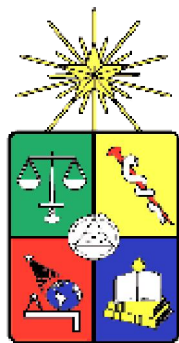


UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares



**SOBREEXPRESIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE
ANGIOTENSINA HOMÓLOGA (ECA2) EN EL CARDIOMIOCITO
MEDIANTE UN VECTOR ADENOVIRAL**

Directores de tesis:

Dr. Sergio Lavandero G.

Mario Chiong Lay.

Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas,

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Lavandero G.

Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

ALEJANDRO ANDRÉS HERRERA MOLINA

Santiago, 2009

AGRADECIMIENTOS

Mis primeros agradecimientos van directamente a todos los Profesores de esta Facultad, quienes me motivaron a nunca conformarme a estudiar lo necesario, sino que siempre esforzarme a saber más y más.

Junto a ellos, a todos los compañeros de carrera que he tenido en esta Escuela, con los cuáles he estudiado. Un saludo especial para Siria, di Meglio, Javier y Nicolás.

Mi primera meta que logré en esta Facultad fue gracias a “Los Crudos”, el año 2005. Gracias a ellos aprendí que con esfuerzo, constancia y el trabajo en equipo es posible lograr grandes triunfos. Saludos a mis amigos Pelao, Osama, Ninja, Mago, Diegol y Sebota. Un saludo especial Mocoperro y Chucky. Y como no, a la siempre fiel “Anti-Barra”, la cual nunca nos apoyó como debía ser, sino que a la manera “Crudo”: a Almeja, Daño y Koala, fundadores de la “Anti-Barra”.

Para un universitario, no todo es estudiar, también lo es conversar y disfrutar la vida. Saludos a Poblete, KBZón y Jaime. Y como no, a doña Nana y don Nano, por ayudarnos a caer en los brazos de Baco.

A todas “Las Niñas”: Vicky, Mariel, Jenny, Lori, Carito, Daniela, Andrea, Mirén. A todas ustedes gracias por soportarnos, a “Los Niños”, y aportar por su belleza, simpatía y amistad.

A Catalina, mi única gran amiga, por enseñarme a nunca rendirme, a perseverar y que todo será mejor (nunca pude entender lo último, pero creo haberlo logrado).

Al LTSM y todos sus integrantes, por ayudarme a entender que el mundo de la Ciencia amerita un constante aprendizaje y rigurosidad. Saludos especiales a David, Fidel, Rodrigo y Cristóbal. Y a mi Profesor guía, Mario Chiong. Gracias Profe..!!!

A los Proyectos FONDECYT 1070662 (Dra. María Paz Ocaranza) y FONDAP 15010006 (Dr. Sergio Lavandero) por el financiamiento de mi Tesis.

Finalmente, a mi Familia, pues todo lo que he logrado en mi vida es gracias a ellos. A mi hermana, por su ayuda. A mi hermano, por mostrarme el camino de la Ciencia. Y especialmente a mi Madre, por darme la vida. Este es mi retribución a ustedes tres. Los amo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVO GENERAL.....	7
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	8
5.1. Reactivos y Materiales	8
5.1.1. Enzimas, reactivos y materiales de biología molecular.....	8
5.1.2. Reactivos y materiales para cultivo celular	9
5.1.3. Animales	9
5.1.4. Reactivos y materiales para la determinación de actividad y niveles proteicos de ECA2.....	9
5.2. Métodos	10
5.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i> DH5 α	10

5.2.2. Cultivo de células HEK 293	10
5.2.3. Obtención de cultivo primario de cardiomiocitos neonatos.....	11
5.2.4. Clonamiento del gen que codifica para ECA2 humano en el vector adenoviral pDC316	12
5.2.5. Purificación de los plasmidios por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.....	17
5.2.6. Obtención de un adenovirus que sobreexpresa ECA2 y de un adenovirus antisentido para ECA2	18
5.2.7. Caracterización de los adenovirus recombinantes.....	22
5.2.8. Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Verificación de la identidad del gen de ECA2 humano	26
6.2. Clonamiento del gen ECA2 humano en un vector adenoviral.....	27
6.2.1 Obtención de pDC316 linearizado	29
6.2.2. Obtención del gen aislado que codifica para ECA2 humano.....	29
6.2.3. Reacción de ligación del inserto de ECA2 humano con pDC316 linealizado.....	30
6.2.4. Obtención del plasmidio recombinante pDC316 / ECA2.....	31
6.2.5. Caracterización de los clones recombinantes.....	32

6.2.6. Determinación del mapa de restricción de los clones pDC316 / ECA2 sentido y antisentido	35
6.3. Amplificación y purificación de los plasmidios pDC316 / ECA2 sentido y antisentido.....	37
6.4. Obtención de adenovirus recombinantes.....	38
6.5 Caracterización de los adenovirus recombinantes	41
6.5.1. Sobreexpresión de la proteína ECA2 humana en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense	42
6.5.2. Sobreexpresión de un antisentido ECA2 en cardiomiocitos por transducción con Ad ECA2 anti	43
6.5.3. Actividad enzimática de ECA2.....	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES.....	52
9. REFERENCIAS	53
10. ANEXOS	58

