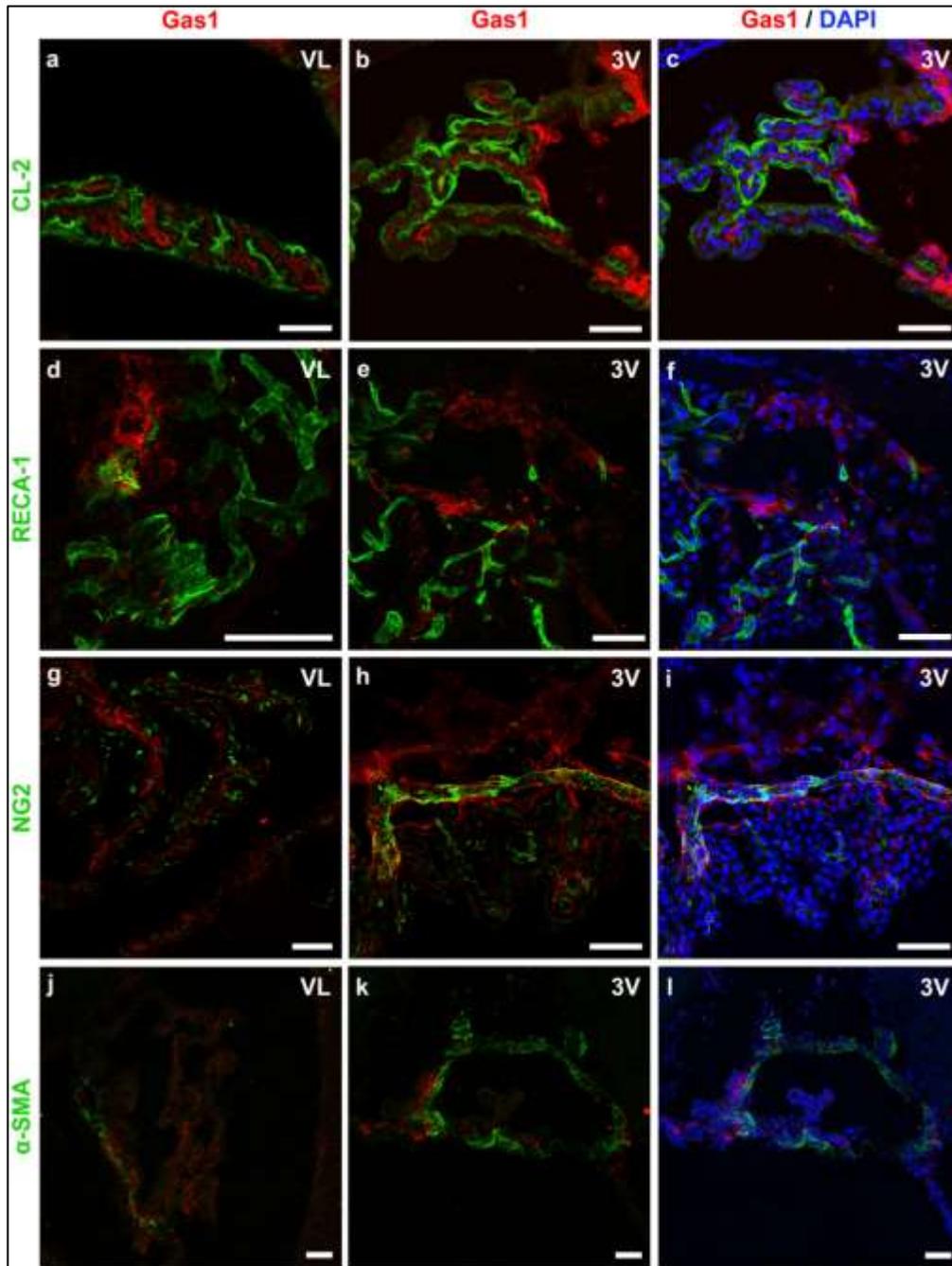
**Figura 15.** Gas1 se expresa en el plexo coroideo de la rata adulta. (a) Productos de RT-PCR para *Gas1* (157 pb) y *β-actina* (377 pb). Plexo coroideo (PC). El cerebro de rata adulta se utilizó como control positivo. (b) Micrografías de inmunofluorescencia y campo claro del PC del ventrículo lateral (VL) y del tercer ventrículo (3V). Las flechas indican la expresión de *Gas1*. (c) Micrografías de microscopía confocal del PC en VL (1-3) y 3V (4-6). *Gas1* se tiñó en rojo y los núcleos en azul con DAPI. Zona ventricular y zona subventricular (ZV/ZSV). Barra de calibración 50 μm



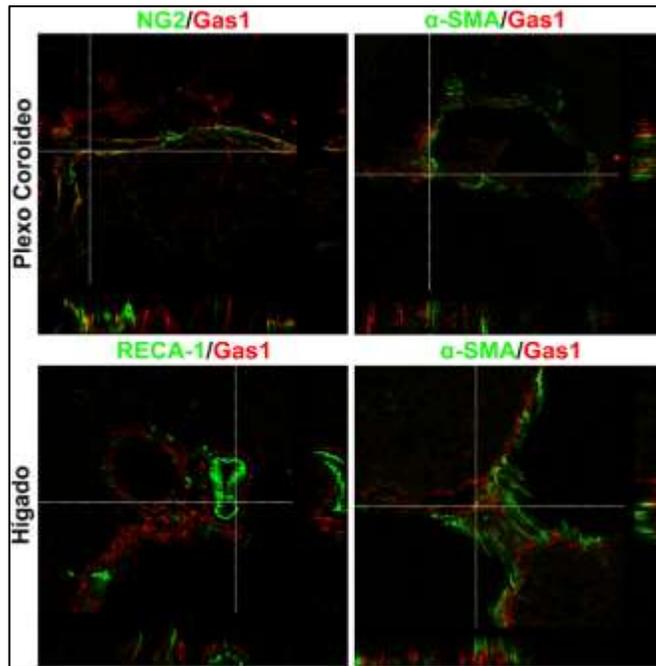
**Figura 16.** Expresión de *Gas1* en el plexo coroideo del ventrículo lateral (VL) de rata postnatal 0 (P0) y posnatal 7 (P7). Micrografías de microscopía confocal, *Gas1* se tiñó en rojo y los núcleos en azul con DAPI. Barra de calibración 50 μm

### 9.10 Expresión de Gas1 en el estroma del plexo coroideo

El PC está constituido de una capa epitelial y una capa estromal, la primera es una monocapa de células epiteliales que rodean a la capa estromal la cual está compuesta principalmente de capilares fenestrados y en menor medida por otros tipos celulares [124]. Para observar si las células epiteliales expresan a Gas1 se decidió realizar una inmunofluorescencia de doble marca para Gas1 y un marcador específico del epitelio del PC, Claudina-2 (CL-2) [125]. Como se puede apreciar en la figura 17 a-c no se encontró co-localización entre ambos marcadores en el CP del VL ni del 3V, esto indica al menos por exclusión que Gas1 se expresa en el estroma del PC. Entonces, se procedió a examinar por dobles marcajes la población celular del estroma que expresa Gas1. Se utilizó el marcador RECA-1 de células endoteliales [125], pero tampoco se demostró co-localización con Gas1 (Figura 17 d-f). Después, se utilizó un marcador de pericitos (NG2), un tipo celular perivascular descrito en el PC [126] aunque no hubo co-localización con Gas1 (Figuras 17 g-i y 18). Finalmente, se buscó la expresión de Gas1 en los fibroblastos ya que este tipo celular está presente en el PC [127] y hay reportes que indican que este tipo celular expresa Gas1 al menos en el páncreas [128]. Sin embargo, no se observó co-localización de Gas1 con el marcador específico de fibroblastos  $\alpha$ -SMA (Figuras 17 j-l y 18). Con estos resultados no podemos determinar el tipo celular en el estroma del PC que expresa a Gas1.