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de clonamiento del gen ECA2 en el vector adenoviral n PDC316.	28
Figura 2. Compatibilidad de ligación entre los sitios de restricción Xho I y Sal I. ...	31
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de plasmidios purificados a partir de los clones transformantes obtenidos a partir de la mezcla de ligación pDC316 / ECA2.	32
Figura 4. Digestión con EcoRI de los clones sospechosos de ser recombinantes pDC316 / ECA2.	34
Figura 5. Reacción de PCR para ECA2 de clones recombinantes pDC316 / ECA2.	34
Figura 6. Mapas de restricción de los plásmidos pDC316 / ECA2 sentido y antisentido.	36
Figura 7. Electroforesis de los fragmentos de restricción de los plasmidios pDC316 / ECA2 sentido y antisentido.....	37
Figura 8. Esquema para producción de adenovirus recombinantes que contienen el gen ECA2 sentido y antisentido.	39
Figura 9. Determinación de los niveles proteicos de ECA2 producidos por los distintos clones adenovirales en células HEK293.	41
Figura 10. Sobreexpresión de ECA2 en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense.	42

Figura 11. Sobreexpresión de un antisentido ECA2 en cardiomiocitos usando el Ad ECA2 anti.....	43
Figura 12. Actividad enzimática de ECA2 en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense, Ad ECA2 anti y Ad vacío.....	45

ABREVIATURAS

A	: Amperes
A260	: Absorbancia a 260 nm
A280	: Absorbancia a 280 nm
A600	: Absorbancia a 600 nm
Ad ECA2 anti	: Adenovirus que sobreexpresa un antisentido para ECA2
Ad ECA2 sense	: Adenovirus que sobreexpresa ECA2
Ad vacío	: Adenovirus vacío
Ang	: Angiotensina
BNP	: Péptido natriurético cerebral
CV	: Cardiovascular
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DFDVI	: Diámetro del ventrículo izquierdo de fin de diástole
DFSVI	: Diámetro del ventrículo izquierdo de fin de sístole
ECA	: Enzima convertidora de angiotensina I
ECA2	: Enzima convertidora de angiotensina I homóloga
EMBL	: Laboratorio de biología molecular de Europa
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	: Proteína quinasa regulada extracelularmente
FAC	: Fracción de acortamiento
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero de ternero
g	: Gramo
G	: Gravedad
GFP	: Proteína fluorescente verde
GPVI	: Grosor de la pared del ventrículo izquierdo
H	: Hora
HBS	: Amortiguador salino HEPES
HEPES	: Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etanosulfónico
HTA	: Hipertensión arterial
HVI	: Hipertrofia del ventrículo izquierdo
IAM	: Infarto agudo al miocardio
IC	: Insuficiencia cardíaca
iECA	: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I
JNK	: Kinasa N-terminal de c-Jun
L	: Litro
MAP kinasas	: Proteína kinasas activadas por mitógenos
min	: Minuto
mg	: miligramo
µg	: Microgramo
mL	: Mililitro
µL	: Microlitro

mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
µm	: Micrometro
mmHg	: Milímetros de mercurio
MOI	: Multiplicidad de infección
NEP	: Endopeptidasa neutra
ng	: Nanogramo
nm	: Nanómetro
NOS	: Óxido nítrico sintasa
p/v	: Peso/volumen
PAD	: Presión arterial diastólica
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAS	: Presión arterial sistólica
pb	: Pares de bases
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PCR	: Reacción de polimerización en cadena
PMSF	: Fenilmetilsulfonilfluoruro
QTL	: Loci de trato cuantitativo
RAT ₁	: Receptor de angiotensina II subtipo AT1
RAT ₂	: Receptor de angiotensina II subtipo AT2
RIPA	: Amortiguador para ensayo de radioinmunoprecipitación
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: Segundos
SCV	: Sistema cardiovascular
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar de la media
SRA	: Sistema renina-angiotensina
TBE	: Tris-Borato-EDTA
TE	: Tris-EDTA
Tris	: Tri-(hidroximetil)-aminoetano
V	: Volt
VI	: Ventrículo izquierdo
U	: Unidad enzimática
UV	: Ultravioleta

RESUMEN

La enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2) es un nuevo componente del sistema renina-angiotensina-aldosterona que cataliza la hidrólisis de Angiotensina (Ang) I a Ang-(1-9) y de Ang II a Ang-(1-7). Se ha sugerido que esta enzima puede ser un importante blanco terapéutico en el control de las enfermedades cardiovasculares, ya que se ha determinado que tiene acciones antagónicas a la Ang II. Por otra parte, se ha comprobado la utilidad de sobreexpresar diferentes proteínas mediante transferencia genética para estudiar su papel en distintas patologías. El propósito de este trabajo fue construir un adenovirus que sobreexpresara ECA2 humana en los cardiomiocitos de rata neonata y determinar su eficiencia de transducción.