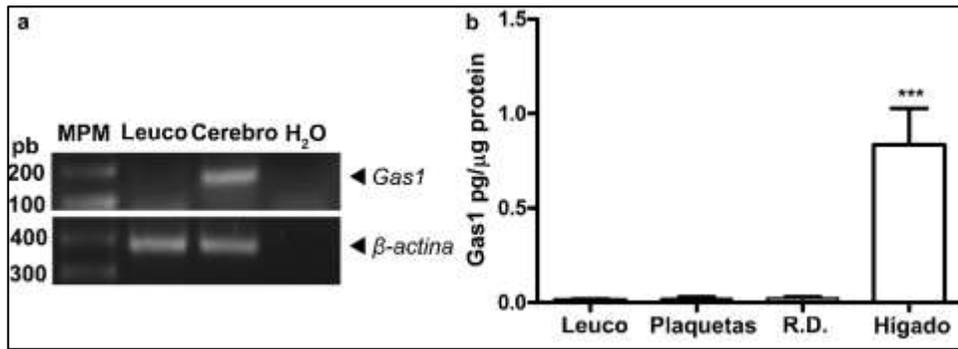
**Figura 17.** No se encontró expresión de Gas1 en ninguno de los siguientes tipos celulares del plexo coroideo: epiteliales, endoteliales, pericitos y fibroblastos. Micrografías de microscopía confocal del ventrículo lateral (VL) y el tercer ventrículo (3V) mostrando que no se detectó la co-localización entre: (a-c) Gas1 y el marcador epitelial CL-2; (d-f) Gas1 y el marcador endotelial, RECA-1; (g-i) Gas1 y el marcador de pericitos, NG2; (j-l) Gas1 y el marcador de fibroblastos,  $\alpha$ -SMA. Gas1 es marcado en rojo. CL-2, RECA-1, NG2 y  $\alpha$ -SMA se marcan en verde. Los núcleos son marcados en azul con DAPI. *Barra de calibración* 50  $\mu$ m



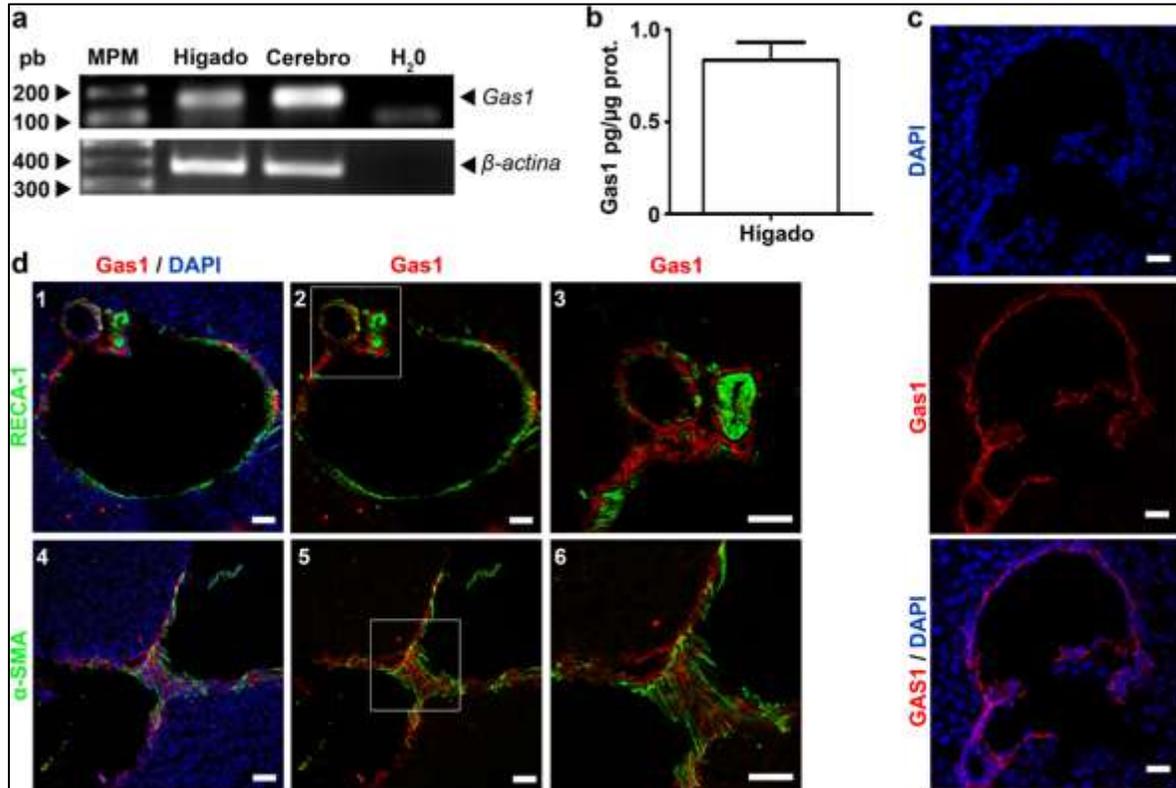
**Figura 18.** Gas1 no co-localiza con NG2, RECA-1 ni con  $\alpha$ -SMA en el plexo coroideo ni en el hígado. Micrografías ortogonales de microscopía confocal. Gas1 se tiñó en rojo; NG2, RECA-1 y  $\alpha$ -SMA se tiñeron en verde

### 9.11 Expresión perivascular de Gas1 en el hígado de la rata adulta

Una vez que se detectó Gas1 en el plasma sanguíneo se optó por determinar su expresión en el hígado de rata, el cual es el principal productor de proteínas plasmáticas [129-131]. La segunda fuente principal de proteínas plasmáticas son las células de la sangre, sin embargo éstas no expresaron a Gas1 (Figura 19). Por lo tanto se demostró la expresión de Gas1 en el hígado de la rata tanto por RT-PCR como por ELISA (Figura 20 a y b), confirmando datos previos reportados en ratón [13, 132]. Asimismo, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar el patrón de expresión de Gas1 en el hígado y se observó que es perivascular (Figura 20 c). Como en el PC, la expresión de Gas1 en el hígado no co-localizó con RECA-1 ni con  $\alpha$ -SMA (Figuras 20 d y 18).



**Figura 19.** Las células plasmáticas no expresan Gas1. (a) Ensayo de RT-PCR mostrando que los leucocitos no expresan Gas1. El cerebro de rata adulta se utilizó como control positivo de Gas1 (157 pb). β-actina (377 pb). (b) La proteína de Gas1 no se detectó por ELISA ni en leucocitos ni en plaquetas. El extracto de hígado se usó como control positivo. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$  comparado con el control negativo, reactivo diluyente (R.D.). Se aplicó un ANOVA de una vía para su posterior prueba post hoc de Bonferroni



**Figura 20.** Expresión perivascular de Gas1 en el hígado de la rata adulta. (a) Productos de RT-PCR para *Gas1* (157 pb) y *β-actina* (377 pb) en el hígado. El cerebro de rata se usó como control positivo. (b) Concentración de la proteína de Gas1 evaluada por ELISA en el hígado. El valor representa la media  $\pm$  SEM (n=3). (c) Micrografías confocales mostrando el patrón de expresión de Gas1 en el hígado. (d) Micrografías de microscopía confocal mostrando la no co-localización entre: (1-3) Gas1 y el marcador de endotelio, RECA-1; (4-6) Gas1 y el marcador de fibroblastos, α-SMA. Las imágenes de la tercera columna son ampliaciones de la segunda columna. Gas1 se marca en rojo. RECA-1 y α-SMA se marcan en verde. Los núcleos se marcan en azul con DAPI. Barra de calibración 50 μm

## 10 DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que en las células de glioblastoma C6 los receptores NTSR2 y vNTSR2 están asociados con la activación de ERK 1/2 dependiente de la internalización, un proceso que no ocurrió en células de astrogliá sanas aunque éstas expresen los mismos receptores. Además, la internalización de los receptores NTSR2 en las células de glioblastoma nos proveyó de un nuevo método para transferir selectivamente el gen pro-apoptótico tGas1 usando el sistema NTS-poliplex en estas células tumorales.

Estudios funcionales con el ligando NTS sugieren que las células de glioma expresan receptores a neurotensina [52, 60, 76] y nuestros ensayos de RT-PCR demostraron que la línea celular de glioblastoma de rata C6 expresa las dos formas del receptor a neurotensina tipo 2 (NTSR2 y vNTSR2) y no al NTSR1. Cabe mencionar que el vNTSR2 es una isoforma que se produce por corte y empalme a partir del ARNm del NTSR2 y que codifica para una proteína más pequeña, la cual tiene solo cinco dominios transmembranales a diferencia de la completa que tiene siete dominios transmembranales [112]. Este es un resultado relevante, debido a que la mayoría de reportes asocian exclusivamente la expresión del NTSR1 en células cancerosas [58, 133]. Solamente hay dos reportes que indican la expresión del NTSR2 [134] o su sobreexpresión [69] en células cancerígenas. Por otro lado en el SNC de individuos sanos, la expresión del NTSR2 está asociada principalmente a las células gliales [135] y preferencialmente en astrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* [74, 136, 137]. Hay un reporte que indica que las células de astrogliá expresan solamente la forma completa o larga del receptor de neurotensina tipo 2 (NTSR2) pero no su isoforma corta (vNTSR2) [75] a diferencia de nosotros que logramos detectar las dos formas de los receptores (NTSR2/vNTSR2) en el mismo tipo celular. Estos resultados sugieren que las células de glioblastoma C6 mantienen la expresión de los dos receptores del NTSR2 al ser los glioblastomas tumores que tienen una naturaleza de célula glial y no así la de expresar *de novo* al NTSR1 como suele suceder en la mayoría de células cancerosas [58, 133].

Adicionalmente, los ensayos de RT-PCR mostraron que las células C6 no expresan NTS a diferencia de otros tipos de cáncer que expresan tanto a la NTS como al NTSR1 desarrollando una señalización autocrina [133]. Así pues, proponemos que en tumores cerebrales la estimulación de los receptores NTSR2 puede ser inducida por los altos niveles de la NTS endógena que se encuentra en el SNC [53, 57]. A la par, no pudimos detectar la expresión de la NTS en cultivos celulares de astrogliá lo cual es congruente con la literatura que describe que en el SNC la NTS se expresa preferencialmente en neuronas y no en la glía [57].

Nuestros ensayos de internalización y de bloqueo farmacológico demostraron que solamente las células de glioblastoma C6 son capaces de internalizar al NTS-poliplex marcado con PI y confirmaron que las

células no tumorales de astrogliá son incapaces de internalizar a la NTS [74, 75] por medio del NTS-políplex [103]. Independientemente de que las células C6 pudieron internalizar a la NTS o que las células de astrogliá no pudieron internalizar al neuropéptido, la interacción de la NTS con ambos tipos celulares fue mediada por los receptores NTSR2 ya que ningún tipo celular expresó al NTSR1. Además, la interacción de la NTS al interior de las células C6 o en la periferia de las células de astrogliá se abolió por la levocabastina, un ligando no peptídico específico que bloquea la unión entre la NTS y los receptores NTSR2 [112, 116, 117].

Se obtuvieron resultados similares a partir de los estudios de la activación de ERK 1/2. Se demostró que la estimulación de las células C6 con la NTS indujo una activación robusta de ERK 1/2 con una cinética correspondiente a la internalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) [112-114, 138, 139]. Además, la levocabastina activó a ERK 1/2 con una cinética similar confirmando que los receptores NTSR2 son los mediadores de esta vía de señalización en las células C6. Adicionalmente el efecto hiperosmolar de la sacarosa la cual bloquea la endocitosis de los receptores al interrumpir la formación de vesículas de clatrina [90, 106, 140], mostró que la activación de ERK 1/2 en las células C6 es dependiente de la internalización de la NTS por medio de los receptores NTSR2 y vNTSR2 y no a través de la activación de su proteínas G acopladas [141, 142]. En contraparte, no se observó activación de ERK 1/2 cuando el mismo protocolo de estimulación con la NTS se llevó a cabo en las células sanas de astrogliá en las que previamente se había demostrado su incapacidad para internalizar a la NTS. Todos estos datos juntos demuestran que en las células de glioblastoma C6 los receptores NTSR2/vNTSR2 están acoplados a la activación de ERK 1/2 dependientes de la internalización, la cual se ha comprobado que favorece la progresión del cáncer [143, 144]. El mecanismo responsable por el cual las células sanas de astrogliá no pudieron internalizar a la NTS ni a los receptores NTSR2 y por ende la falta de activación de ERK 1/2 queda aún por esclarecer. Es posible que proteínas de andamiaje como las  $\beta$ -arrestinas participen directamente en el proceso de la internalización y activación de los receptores NTSR2 ya que se ha reportado que la sobre expresión, fosforilación o ubiquitinación de las  $\beta$ -arrestinas pueden afectar la internalización de los GPCR's y por ende la señalización de ERK 1/2 [141, 143].

Otro mecanismo podría estar relacionado con los niveles de expresión de las isoformas de los receptores NTSR2, como es el caso de células cancerosas de vejiga las cuales expresan altos niveles de la isoforma  $\beta$  del receptor a tromboxano (TP- $\beta$  por sus siglas en inglés) pero niveles bajos de la isoforma  $\alpha$  de dicho receptor (TP- $\alpha$  por sus siglas en inglés) correlacionando la sobre expresión del TP- $\beta$  con un incremento en la activación de ERK 1/2 [145] a diferencia de las células sanas del epitelio de vejiga las cuales expresan niveles bajos de ambas isoformas del receptor a tromboxano. Cabe recalcar que tanto el TP- $\beta$  como el TP- $\alpha$  son GPCR's que se originan por corte y empalme alternativo del mismo ARNm [146, 147], al igual que

las isoformas de los receptores NTSR2, además solo el TP- $\beta$  se acopla a las  $\beta$ -arrestinas y de esta manera puede internalizar en presencia de su ligando [148]. Sería interesante comparar si hay diferencia en los niveles de expresión del NTSR2 y el vNSTR2 o si hay alguna modificación en las  $\beta$ -arrestinas entre las células C6 y las células sanas de astrogía, incluso compararlas también con las células granulares del cerebelo ya que éstas también expresan ambas isoformas de los receptores NTSR2 que pueden internalizarse y por tanto activar a ERK 1/2 [113]. Esta información mejoraría nuestra comprensión sobre los diferentes efectos de la internalización de las isoformas de los receptores NTSR2 y sus consecuencias intracelulares de este proceso.

Adicionalmente, la internalización funcional del NTSR2 y del vNSTR2 en las células C6 se demostró por la expresión de transgenes mediados por el NTS-poliplex. Curiosamente, este vector no viral transfecta a células que expresan e internalizan al NTSR1 [90, 100, 101, 149], pero no a células que expresan al NTSR2 como es el caso de células de astrogía [103]. La expresión de la GFP, lacZ y tGas1 en las células C6 comprueba que las células que expresan e internalizan las dos variantes del receptor NTSR2 son un nuevo objetivo para la nanoterapia utilizando al NTS-poliplex.

Gas1 es una molécula que induce arresto celular y apoptosis en diferentes células tumorales [21, 150] incluyendo líneas celulares de glioma [22, 23] y cultivos primarios de glioma humano [25]. Gas1 induce apoptosis por medio de la inhibición de la vía de señalización de RET e induciendo la activación de la caspasa 9 y 3 [4]. Previamente se desarrolló una estrategia de terapia génica basada en una forma truncada y soluble de Gas1 recombinante, denominada tGas1, que induce muerte celular en modelos de terapia génica de cáncer de mama y de glioma [14, 97, 105]. La cuantificación por ELISA confirmó la presencia extracelular de tGas1 en el medio condicionado de las células C6 previamente transfectadas con el transgén *tGas1* por medio del NTS-poliplex, asimismo se comprobó por la técnica de MTT que tGas1 disminuyó la viabilidad celular en las células de glioblastoma de manera paracrina. El uso de moléculas solubles pro-apoptóticas es una estrategia que se utiliza para obtener una distribución extensa del agente terapéutico después de su secreción por las células productoras [151]. La ventaja del NTS-poliplex para entregar a tGas1 para un potencial tratamiento en gliomas es que las células sanas de la astrogía no son transfectadas y de esta manera se dirigen selectivamente a células tumorales, lo que confiere seguridad al sistema de transfección. Conjuntamente, el uso del promotor para la proteína GFAP [22, 152] podría incrementar la seguridad y especificidad del sistema ya que impediría la expresión de tGas1 en neuronas que expresan e internalizan de manera endógena a los receptores NTSR1 o a los NTSR2/vNSTR2.

Conjuntamente, en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio meticuloso sobre la localización de Gas1 soluble endógeno en fluidos corporales de la rata adulta el cual proveyó la primera descripción de dicha proteína en el LCR y su expresión en el plexo coroideo.