En este trabajo se caracterizó el gen que codifica para ECA2 humana por secuenciación y posteriormente se clonó en el vector adenoviral pDC316. Para ello el gen ECA2 contenido en un fragmento Xho I / Sal I se insertó en el sitio Sal I del vector pDC316. Como resultado se logró obtener dos construcciones, una en orientación sentido y otra en orientación antisentido respecto al promotor de expresión P_{CMV} . Ambos plasmidios se caracterizaron por mapa de restricción y por PCR para ECA2. Después de amplificar y purificar por gradiente de CsCl ambos plasmidios, se procedió a la construcción de los adenovirus. Para ello se cotransfectaron células HEK 293 con pBHGlox Δ E1,3Cre y ambos vectores adenovirales (pDC316 / ECA2 sentido y antisentido). Después de cultivar entre 30

a 40 días se logró generar 8 clones diferentes de adenovirus para ECA2 sentido (Ad ECA2 sense) y 12 clones para el adenovirus ECA2 antisentido (Ad ECA2 anti). Mediante Western blot para ECA2 se determinó que el Ad ECA2 sense se sobreexpresó la proteína ECA2 en células HEK 293 y en cardiomiocitos en cultivo, en forma dependiente de la cantidad de virus usado en la transducción. Debido a que los niveles basales de proteína ECA2 en cardiomiocitos era muy bajo, sólo se pudo evaluar inhibición de la síntesis de ECA2 del Ad ECA2 anti en cardiomiocitos que sobreexpresaron ECA2 mediante transducción con el Ad ECA2 sense. Además, en cardiomiocitos en cultivo a las 48 h de transducción, Ad ECA2 sense aumentó significativamente la actividad enzimática ECA2 a partir de multiplicidades de infección (MOI) 300. Sin embargo, Ad ECA2 anti en estas mismas condiciones no disminuyó la actividad enzimática ECA2 en cardiomiocitos en cultivo.

En resumen, estos datos demuestran que es posible sobreexpresar ECA2 humano mediante vectores adenovirales en cardiomiocitos de rata neonata *in vitro*.

ABSTRACT

Adenoviral Vector-Mediated Angiotensin Converting Enzyme Homologue (ACE2) Overexpression in Cardiac Myocytes from rat.

The angiotensin-converting enzyme homologue (ACE2) is a new component of the renin-angiotensin-aldosterone system, which is responsible of the hydrolysis of Ang I to Ang-(1-9) and Ang II to Ang-(1-7). This enzyme could be an important therapeutic target in the control of cardiovascular diseases because its antagonic actions to Ang II. On the other hand, protein overexpression by genetic transfer has been used as a tool to study different pathologies. Therefore, the goal of this work was to construct an adenovirus to overexpress ACE2 in cardiac myocytes and to determine its transduction efficiency.

In this work the human ACE2 coding gene was sequenced and then cloned into the adenoviral vector pDC316. The ACE2 gene contained in an Xho I / Sal I DNA fragment was inserted in the Sal I site within the pDC316 vector. Two constructs were obtained, one sense with respect to the promoter P_{CMV} and the other in antisense orientation. Both plasmids were characterized by restriction mapping and by PCR. After amplification and CsCl purification, both plasmids were used to construct recombinant adenoviruses. HEK 293 cells were cotransfected with pBHGloxΔE1,3Cre and pDC316 / ECA2 sense or antisense plasmids. After cultivating for 30 to 40 days, 8 different adenoviral clones for adenovirus ACE2 sense (Ad ECA2 sense) and 12 different adenoviral clones for ACE2 antisense (Ad

ECA2 anti) were obtained. Using Western blot, ACE2 overexpression in an Ad ECA2 sense dose dependent manner was detected in both HEK 293 cells and cultured cardiac myocytes. Because the basal levels of ACE2 protein were very low, the inhibition of ACE2 synthesis by As ECA2 anti was evaluated only in cardiac myocytes overexpressing ACE2 by a previous transduction with Ad ECA2 sense. Moreover, ACE2 enzymatic activity was significantly increased in cultured cardiac myocytes transduced for 48 h with Ad ECA2 sense at a multiplicity of infection (MOI) of 300. However, in the same conditions Ad ECA2 anti did not decrease ACE2 enzymatic activity in cultured cardiac myocytes.

Taking together, these results show that human ACE2 can be overexpressed by an adenoviral vector in neonatal rat cardiac myocytes *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) se define como una condición de aumento persistente de la presión arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg y/o de la presión arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg. Afecta a una fracción importante de la población adulta tanto de Chile como en el mundo y es el factor de riesgo cardiovascular (CV) más comúnmente tratado.¹

La HTA produce alteraciones tanto estructurales como funcionales del corazón, arterias y riñón, y es un factor predisponente para insuficiencia cardíaca y renal, infarto al miocardio, remodelado hipertrófico, aterosclerosis y nefroesclerosis.²

Una mayor actividad del sistema renina-angiotensina (SRA), específicamente la vía clásica donde la enzima convertidora de angiotensina (Ang) I (ECA), la Ang II y los receptores de Ang-II, del tipo 1 y 2 (RAT₁ y RAT₂) se han identificado como importantes determinantes implicados en la etiología de la HTA.³ Recientemente, se ha descubierto una vía paralela del SRA,^{4,5} donde la ECA homóloga (ECA2) emerge como un novedoso blanco terapéutico para el tratamiento de la HTA y sus complicaciones.