Gas1 es una proteína de 37 kDa que cuando se expresa de manera endógena se ancla a la membrana celular por un grupo GPI [6, 7] y una característica común de este tipo de proteínas es que pueden liberarse de la célula y estar presentes en el espacio extracelular de forma soluble [94], pero solo hay un reporte que describe una forma soluble de Gas1 endógeno en la orina y en el suero sanguíneo de rata [96]. Dado que no existen reportes de Gas1 soluble en el SNC al menos de roedores, decidimos explorar si dicha proteína está presente en el LCR de la rata adulta.

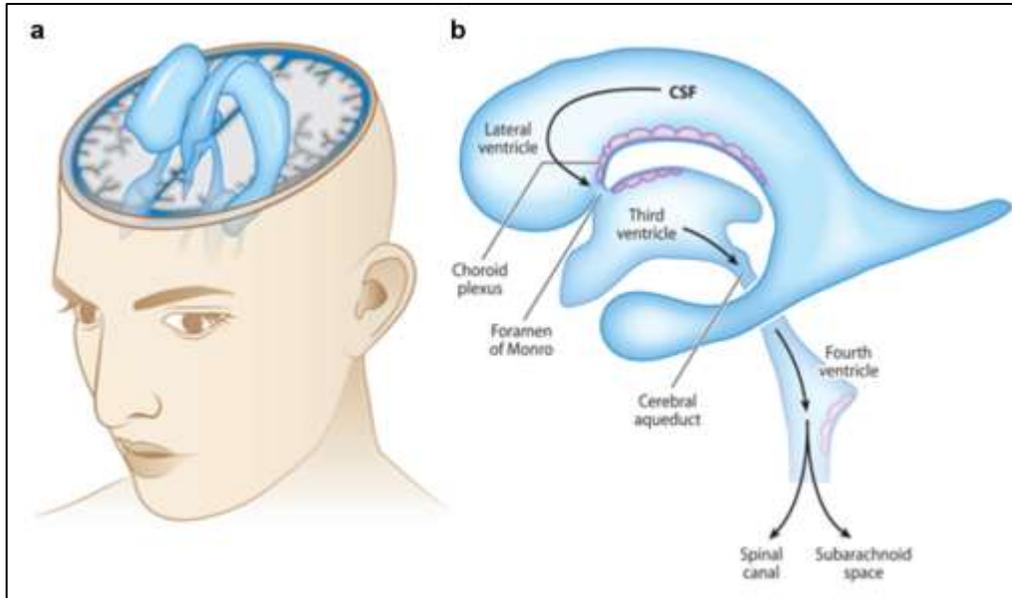
Primero, se comprobó que la línea celular NIH/3T3 libera Gas1 soluble al medio de cultivo. Aunque es bien sabido que estas células expresan a Gas1 bajo condiciones de arresto celular [7, 120] aún no se había probado si eran capaces de secretar a Gas1 de manera endógena. Asimismo, encontramos que la mejor condición para obtener altas concentraciones de Gas1 extracelular es cuando las células entran en arresto celular al alcanzar la confluencia total, esta condición fue la que se eligió para inmunoprecipitar a Gas1 del medio de cultivo debido a que presenta la mayor concentración de la proteína en los sobrenadantes y porque hay pocas células muertas en el cultivo celular.

Otro descubrimiento importante es que las células NIH/3T3 produjeron 2 isoformas solubles de Gas1. Cuando se inmunoprecipitó a Gas1 del medio condicionado se observaron 2 bandas, una de 37 kDa y otra de 34 kDa mientras que en la inmunoprecipitación del extracto celular solo se apreció una banda de 37 kDa. Este resultado sugiere que las dos isoformas de Gas1 se producen afuera de la célula y no intracelularmente, excluyendo la posibilidad de que estas dos isoformas se deban a un proceso distinto de N-glicosilación de la proteína el cual es un proceso que se lleva a cabo dentro de la célula [153]. Es probable que la isoforma de 37 kDa encontrada en el medio condicionado sea producida por una fosfolipasa puesto que es bien sabido que las fosfolipasas C (PLC) y D (PLD) pueden cortar a este tipo de proteínas en el grupo fosfato del fosfatidilinositol (PI) produciendo proteínas solubles con el mismo peso molecular que la proteína anclada a la membrana [94, 95]. Respecto a la isoforma corta (~34 kDa) de Gas1 podría ser que una proteasa es la responsable de producirla, se puede sugerir que las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM) 10 y 17 son las responsables de producir esta forma soluble de Gas1 puesto que se ha demostrado que participan en este proceso [96], no obstante, se necesitan estudios posteriores para determinar si estas enzimas pueden producir la forma corta de Gas1 soluble. Se puede correlacionar que las 2 isoformas de Gas1 que se liberan son producidas por las mismas proteínas que producen las 2 isoformas solubles de GFR $\alpha$ 1, una proteína anclada a GPI la cual comparte una similitud estructural alta con Gas1 [9, 16]. Estas isoformas de GFR $\alpha$ 1 conservan sus propiedades de señalización activando a RET

de manera paracrina [93, 154, 155]. Entonces, es muy probable que ambas isoformas solubles de Gas1 preserven sus propiedades de señalización puesto que se ha reportado que tanto una forma soluble endógena (~37 kDa) como una forma soluble recombinante (~34 kDa) inducen arresto celular tanto en células mesangiales como en células cancerígenas respectivamente [14, 15, 96, 105, 156], promoviendo así un equilibrio entre la señalización de Gas1 y GFR $\alpha$ 1 sobre las células.

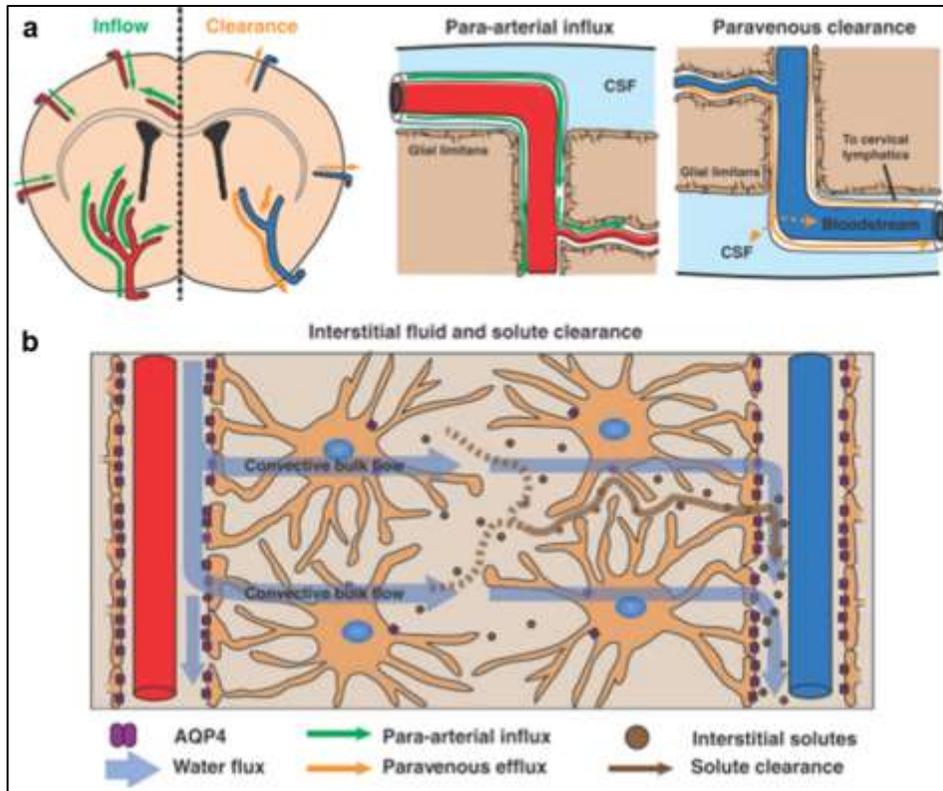
Después de mostrar que el anticuerpo utilizado detectó a Gas1 soluble de ratón se decidió probar el mismo anticuerpo en tejido de rata. Se resolvió utilizar un modelo de rata para los siguientes experimentos debido a que es más fácil obtener sus fluidos corporales y también mayores volúmenes de éstos en comparación de un modelo de ratón. Se observó que los extractos de cerebro de rata contienen Gas1 y que lo expresaron con un peso molecular de 37 kDa al igual que el control positivo, células de ratón NIH/3T3 en arresto celular, confirmando que se puede ocupar el mismo anticuerpo para detectar a Gas1 tanto en ratón como en rata. Además se confirmó por ELISA los niveles de Gas1 en las diferentes edades de los cerebros de rata el cual el P0 es cuando se expresa una mayor cantidad de la proteína, estos resultados son similares a resultados previamente descritos en cerebro de ratón [121, 122].

A continuación, se comprobó que Gas1 soluble está presente en la orina, el plasma sanguíneo y por primera vez en el LCR de la rata adulta. Ya se había descrito previamente la presencia de Gas1 en la orina y el suero sanguíneo [96], esta información nos sirvió para utilizar estos fluidos corporales como controles positivos. La orina tuvo los niveles más altos de Gas1, pero esta concentración no muestra la concentración o producción momentánea de Gas1 ya que la orina se colectó 12 horas después de que la rata estuvo produciendo distintas expulsiones de este fluido a lo largo de toda la noche, en cambio tanto el plasma sanguíneo como el líquido cefalorraquídeo se obtuvieron cuando estaban circulando en el cuerpo y lo interesante es que no hubo diferencia significativa en la concentración de Gas1 entre estos dos fluidos corporales. Este resultado sugiere la importancia de mantener una concentración isotónica de Gas1 entre el LCR y la sangre. Es un dato importante saber que Gas1 está presente en el LCR pero el mecanismo por el cual está ejerciendo una función en el SNC a través de este fluido aún está pendiente de solucionar. El LCR es un fluido incoloro que se produce en los plexos coroideos y que fluye a través de todo el sistema ventricular y en el espacio subaracnoideo entre el encéfalo y el cráneo y/o entre la médula espinal y la columna vertebral para finalmente ser reabsorbido en las microvellosidades del espacio subaracnoideo [157], figura 21.



**Figura 21.** Esquema del sistema ventricular y del flujo del LCR en el humano adulto. (a) Corte transversal del cerebro mostrando el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo rellenos de LCR (azul). (b) El LCR se genera principalmente en los plexos coroideos localizados en cada uno de los ventrículos y baña a los cuatro ventrículos, al espacio subaracnoideo y al canal central. El flujo del LCR parte de los ventrículos laterales hacia el tercer ventrículo a través del foramen de Monro, luego fluye al cuarto ventrículo a través del acueducto de Silvio/cerebral el cual continúa hacia el canal central o fluye hacia el espacio subaracnoideo por medio de los agujeros de Luschka y Magendie. Imagen modificada de Lehtinen M. [2]

Anteriormente se creía que el LCR solo se podía encontrar en el sistema ventricular y en el espacio subaracnoideo [158], de tal manera que Gas1 soluble solo estaría señalizando en aquellas células que están en contacto directo con el LCR. Recientemente se ha demostrado que el LCR puede penetrar todo el parénquima cerebral a través de un mecanismo denominado sistema glinfático [159], en el cual el LCR recorre las grandes arterias de manera para-vascular y luego logra entrar al parénquima cerebral a través de los pies de los astrocitos de manera transcelular por medio de las aquoporinas-4 y de forma paracelular entre los pies de los astrocitos, después, el LCR sale del parénquima cerebral por el mismo mecanismo pero por los astrocitos que están en cercanía con las grandes venas y por último el LCR viaja de manera para-venosa hasta llegar al espacio subaracnoideo, figura 22 [1, 160]. Por lo tanto, se sugiere que Gas1 soluble puede estar ejerciendo sus funciones en el SNC por medio del LCR y del sistema glinfático.



**Figura 22.** Representación esquemática del sistema glinfático. (a) El LCR entra al cerebro a lo largo de rutas para-arteriales y sale del cerebro a lo largo de rutas para-venosas, siempre por fuera de los vasos sanguíneos. (b) La entrada y salida del LCR al parénquima cerebral es facilitada por las Aquoporinas-4 que se encuentran en los pies de los astrocitos, los cuales están en cercanía con los vasos sanguíneos. Por último, el LCR sale junto con el líquido intersticial por la ruta para-venosa hacia el espacio subaracnoideo para su subsecuente reabsorción. Imagen modificada de Iliff J. [1]

Es importante realizar experimentos adicionales para determinar si el Gas1 soluble que está presente en el LCR puede interactuar y señalizar a través de la ruta de señalización de GDNF en una manera similar a como lo hace el GFR $\alpha$ 1 soluble [93, 154, 155], pues se sabe que Gas1 inhibe la señalización mediada por GDNF [4, 16, 17]. Además, hay evidencia que muestra que GDNF está presente en el LCR durante condiciones patológicas del SNC [161, 162] por lo que sería interesante determinar los niveles de Gas1 en el LCR en modelos experimentales y/o en pacientes con enfermedades neurológicas.

Respecto a la señalización relacionada con Shh y Gas1 [5, 12, 18], es probable que Gas1 soluble interactúe con Shh y module su señalización ya que Shh aún está presente en el cerebro de roedores adultos y preserva sus propiedades de señalización en células troncales [163-165] y progenitores neuronales [166]. Si este es el caso, entonces Gas1 soluble tendría un rol importante en la neurogénesis

del adulto puesto que se sabe que el LCR es un fluido importante para que se lleve a cabo este fenómeno biológico [2, 167, 168].

Está ampliamente descrito que la mayoría de las proteínas que están presentes en el LCR provienen de la filtración del plasma sanguíneo llevada a cabo por el plexo coroideo [169-171], pero también se sabe que hay menos del 0.5% de proteínas en el LCR cuando se compara con el plasma sanguíneo [123], es por esto que resulta difícil pensar que grandes cantidades de Gas1 pasan del plasma sanguíneo al LCR hasta mantener concentraciones iguales en ambos fluidos corporales. La otra fuente de proteínas en el LCR se produce en el mismo plexo coroideo [171, 172], entre esas proteínas está el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) [123, 173]. El plexo coroideo es la interfaz entre la sangre y el LCR, se encuentra en los cuatro ventrículos cerebrales y es visto como un epitelio que encierra a un estroma altamente vascularizado [174]. Nosotros demostramos por RT-PCR e inmunofluorescencia que el plexo coroideo de los ventrículos laterales (VL) y del tercer ventrículo (3V) de la rata adulta expresan Gas1. Interesantemente, aún se encontró expresión de Gas1 en la ZV/ZSV con un patrón de expresión similar al reportado en etapas tempranas del desarrollo del ratón [121], lo que sugiere un rol de Gas1 en la neurogénesis del adulto. Además, la expresión de Gas1 se observó en el plexo coroideo del P0 y P7 lo que apunta a que Gas1 soluble se encuentra también en el LCR de etapas tempranas antes y después del nacimiento.

En seguida, decidimos determinar la población celular específica que expresa Gas1 en PC. Las células epiteliales fueron las primeras células que se evaluaron puesto que se sabe que este tipo celular produce y secreta proteínas al LCR [172]. Se decidió marcar al epitelio contra Claudina-2, una proteína de las uniones estrechas que se expresa en las células epiteliales del PC del adulto [125], y no se observó co-localización con Gas1 en los VL ni en el 3V confirmando al menos por exclusión que Gas1 se expresa en el estroma del PC. El estroma del PC está compuesto principalmente por células endoteliales y en menor medida por una amplia variedad de células, como: pericitos, fibroblastos, telocitos, células troncales, células dendríticas, macrófagos, leucocitos, células de Kolmer y en algunos casos células T [174-176]. En seguida, se examinó si las células endoteliales expresan Gas1 debido a que son el tipo celular predominante en el estroma y además hay un reporte *in vitro* que indica que este tipo celular expresa a Gas1 [177]. Claramente se observaron los vasos sanguíneos del PC al utilizar un anticuerpo contra RECA-1, un marcador específico de células endoteliales [125], pero no se apreció co-localización entre RECA-1 y Gas1 concluyendo que los vasos sanguíneos del PC no expresan Gas1. Posteriormente, se buscó la expresión de Gas1 en los pericitos, este tipo de células envuelven directamente las células endoteliales [124] y hay un reporte que indica que los pericitos del PC responden a Shh y expresan a su receptor, al menos durante el desarrollo [126], pero no observó co-localización entre Gas1 y el marcador de pericitos,

la proteína anti neural-glial (NG2) [126], demostrando que tampoco los pericitos expresan a Gas1. Finalmente, decidimos marcar a los fibroblastos debido a que hay un reporte que indica que esta población celular expresa a Gas1 al menos en el páncreas [128] pero no se apreció co-localización entre Gas1 y  $\alpha$ -SMA, un marcador de fibroblastos, ni en los VL ni en el 3V. Con estos resultados queda aún pendiente determinar el tipo celular específico que expresa a Gas1 dentro del estroma del PC. Aunque demostramos la presencia de Gas1 en el plasma sanguíneo y su expresión en el PC es necesario realizar más estudios para demostrar si el Gas1 que está presente en el LCR proviene de la sangre y/o de algún tipo celular específico del PC.