La ECA2 se ha encontrado mayoritariamente en testículo, riñón y corazón.^{6,7} A nivel celular, se ubica en el epitelio del túbulo renal, cardiomiocitos, endotelio de pequeñas y grandes arterias y musculatura lisa de estos vasos.⁸ La ECA2 presenta un 40% de homología en su dominio catalítico con la ECA.^{9,10} A

pesar de esta similitud, ECA2 difiere de la ECA en su especificidad de sustrato y ausencia de inhibición por inhibidores de la ECA (iECA).^{11,12}

En el SRA, ECA2 compite con la ECA por la hidrólisis del decapeptido inactivo Ang I para formar Ang-(1-9),¹³ por lo tanto, disminuye la cantidad de Ang-I disponible para la formación de Ang II por la acción de la ECA. La ECA2 presenta mayor eficiencia catalítica para hidrolizar Ang-II que Ang-I y formar el péptido vasodilatador Ang-(1-7),¹⁴ el cual también se forma por la hidrólisis de la Ang I por la endopeptidasa neutra (NEP).¹⁵ Por lo tanto, la ECA2 tiene un papel central en el balance de la actividad vasoconstrictora y proliferativa de la Ang-II vía RAT_1 y al aumentar los niveles de Ang- (1-7).¹⁶

La sobreexpresión del gen de ECA2 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kyoto (WKY) mediante la administración intramiocárdica del vector lentiviral de la ECA2 de ratón, mostró una disminución de la PAS de 31 ± 7 mmHg ($p < 0,001$), lo que se asoció a una disminución del 18% en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo (VI) y en la fibrosis perivascular. Además, hubo un aumento del 12% y 21% en el diámetro de fin de diástole del ventrículo izquierdo (DFDV) y de sístole (DFSVI), respectivamente.¹⁷

Debido al carácter multifactorial de la HTA,¹⁸ se ha sugerido que una disminución en la expresión de la ECA2 podría ser un factor predisponente más que causal de la HTA esencial. Los resultados en modelos genéticos sugieren que la ECA2 contrarregula los efectos vasoconstrictores de la Ang-II, en parte, a través de los efectos de la Ang-(1-7). Por lo tanto, la interregulación de la ECA y ECA2 mantendría la homeostasis del SRA al regular dos vías opuestas.

En animales, Ang-(1-7) es un importante regulador de la función CV promoviendo vasodilatación, apoptosis y un efecto antiproliferativo.^{19,20} La Ang-(1-7), a través de su receptor, el producto del oncogen MAS,²¹ estimularía la óxido nítrico sintasa (NOS) y contrarrestaría las acciones de la Ang-II. El efecto de la Ang-(1-7) también podría ser vía su unión al RAT_2 , aumentando la unión de bradicinina a su receptor B_2 .²² Por lo tanto, la inhibición de la ECA podría aumentar los niveles de Ang-(1-7) y simultáneamente disminuir los de Ang-II. Ya que Ang-(1-7) es un potente vasodilatador, su acción contrarrestaría el efecto vasopresor de Ang-II. Por lo tanto, la ECA2 intervendría en la mantención del tono vascular, contrarrestando los efectos derivados de la ECA.²³

En ratones deficientes del gen de la ECA2 (ECA2^{-/-}) hubo una disminución severa de la contractilidad cardiaca y una disminución significativa de las presiones aórtica y ventricular, siendo más severa en ratones adultos machos.²⁴ La disfunción ventricular observada en ratones ECA2^{-/-} se revirtió completamente gracias a una segunda mutación que causó deficiencia del gen de la ECA.²⁵ Esto sugiere la existencia de un importante mecanismo de regulación entre la ECA y ECA2 en el control normal de la función cardiaca. Estas observaciones indican que una mayor expresión de ECA2 en tejido dañado puede ser producto de la participación de ECA2 en mecanismos compensatorios.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en un modelo experimental de infarto agudo al miocardio (IAM) en ratas, donde hay un aumento significativo de la ECA y Ang-II, muestran que en la disfunción ventricular precoz post Infarto Agudo al Miocardio (IAM) (semana 1) hay: a) disminución significativa de la

fracción de acortamiento del VI (FAC), del grosor de la pared del VI (GPVI) y aumento del DFSVI y del DFDVI, con un 27% del perímetro de la pared VI con IAM y; b) aumento significativo de la actividad enzimática de la ECA y ECA2 en plasma y VI y de las razones Ang II/Ang I y Ang-(1-9)/Ang I mientras que disminuyó Ang-(1-7)/Ang-I.²⁶ Sin embargo, a las 8 semanas post-IAM la disfunción en el VI se caracteriza por un aumento del DFSVI e hipertrofia VI (HVI), disminución significativa de la FAC y del grosor de la pared infartada como del área miocárdica de fin de sístole, donde el perímetro del VI con IAM corresponde a un 29% del total de la pared. La activación del SRA a las 8 semanas post-IAM, se asoció con una disminución significativa de la actividad enzimática circulante y en el VI de ECA2 y Ang-(1-7) / Ang-I y un aumento de Ang-II / Ang-I y Ang-(1-9) / Ang-I.²⁷ La actividad miocárdica de la ECA2 se correlacionó con su expresión génica.²⁸ Estos resultados muestran que, el desarrollo de insuficiencia cardiaca (IC) post-IAM afecta la razón entre ECA y ECA2, pues la actividad de ECA2 disminuye progresivamente, mientras la actividad de la ECA aumenta, sugiriendo una respuesta regulada al daño y mecanismos de estrés. Además se encontró mayores niveles de Ang II producto de una mayor actividad de ECA y menor actividad de ECA2.²⁹