Al igual que en el LCR se quiso determinar el origen del Gas1 que se encontró en el plasma sanguíneo. Esta es una pregunta muy difícil de contestar puesto que diferentes células y órganos entregan proteínas al plasma sanguíneo. A pesar de eso, se considera que el hígado y las células plasmáticas son los principales productores de proteínas plasmáticas [129-131]. No se detectó expresión de Gas1 en las células plasmáticas pero si se demostró la expresión de Gas1 en el hígado de la rata, confirmando el mismo dato descrito en ratón [13, 132]. Además se observó la expresión de Gas1 con un patrón perivascular, lo que sugiere que las células perivasculares podrían estar liberando a Gas1 puesto que un patrón similar de expresión se ha visto en diferentes tejidos incluyendo el PC [128, 178, 179]. Al igual que el PC, no se observó co-localización entre Gas1 y los marcadores de células endoteliales (RECA-1) ni de fibroblastos ( $\alpha$ -SMA), por lo que se requerirá realizar más estudios para determinar qué células hepáticas perivasculares expresan a Gas1 y si además pueden liberarla al torrente sanguíneo. Adicionalmente, sería interesante estudiar el efecto que tiene el Gas1 soluble sanguíneo para complementar datos previos donde se ha demostrado su participación en eventos fisiológicos como el ciclo estral [180, 181] o en condiciones patológicas como el cáncer [128].

## **11 CONCLUSIONES**

Estos resultados mostraron la presencia funcional de los receptores NTSR2 y vNTSR2 en las células de glioblastoma C6 la cual es útil para desarrollar una terapia génica no viral basada en la utilización en conjunto de Gas1 soluble recombinante y el sistema NTS-poliplex sin afectar a la células sanas residentes de la glía las cuales son las células más abundantes del SNC. Además, la presencia de Gas1 soluble endógeno en fluidos corporales sienta las bases para realizar estudios posteriores y determinar el rol fisiológico que tiene esta proteína soluble tanto en el SNC como en el resto del organismo.

## 12 REFERENCIAS

1. Iff, J.J., et al., *A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(147): p. 147ra111.
2. Lehtinen, M.K. and C.A. Walsh, *Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 653-79.
3. Martinez-Fong, D., et al., *NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(7): p. 1052-69.
4. Zarco, N., et al., *GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway*. *Apoptosis*, 2012. **17**(6): p. 627-35.
5. Izzi, L., et al., *Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation*. *Dev Cell*, 2011. **20**(6): p. 788-801.
6. Stebel, M., et al., *The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein*. *FEBS Lett*, 2000. **481**(2): p. 152-8.
7. Schneider, C., R.M. King, and L. Philipson, *Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells*. *Cell*, 1988. **54**(6): p. 787-93.
8. Hatinen, T., L. Holm, and M.S. Airaksinen, *Loss of neurturin in frog--comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs*. *Mol Cell Neurosci*, 2007. **34**(2): p. 155-67.
9. Schueler-Furman, O., et al., *Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?* *Trends Pharmacol Sci*, 2006. **27**(2): p. 72-7.
10. Dominguez-Monzón, G., González-Ramírez, R. and Segovia, J., *Molecular Mechanisms of Action of Gas1 and its Possible Therapeutic Applications*. *Current Signal Transduction Therapy*, 2011. **6**: p. 106-112.
11. Estudillo, E., et al., *Gas1 is present in germinal niches of developing dentate gyrus and cortex*. *Cell Tissue Res*, 2016. **364**(2): p. 369-84.
12. Allen, B.L., et al., *Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function*. *Dev Cell*, 2011. **20**(6): p. 775-87.
13. Sacilotto, N., et al., *Epigenetic transcriptional regulation of the growth arrest-specific gene 1 (Gas1) in hepatic cell proliferation at mononucleosomal resolution*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23318.
14. Lopez-Ornelas, A., et al., *Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth*. *Cancer Gene Ther*, 2011. **18**(2): p. 87-99.
15. Jimenez, A., et al., *A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model*. *Exp Cell Res*, 2014. **327**(2): p. 307-17.
16. Cabrera, J.R., et al., *Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors alpha and regulates Ret signaling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14330-9.
17. Lopez-Ramirez, M.A., et al., *Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling*. *Int J Dev Neurosci*, 2008. **26**(5): p. 497-503.
18. Martinelli, D.C. and C.M. Fan, *Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling*. *Genes Dev*, 2007. **21**(10): p. 1231-43.
19. Lee CS, B.L., Fan C-M., *Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**: p. 11347-52.
20. Allen, B.L., T. Tenzen, and A.P. McMahon, *The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(10): p. 1244-57.
21. Evdokiou, A. and P.A. Cowled, *Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(4): p. 568-77.

22. Zamorano, A., et al., *Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth in vivo*. Neurobiol Dis, 2004. **15**(3): p. 483-91.
23. Benitez, J.A., et al., *Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas*. Cancer Gene Ther, 2007. **14**(10): p. 836-46.
24. Benitez, J.A., G. Dominguez-Monzon, and J. Segovia, *Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors*. Curr Med Chem, 2008. **15**(8): p. 729-42.
25. Dominguez-Monzon, G., et al., *Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh*. Int J Dev Neurosci, 2009. **27**(4): p. 305-13.
26. Yun, C.O., *Overcoming the extracellular matrix barrier to improve intratumoral spread and therapeutic potential of oncolytic virotherapy*. Curr Opin Mol Ther, 2008. **10**(4): p. 356-61.
27. Ruaro, M.E., et al., *Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity*. FEBS Lett, 2000. **481**(2): p. 159-63.
28. World Health Organization. 2008.
29. American Cancer Society *The History of Cancer*. 2011.
30. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer*. 2007, New York, USA: Garland Science.
31. Tortora, G.J.a.B.D., *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11 ed. 2006, España: Panamericana.
32. Vigneswaran, K., S. Neill, and C.G. Hadjipanayis, *Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification*. Ann Transl Med, 2015. **3**(7): p. 95.
33. Wen, P.Y. and D.A. Reardon, *Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment*. Nat Rev Neurol, 2016. **12**(2): p. 69-70.
34. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
35. Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds, *Brain tumour stem cells*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 425-36.
36. Reardon, C., *Neuro-immune interactions in the cholinergic anti-inflammatory reflex*. Immunol Lett, 2016. **178**: p. 92-6.
37. Zhu, Y. and L.F. Parada, *The molecular and genetic basis of neurological tumours*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 616-26.
38. Gilbert, M.R., *Recurrent glioblastoma: a fresh look at current therapies and emerging novel approaches*. Semin Oncol, 2011. **38 Suppl 4**: p. S21-33.
39. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
40. López-Ornelas, A., *Construcción de vectores lentivirales de expresión regulable con la secuencia truncada de gas1*, in *Farmacología*. 2008: CINVESTAV. p. 67.
41. Kesari, S., *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. Semin Oncol, 2011. **38 Suppl 4**: p. S2-10.
42. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
43. Palma, H., *Capacidad de la línea celular LNM35 de cáncer de pulmón humano para ser transfectada por el NTS-poliplex como un primer abordaje de terapia antitumoral*, in *Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias*. 2010: CINVESTAV. p. 73.
44. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
45. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
46. Holland, E.C., *Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(2): p. 120-9.
47. Bulnes, S., et al., *[Glial stem cells and their relationship with tumour angiogenesis process]*. Rev Neurol, 2011. **52**(12): p. 743-50.
48. Purow, B.W., et al., *Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2353-63.

49. Rasheed, B.K., et al., *Molecular pathogenesis of malignant gliomas*. *Curr Opin Oncol*, 1999. **11**(3): p. 162-7.
50. Roth, W., et al., *Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells*. *Oncogene*, 2000. **19**(37): p. 4210-20.
51. Rozengurt, E., *Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells*. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. **13**(3): p. 128-34.
52. Servotte, S., et al., *The in vitro influences of neurotensin on the motility characteristics of human U373 glioblastoma cells*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2006. **32**(6): p. 575-84.
53. Carraway, R. and S.E. Leeman, *The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(19): p. 6854-61.
54. Reinecke, M., *Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone*. *Prog Histochem Cytochem*, 1985. **16**(1): p. 1-172.
55. Vincent, J.P., J. Mazella, and P. Kitabgi, *Neurotensin and neurotensin receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. **20**(7): p. 302-9.
56. Evers, B.M., *Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues*. *Peptides*, 2006. **27**(10): p. 2424-33.
57. St-Gelais, F., C. Jomphe, and L.E. Trudeau, *The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence?* *J Psychiatry Neurosci*, 2006. **31**(4): p. 229-45.
58. Dupouy, S., et al., *The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers*. *Biochimie*, 2011. **93**(9): p. 1369-78.
59. Carraway, R.E. and A.M. Plona, *Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools*. *Peptides*, 2006. **27**(10): p. 2445-60.
60. Camby, I., et al., *Neurotensin-mediated effects on astrocytic tumor cell proliferation*. *Neuropeptides*, 1996. **30**(2): p. 133-9.
61. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
62. Mustain, W.C., P.G. Rychahou, and B.M. Evers, *The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011. **18**(1): p. 75-82.
63. Souzae, F. and P. Forgez, *Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation*. *Peptides*, 2006. **27**(10): p. 2493-501.
64. Souzae, F., et al., *Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(4): p. 708-16.
65. Maoret, J.J., et al., *Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice*. *Int J Cancer*, 1999. **80**(3): p. 448-54.
66. Moody, T.W., et al., *SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells*. *Peptides*, 2001. **22**(1): p. 109-15.
67. Souzae, F., et al., *Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression*. *Cancer Res*, 2006. **66**(12): p. 6243-9.
68. Elek, J., et al., *Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(1A): p. 53-8.
69. Saada, S., et al., *Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes*. *J Immunol*, 2012. **189**(11): p. 5293-303.
70. Rubio-Zapata, H.A., et al., *NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors*. *Cancer Gene Ther*, 2009. **16**(7): p. 573-84.
71. Hosli, E., S. Stauffer, and L. Hosli, *Autoradiographic and electrophysiological evidence for the existence of neurotensin receptors on cultured astrocytes*. *Neuroscience*, 1995. **66**(3): p. 627-33.

72. Boudin, H., et al., *Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra*. J Neurosci, 1998. **18**(20): p. 8473-84.
73. Trudeau, L.E., *Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors*. Neuroscience, 2000. **97**(2): p. 293-302.
74. Nouel, D., et al., *Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors*. J Neurosci, 1997. **17**(5): p. 1795-803.
75. Nouel, D., et al., *Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors*. Neuroscience, 1999. **94**(4): p. 1189-97.
76. Reubi, J.C., et al., *Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas*. Int J Cancer, 1999. **82**(2): p. 213-8.
77. Lopez-Ornelas, A., *Brain Cancer, Tumor Targeting and Cervical Cancer*, in *Recent Advances in Glioma Gene Therapy* E.K. Salvatti, Editor. 2012.
78. Harrington, K.J., C.M. Nutting, and H.S. Pandha, *Gene therapy for head and neck cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(1): p. 147-64.
79. Benitez, J.A. and J. Segovia, *Gene therapy targeting in the central nervous system*. Curr Gene Ther, 2003. **3**(2): p. 127-45.
80. Karamouzis, M.V., A. Argiris, and J.R. Grandis, *Clinical applications of gene therapy in head and neck cancer*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(6): p. 446-57.
81. Cutter, J.L., et al., *Gene therapeutics: the future of brain tumor therapy?* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(7): p. 1053-64.
82. Baranov, V.S. and A.N. Baranov, *[Gene therapy of monogenic hereditary diseases. Duchenne myodystrophy]*. Vopr Med Khim, 2000. **46**(3): p. 279-92.
83. Zeestraten, E.C., et al., *Addition of interferon-alpha to the p53-SLP(R) vaccine results in increased production of interferon-gamma in vaccinated colorectal cancer patients: a phase I/II clinical trial*. Int J Cancer, 2013. **132**(7): p. 1581-91.
84. Flotte, T.R., *Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 301-5.
85. Waehler, R., S.J. Russell, and D.T. Curiel, *Engineering targeted viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(8): p. 573-87.
86. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(1): p. 35-47.
87. Boulaiz, H., et al., *Non-viral and viral vectors for gene therapy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(1): p. 3-22.
88. Castel, M.N., et al., *Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat*. Neuroscience, 1990. **36**(2): p. 425-30.
89. Martinez-Fong, D., et al., *Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **69**(2): p. 249-62.
90. Navarro-Quiroga, I., et al., *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, 2002. **105**(1-2): p. 86-97.
91. Ishii, N., et al., *Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 8209-16.
92. Castillo-Rodriguez, R.A., et al., *Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97151.
93. Ledda, F., G. Paratcha, and C.F. Ibanez, *Target-derived GFRalpha1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 387-401.

94. Sharom, F.J. and M.T. Lehto, *Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. *Biochem Cell Biol*, 2002. **80**(5): p. 535-49.
95. Elortza, F., et al., *Modification-specific proteomics of plasma membrane proteins: identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins released upon phospholipase D treatment*. *J Proteome Res*, 2006. **5**(4): p. 935-43.
96. van Roeyen, C.R., et al., *Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation*. *Kidney Int*, 2013. **83**(2): p. 251-63.
97. Jimenez, A., et al., *A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model*. *Exp Cell Res*, 2014.
98. Diaz-Coranguez, M., et al., *Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60655.
99. Younes, M., et al., *Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib*. *Oncotarget*, 2014. **5**(18): p. 8252-69.
100. Arango-Rodriguez, M.L., et al., *Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1760**(7): p. 1009-20.
101. Martinez-Fong, D. and I. Navarro-Quiroga, *Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor*. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000. **6**(1-2): p. 13-24.
102. Ayala-Sarmiento, A.E., *Efecto de Gas1 soluble en la terapia génica no viral para gliomas, in Fisiología Celular y Molecular*. 2012, CINVESTAV: Mexico, D.f. p. 48.
103. Alvarez-Maya, I., et al., *In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor*. *Mol Med*, 2001. **7**(3): p. 186-92.
104. Cortez, N., et al., *Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a glial-specific promoter elicit behavioral recovery in experimental parkinsonism*. *J Neurosci Res*, 2000. **59**(1): p. 39-46.
105. Lopez-Ornelas, A., P. Vergara, and J. Segovia, *Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth*. *Cytherapy*, 2014. **16**(7): p. 1011-23.
106. Heuser, J.E. and R.G. Anderson, *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation*. *J Cell Biol*, 1989. **108**(2): p. 389-400.
107. Garcia-Tovar, C.G., et al., *Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain*. *Acta Histochem*, 2001. **103**(2): p. 209-24.
108. Molina-Jijon, E., et al., *Deferoxamine pretreatment prevents Cr(VI)-induced nephrotoxicity and oxidant stress: role of Cr(VI) chelation*. *Toxicology*, 2012. **291**(1-3): p. 93-101.
109. Liu, L. and K. Duff, *A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse*. *J Vis Exp*, 2008(21).
110. Nirogi, R., et al., *A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system*. *J Neurosci Methods*, 2009. **178**(1): p. 116-9.
111. Pegg, C.C., et al., *Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat*. *J Neurosci Methods*, 2010. **187**(1): p. 8-12.
112. Perron, A., et al., *Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(11): p. 10219-27.
113. Sarret, P., et al., *Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(39): p. 36233-43.
114. Gendron, L., et al., *Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(6): p. 1421-30.
115. Evers, B.M., et al., *Neurotensin expression and release in human colon cancers*. *Ann Surg*, 1992. **216**(4): p. 423-30; discussion 430-1.