Resultados recientes muestran la participación de la ECA2 en la disfunción cardiaca por HTA con aumento de Ang II.³⁰ Se usaron ratones ECA2-/- con o sin HTA por ligación de la aorta y ratones controles ECA2+ con y sin cirugía. Tanto ratones ECA2-/- como ECA2+ no mostraron diferencias en la PAS, masa cardiaca relativa, FAC, DFSVI y DFDVI. Sin embargo, la sobrecarga de presión indujo en

ratones ECA2^{-/-} desarrollo de HVI, dilatación del VI, congestión pulmonar y aumento de la mortalidad post cirugía.³¹ Además de disminuir la FAC y aumentar la expresión del péptido natriurético cerebral (BNP) como los niveles de Ang II cardiaca y la actividad de MAP kinasas como ERK y JNK. La administración de candesartán atenuó la respuesta hipertrófica y suprimió la activación de las MAP kinasas. Los cardiomiocitos de ratones ECA2^{-/-} mostraron un aumento de la actividad MAP kinasa dosis dependiente de Ang II vs cardiomiocitos de ratones ECA2⁺.³² Estos resultados insinúan que la ECA2 podría participar en la protección de la respuesta hipertrófica a la sobrecarga de presión mediada por Ang II.

El conjunto de las observaciones anteriores llevan a proponer que un aumento de la expresión de la ECA2 sería beneficioso para el SCV, mientras que su deficiencia conduciría al desarrollo de diversas patologías, entre ellas la HTA.

Con el objeto de caracterizar el papel de la ECA2 en las enfermedades CVs, y en particular en el remodelado cardíaco, es necesario desarrollar estrategias que permitan alterar exógenamente los niveles de ECA2 en los tejidos. Con este propósito el objetivo de esta memoria consistió en desarrollar un vector adenoviral que sobreexpresara ECA2, de manera de utilizar este vector adenoviral para manipular los niveles de esta enzima en cardiomiocitos de rata neonata.

Los adenovirus son los vectores virales más empleados en terapia génica. Las propiedades de los adenovirus son: 1) un tropismo muy amplio, infectando numerosos tipos celulares; 2) infectan tanto células quiescentes como células en

división; 3) muy alta eficacia de transducción; expresan cantidades altas del transgén; 4) no requieren de integración en su ciclo infectivo y el material génico se expresa de forma episomal; 5) son muy inmunogénicos; 6) su construcción, manipulación y producción son relativamente sencillas, son virus estables y se obtienen títulos altos (10^{11} - 10^{15} partículas virales/ml); 7) no se han descrito patologías graves asociadas al adenovirus salvaje; 8) su toxicidad como vector es baja y su bioseguridad es alta.

2. HIPÓTESIS

La enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2) humana se sobreexpresa en cultivos de cardiomiocitos de rata neonata mediante el uso de un adenovirus recombinante.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un vector adenoviral que porte el gen de ECA2 humano y utilizarlo para sobreexpresar esta enzima en cardiomiocitos de rata de cultivo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Subclonar el gen de la ECA2 humana en un plasmidio adenoviral de 1^o generación.
- 2) Obtener un adenovirus que codifique para ECA2.
- 3) Sobreexpresar ECA2 en cardiomiocitos de rata neonata de cultivo.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Reactivos y Materiales

5.1.1. Enzimas, reactivos y materiales de biología molecular

Las sales, ácidos, bases, detergentes, solventes, agarosa y otros reactivos comunes utilizados fueron de grado analítico o grado biología molecular y se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., EEUU), Merck Química Chilena y Winkler (Stgo., Chile). Las enzimas de restricción Sal I, Xho I, Bgl II, EcoR I y Hind III y las enzimas DNA ligasa de fago T4 y fosfatasa alcalina se obtuvieron de New England BioLabs, Inc. (Ipswich, MA, EEUU). La RNAsa A fue de Sigma Chemical Co. El vector de transferencia pDC316 y el vector que contiene el genoma adenoviral pBHGlox Δ E1,3Cre se obtuvieron de Microbix Biosystems Inc. (Toronto, Ontario, Canadá). En Promega Corporation (Madison, WI., EEUU) se obtuvieron los sistemas comerciales GoTaq[®] Green Master Mix y Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Los reactivos para el medio de cultivo bacteriológico, extracto de levadura, agar y triptona se adquirieron de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, EEUU). Las placas de Petri para cultivo bacteriano se obtuvieron de Greiner Bio-One (Frickenhausen, Alemania). El bromuro de etidio se obtuvo de GIBCO BRL Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU). Los estándares de escalera de DNA de 100 y 1000 pb se obtuvieron de Winckler.

5.1.2. Reactivos y materiales para cultivo celular

En GIBCO BRL se obtuvo suero fetal bovino (FBS) y el suero de ternero (FCS). Las placas de cultivo y los tubos con tapa rosca estériles se obtuvieron de Falcon (Franklin Lakes, NJ, EEUU). Los medios de cultivo (Hank's, DME y M199), pancreatina, 5-bromo-2-deoxiuridina y azul de tripán se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La colagenasa tipo II se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Los tubos de polialómero para ultracentrifugación se obtuvieron de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, EEUU).

5.1.3. Animales

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dowley (2-4 días) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.1.4. Reactivos y materiales para la determinación de actividad y niveles proteicos de ECA2.

En GIBCO BRL se obtuvo el estándar de masa molecular preteñido de proteínas. El reactivo quimioluminiscente para Western blot se adquirió en PerkinElmer Life Sciences, Inc. (Waltham, MA, EEUU). Para la determinación de la actividad, el sustrato fluorescente 7-metoxicoumarina-Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU). Para realizar la

curva estándar para la actividad enzimática, se utilizó el sustrato fluorescente 7-metoxicoumarina-4-acetil-Pro-Leu, de Sigma Chemical Co. El anticuerpo primario anti-ECA2 fue donado por el Dr. Anthony Turner, de la Universidad de Leeds, Reino Unido. Los anticuerpos secundarios anti-Ig G de conejo conjugado con peroxidasa se obtuvieron de Calbiochem (San Diego, CA, EEUU).

5.2. Métodos

5.2.1. Cultivo de *E. coli* DH5 α

El crecimiento de esta cepa y sus derivadas se realizó en medio SOB sólido, con la siguiente composición: 20 g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura, 1g/L de NaCl, 2 mL KCl 250 mM, agar al 1,5% (p/v). Para la selección de las bacterias transformadas con un plasmidio que confería resistencia a ampicilina, el medio SOB se suplementó con el antibiótico ampicilina 100 μ g/mL. Las soluciones stock de antibiótico se prepararon a una concentración de 10 mg/mL y se conservaron a -20°C. Las bacterias se cultivaron en una estufa mantenida a 37°C.

5.2.2. Cultivo de células HEK 293

Células embrionarias de riñón humano (HEK 293) se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm utilizando medio DME que contenía 5% FBS en una atmósfera humedecida con CO₂ 5% y aire 95% e incubadas a 37°C hasta alcanzar un 80% de confluencia, donde fueron traspasadas a nuevas placas. El

traspaso se realizó eliminando el medio de cultivo por aspiración, lavando las células con amortiguador fosfato salino (PBS), agregando 1 mL de tripsina-EDTA (1x) y agitando hasta que se soltaron todas las células. La tripsinización se detuvo agregando 9 mL de medio DME + FBS al 5% y agitando para homogenizar. Se repartió 2 mL de la suspensión celular a una nueva placa y se añadió 8 mL de DME + FBS al 5%. Después de agitar, las placas con las células se cultivaron como se mencionó anteriormente.

5.2.3. Obtención de cultivo primario de cardiomiocitos neonatos.

Se procedió de acuerdo a lo descrito por Foncea y cols.³³ Brevemente, los corazones se removieron y se lavaron en medio Hank's estéril temperado a 37°C, para luego picarlos finamente y homogeneizarlos e iniciar el proceso de digestión con colagenasa tipo II y pancreatina en el mismo medio de cultivo. Los cardiomiocitos recolectados se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio base DME/M199 (4:1), conteniendo FBS al 10% y se incubaron durante 2 horas en placas de cultivo para eliminar los fibroblastos y otros tipos celulares y así obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos. Al cabo de ese tiempo, el sobrenadante se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min, la pella se resuspendió en DME/M199 (4:1) suplementado con FBS al 5% y FCS al 10%. A partir de esta preparación se tomaron alícuotas para determinar la concentración y la viabilidad de los cardiomiocitos a través de la tinción de azul de tripán. Para evitar la proliferación de otros tipos celulares, el medio se suplementó con 100 µM de 5-bromo-2-

desoxiuridina. Los cultivos se mantuvieron en un incubador termorregulado a 37°C en atmósfera humedecida con CO₂ 5% y aire 95%. Se sembraron 1x10⁶ células/pocillo, manteniendo los cultivos en placas que fueron previamente recubiertas con gelatina al 2%.

5.2.4. Clonamiento del gen que codifica para ECA2 humano en el vector adenoviral pDC316

5.2.4.1. Obtención del gen de ECA2 humano.

El gen que codifica para ECA2 humano fue gentilmente donado por el Dr. Anthony Turner, Universidad de Leeds, Reino Unido. Este gen está clonado en los sitios Xho I (5') y Sal I (3') del vector pCI-neo (Promega Corporation). Inicialmente, La identidad del cDNA para ECA2 se verificó por secuenciación. La extracción de este gen se realizó mediante cortes con enzimas de restricción Xho I/Sal I.

5.2.4.2. Linearización del vector pDC316 y su tratamiento con fosfatasa alcalina

La apertura y linearización del vector de clonamiento pDC316 se realizó por digestión con la enzima de restricción Sal I. Posteriormente, el vector linearizado se incubó con 5 UI de fosfatasa alcalina a 37°C durante 15 min, y luego se incubó a 65°C durante 5 min para inactivar a la fosfatasa alcalina, de acuerdo al protocolo indicado por el proveedor (New England BioLabs).

5.2.4.3. Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa

Para recuperar tanto el fragmento linearizado de pDC316 como el gen de ECA2 humano, se siguió el protocolo del sistema comercial Wizard[®] Purification System, Cat. A9281, de Promega Corporation.