116. Kitabgi, P., et al., *Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution*. Eur J Pharmacol, 1987. **140**(3): p. 285-93.
117. Schotte, A., J.E. Leysen, and P.M. Laduron, *Evidence for a displaceable non-specific [<sup>3</sup>H]neurotensin binding site in rat brain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1986. **333**(4): p. 400-5.
118. Breunig, M., et al., *Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(36): p. 14454-9.
119. Lv, H., et al., *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*. J Control Release, 2006. **114**(1): p. 100-9.
120. Del Sal, G., et al., *The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression*. Cell, 1992. **70**(4): p. 595-607.
121. Estudillo, E., et al., *Gas1 is present in germinal niches of developing dentate gyrus and cortex*. Cell Tissue Res, 2015.
122. Zarco, N., et al., *Growth arrest specific 1 (GAS1) is abundantly expressed in the adult mouse central nervous system*. J Histochem Cytochem, 2013. **61**(10): p. 731-48.
123. Redzic, Z.B., et al., *The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging*. Curr Top Dev Biol, 2005. **71**: p. 1-52.
124. Lun, M.P., E.S. Monuki, and M.K. Lehtinen, *Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(8): p. 445-57.
125. Kratzer, I., et al., *Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier*. Histochem Cell Biol, 2012. **138**(6): p. 861-79.
126. Nielsen, C.M. and S.M. Dymecki, *Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus*. Dev Biol, 2010. **340**(2): p. 430-7.
127. Emerich, D.F., et al., *A role of the choroid plexus in transplantation therapy*. Cell Transplant, 2005. **14**(10): p. 715-25.
128. Mathew, E., et al., *Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signaling*. Cell Rep, 2014. **9**(2): p. 484-94.
129. Knutti, R.E., et al., *Liver Function and Blood Plasma Protein Formation : Normal and Eck Fistula Dogs*. J Exp Med, 1937. **65**(3): p. 455-67.
130. Miller, L.L., et al., *The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C<sup>14</sup>*. J Exp Med, 1951. **94**(5): p. 431-53.
131. Miller, L.L. and W.F. Bale, *Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globulins by the liver; the use of zone electrophoresis and lysine-epsilon-C<sup>14</sup> to define the plasma proteins synthesized by the isolated perfused liver*. J Exp Med, 1954. **99**(2): p. 125-32.
132. Sacilotto, N., et al., *Growth Arrest Specific 1 (Gas1) Gene Overexpression in Liver Reduces the In Vivo Progression of Murine Hepatocellular Carcinoma and Partially Restores Gene Expression Levels*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132477.
133. Wu, Z., et al., *Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 184.
134. Swift, S.L., J.E. Burns, and N.J. Maitland, *Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 347-56.
135. Schotte, A., W. Rostene, and P.M. Laduron, *Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system*. J Neurochem, 1988. **50**(4): p. 1026-31.
136. Lepee-Lorgeoux, I., et al., *Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **113**(1-2): p. 115-31.
137. Walker, N., et al., *Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(2): p. 193-200.

138. Ahn, S., et al., *Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35518-25.
139. Miller, W.E. and R.J. Lefkowitz, *Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 139-45.
140. Vandebulcke, F., et al., *Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 17): p. 2963-75.
141. DeWire, S.M., et al., *Beta-arrestins and cell signaling*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 483-510.
142. Navarro, V., S. Martin, and J. Mazella, *Internalization-dependent regulation of HT29 cell proliferation by neurotensin*. Peptides, 2006. **27**(10): p. 2502-7.
143. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
144. Sobolesky, P.M. and O. Moussa, *The role of beta-arrestins in cancer*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **118**: p. 395-411.
145. Moussa, O., et al., *Novel role of thromboxane receptors beta isoform in bladder cancer pathogenesis*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4097-104.
146. Miggin, S.M. and B.T. Kinsella, *Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1425**(3): p. 543-59.
147. Raychowdhury, M.K., et al., *Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19256-61.
148. Parent, J.L., et al., *Internalization of the TXA2 receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8941-8.
149. Gonzalez-Barrios, J.A., et al., *Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats*. Mol Ther, 2006. **14**(6): p. 857-65.
150. Gobeil, S., et al., *A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene*. Genes Dev, 2008. **22**(21): p. 2932-40.
151. Jeong, M., et al., *Possible novel therapy for malignant gliomas with secretable trimeric TRAIL*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4545.
152. Zamorano, A., et al., *Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis*. J Neurosci Res, 2003. **71**(2): p. 256-63.
153. Aebi, M., *N-linked protein glycosylation in the ER*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11): p. 2430-7.
154. Paratcha, G., et al., *Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts*. Neuron, 2001. **29**(1): p. 171-84.
155. He, S., et al., *GFRalpha1 released by nerves enhances cancer cell perineural invasion through GDNF-RET signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(19): p. E2008-17.
156. Ayala-Sarmiento, A.E., D. Martinez-Fong, and J. Segovia, *The Internalization of Neurotensin by the Low-Affinity Neurotensin Receptors (NTSR2 and vNTSR2) Activates ERK 1/2 in Glioma Cells and Allows Neurotensin-Polyplex Transfection of tGAS1*. Cell Mol Neurobiol, 2015. **35**(6): p. 785-95.
157. Damkier, H.H., P.D. Brown, and J. Praetorius, *Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus*. Physiol Rev, 2013. **93**(4): p. 1847-92.
158. Falcao, A.M., et al., *The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow!* Front Cell Neurosci, 2012. **6**: p. 34.
159. Jessen, N.A., et al., *The Glymphatic System: A Beginner's Guide*. Neurochem Res, 2015. **40**(12): p. 2583-99.
160. Xie, L., et al., *Sleep drives metabolite clearance from the adult brain*. Science, 2013. **342**(6156): p. 373-7.

161. Grundstrom, E., et al., *GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis*. Neuroreport, 2000. **11**(8): p. 1781-3.
162. Sarchielli, P., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor and somatostatin levels in cerebrospinal fluid of patients affected by chronic migraine and fibromyalgia*. Cephalalgia, 2006. **26**(4): p. 409-15.
163. Palma, V., et al., *Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain*. Development, 2005. **132**(2): p. 335-44.
164. Ihrle, R.A., et al., *Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity*. Neuron, 2011. **71**(2): p. 250-62.
165. Alvarez-Buylla, A. and R.A. Ihrle, *Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **33**: p. 105-11.
166. Lai, K., et al., *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 21-7.
167. Lehtinen, M.K., et al., *The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells*. Neuron, 2011. **69**(5): p. 893-905.
168. Sawamoto, K., et al., *New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain*. Science, 2006. **311**(5761): p. 629-32.
169. Saunders, N.R., et al., *Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 742-52.
170. Spector, R., S. Robert Snodgrass, and C.E. Johanson, *A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans*. Exp Neurol, 2015. **273**: p. 57-68.
171. Spector, R., et al., *A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans*. Exp Neurol, 2015. **267**: p. 78-86.
172. Lun, M.P., et al., *Spatially heterogeneous choroid plexus transcriptomes encode positional identity and contribute to regional CSF production*. J Neurosci, 2015. **35**(12): p. 4903-16.
173. Lehtinen, M.K., et al., *The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy*. J Neurosci, 2013. **33**(45): p. 17553-9.
174. Strazielle, N. and J.F. Gherzi-Egea, *Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(7): p. 561-74.
175. Emerich, D.F., et al., *The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain*. Bioessays, 2005. **27**(3): p. 262-74.
176. Bill, B.R. and V. Korzh, *Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 363.
177. Spagnuolo, R., et al., *Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3005-12.
178. Hsu, Y.C., L. Li, and E. Fuchs, *Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration*. Cell, 2014. **157**(4): p. 935-49.
179. Ayala-Sarmiento, A.E., et al., *GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat*. Histochem Cell Biol, 2016. **146**(3): p. 325-36.
180. Guo, K., et al., *Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat*. Biol Reprod, 1998. **58**(3): p. 739-46.
181. Ren, Y.A., et al., *Growth Arrest Specific-1 (GAS1) Is a C/EBP Target Gene That Functions in Ovulation and Corpus Luteum Formation in Mice*. Biol Reprod, 2016.

### 13 ANEXO

Artículos publicados como resultado del proyecto doctoral:

**Ayala-Sarmiento, A.E.**, D. Martinez-Fong, and J. Segovia, *The Internalization of Neurotensin by the Low-Affinity Neurotensin Receptors (NTSR2 and vNTSR2) Activates ERK 1/2 in Glioma Cells and Allows Neurotensin-Polyplex Transfection of tGAS1*. *Cell Mol Neurobiol*, 2015. **35**(6): p. 785-95

**Ayala-Sarmiento, A.E.**, et al., *GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat*. *Histochem Cell Biol*, 2016. **146**(3): p. 325-36