5.2.4.4. Ligación del inserto de ECA2 humano en pDC316

Las ligaciones de insertos de DNA con vectores de clonamiento pDC316 se realizaron en un volumen final de 60 μL que contenía 50 μL (40-50 ng) de inserto de ECA2 humano purificado, 1 μL de solución de plasmidio pDC316 (0,48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 3 μL de DNA ligasa de fago T4 (3 U/ μL) y 6 μL de amortiguador de ligación 10x, ambos de New England BioLabs. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 16 h.

5.2.4.5. Transformación de *E. coli* DH5 α

Para transformar las bacterias de *E. coli* DH5 α se utilizó el método de incubación con CaCl₂ a 4°C. Brevemente, a alícuotas de 200 μL de *E. coli* DH5 α competentes suspendidas en CaCl₂ 0,1M, glicerol al 15% se agregó la mezcla de ligación obtenida en el punto 5.2.4.4. Luego, se incubó a 4°C durante 1 h y se sometió a un pulso térmico de 42°C durante 90 s para luego incubarlas a 4°C durante 2 min. Posteriormente, se transfirió esta mezcla a un tubo de vidrio estéril que contenía 2 mL de medio SOB líquido sin ampicilina, y se incubó a 37°C con agitación orbital durante 1 h. Finalmente, se tomaron alícuotas de 200 μL y se

sembraron con rastrillo en placas de cultivo con medio SOB sólido con ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C hasta la formación de colonias individuales (usualmente 24 h).

5.2.4.6. Aislamiento de clones y extracción del DNA plasmidial

Las colonias de *E. coli* DH5 α transformantes se picaron una a una y se pasaron con un asa estéril a placas frescas de SOB con ampicilina. Las bacterias se cultivaron en ese medio durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, con ayuda de un asa estéril se recuperó un poco de bacterias de cada clon desde las placas, se resuspendieron separadamente en tubos Eppendorfs conteniendo 100 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, RNAsa A 0,1 mg/mL) y se incubaron 5 min a 4°C. las bacterias se lisaron agregando 200 μ L de SDS alcalino (NaOH 0,2 M, SDS al 1%), agitación fuerte e incubación durante 5 min a 4°C. El DNA plasmidial se separó precipitando las proteínas y el DNA cromosomal con 150 μ L de solución de alta salinidad (Ácido acético glacial 1,8 M, acetato de potasio 3 M), agitación fuerte hasta formar el precipitado, incubación durante 10 min a 4°C y centrifugación a 12.000 rpm durante 5 min a 4°C. el plasmidio se precipitó mezclando 450 μ L del sobrenadante con 900 μ L de etanol puro preenfriado a -20°C, incubándolo a -20°C durante 30 min, centrifugando a 12.000 rpm durante 5 min y lavando las pellas con 500 μ L de etanol al 70% preenfriado a -20°C. Los DNA plasmidiales de los distintos clones se secaron y se resuspendieron en 50 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, EDTA

1 mM). Para ver si las bacterias se transformaron y contenían los plasmidios recombinantes, se procedió a realizar una electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0,5x de acuerdo al protocolo descrito en 5.2.4.9.

5.2.4.7. Partidores y condiciones para PCR de ECA2 humano

Para detectar la presencia del gen que codifica para ECA2 humano en los plasmidios recombinantes, se utilizó la reacción de polimerización en cadena (PCR) con partidores específicos para ECA2 humano. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: DNA templado, 4 ng; GoTaq[®] Green Master Mix 2X, 12,5 µL; partidores directos y reversos para ECA2 humano, 1 µM de cada uno; agua nanopuro, 10,5 µL. Luego de la desnaturalización a 94°C durante 5 min, la amplificación se llevó a cabo por 40 ciclos de desnaturalización a durante 1 min, de apareamiento de los partidores a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min. La PCR se terminó con una incubación final a 72°C durante 10 min que permitió una extensión completa de los fragmentos amplificados.

Los partidores de ECA2 humano utilizados fueron los siguientes: partidor sentido: 5'-GCTAACGGACCCAGGAAA-3' y, partidor antisentido: 5'-GGCAGAGTCCCAACAATC-3'. Ambos oligonucleótidos se sintetizaron en Invitrogen Life Technologies.

5.2.4.8. Determinación del mapa de restricción para pDC316/ECA2 y determinación de la orientación del gen clonado.

Para la determinación del mapa de restricción se realizó la digestión de los plasmidios recombinantes pDC316/ECA2 en un volumen final de 20 μL que contenía una de las siguientes enzimas de restricción: EcoR I, Hind III, o Bgl II, 1 μL (10.000 U/ μL), amortiguador 10X, 2 μL ; DNA, 10 μL ; agua destilada, 7 μL . La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 16 h. La verificación de la digestión y resolución de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0,5% de acuerdo al protocolo descrito en el punto 5.2.4.9.

5.2.4.9. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los DNA plasmidiales se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparado en TBE 0,5X y bromuro de etidio al 0,001%. Los amplificados de las reacciones de PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% preparado en TBE al 0,5% y bromuro de etidio al 0,001%. Las muestras de DNA se mezclaron con la solución de carga. Se utilizó la escalera de peso molecular de 1.000 pb para resolver los geles de las digestiones con enzimas de restricción y de 100 pb para resolver los geles utilizados para PCR. Los geles se sometieron a 100 V constante utilizando TBE 0,5X como amortiguador de corrida. Las bandas se visualizaron bajo luz UV (320 nm) en un transiluminador Vilbert Lourmat.

5.2.5. Purificación de los plasmidios por ultracentrifugación en gradiente de CsCl

Los clones que contenían los plasmidios recombinantes pDC316/ECA2 sentido y antisentido, respectivamente, se cultivaron en 250 mL de Terrific Broth (triptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L, glicerol 4 mL/L, KH_2PO_4 17 mM y K_2HPO_4 72mM) a 37°C con agitación orbital durante 18 h. Las bacterias se colectaron por centrifugación y se procedió a purificar los plasmidios siguiendo un protocolo similar al descrito en el punto 5.2.4.6., pero utilizando 15 mL de solución de lisis, 30 mL de SDS alcalino, 22,5 mL de solución de alta salinidad y precipitando los plasmidios con 135 mL de etanol puro. Una vez lavados los plasmidios con 50 mL de etanol al 70%, se procedió a secarlos. La pella de plasmidios se resuspendieron en 3,7 mL de TE 1X y se agregó 300 μL de bromuro de etidio 10 mg/mL, se mezcló y centrifugó a 3.500 g durante 2 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de polialómero de 13 x 51 mm conteniendo 4 g de CsCl. Se completó el volumen de cada tubo con TE 1X y se contrapesaron exactamente. Los tubos se colocaron en capachos del rotor “swinging bucket” (SW55Ti Beckman) preequilibrados a 20°C y se ultracentrifugaron a 35.000 rpm durante 24 h. Posteriormente, la banda plasmidial se recolectó pinchando los tubos de polialómero con una jeringa de 5 mL y aguja de 18G x 1’, se depositó en 3 tubos Eppendorf de 1,5 mL estériles y se diluyeron con un volumen de TE 1X estéril. El bromuro de etidio de las soluciones se extrajo agregando un volumen de isopropanol saturado de CsCl y agitando en vórtex para luego centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min a 4°C. Las fases superiores que contenían bromuro de

etidido se eliminaron. Esta extracción se repitió hasta eliminar totalmente el bromuro de etidio de la muestra plasmidial (usualmente se requirió 5 a 6 extracciones). Para eliminar el CsCl, se añadió 2 volúmenes de etanol puro y se incubó 15 min a 25°C. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 25°C. se eliminó el sobrenadante y las pellas se lavaron con 500 µL de etanol al 70% frío. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 25°C y las pellas se secaron. Finalmente, los plasmidios se resuspendieron en 100 µL de agua nanopura y se cuantificó la concentración y pureza de cada plasmidio mediante el cociente A260/A280. La concentración de plasmidio se determina con A260, suponiendo que 50 µg/mL de DNA tiene una absorbancia de 1 a 260 nm.

5.2.6. Obtención de un adenovirus que sobreexpresa ECA2 y de un adenovirus antisentido para ECA2

5.2.6.1. Generación de los adenovirus recombinantes

Los adenovirus recombinantes se generaron cotransfectando los vectores pDC316 recombinantes con el plasmidio pBHGloxΔE1,3Cre en células HEK 293. La cotransfección se realizó a través del método del fosfato de calcio. Normalmente, una placa de 10 cm de diámetro con células HEK 293 80% confluentes, se dividió en dos placas de 6 pocillos y se incubó durante 18 h en medio DME + FBS al 5%. El medio de cultivo se reemplazó por 3 mL de medio DME + FBS al 5% fresco 2 h previas a la transfección. En tubos de 15 mL se mezclaron 24 µg de vector pDC316 silvestre (control para generar adenovirus

vacío), pDC316 recombinante para ECA2 sentido o ECA2 antisentido, más 8 µg de pBHGloxΔE1,3Cre hasta un volumen final de 810 µL en TE 0,1X estéril. Bajo continua agitación con un vortex se añadió 90 µL de CaCl₂ 2,5 M estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, bajo agitación en vortex, se añadió gota a gota 900 µL de HBS 2X (NaCl 280 mM, HEPES 100 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,1). Una vez terminada la adición de HBS se agitó durante 30 s adicionales y rápidamente (en menos de 1 min) se añadió gota a gota 300 µL de la mezcla por pocillo. Cada 48 h se removió la mitad del medio de cultivo y se agregó medio de cultivo fresco (DME + FBS al 5%), hasta completar 40 días o hasta verificar la lisis de la HEK 293 debido a la aparición de los adenovirus recombinantes.

Para verificar que la lisis celular se debía a la presencia de adenovirus, se aplicó 1 mL del sobrenadante del medio de cultivo sobre una placa de HEK 293 60% confluyente que contenía 9 mL de medio DME + FBS al 5%. La presencia de adenovirus produce lisis de las células en 2 a 3 días post-inoculación.

5.2.6.2. Amplificación de los adenovirus recombinantes

La amplificación de los adenovirus se realizó en células HEK 293 cultivadas en placas de 100 mm. Los adenovirus recombinantes se preamplificaron inoculando 1 a 2 placas de HEK 293 80% confluentes con 1 mL de sobrenadante de medio con adenovirus. Las placas se incubaron a 37°C en cámara humidificada con CO₂ 5% y aire 95% por 2 a 3 días hasta que se despegaron más

del 80% de las células. Se recolectaron las células junto con el medio de cultivo en un tubo Falcon con tapa rosca de 50 mL, se lisaron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación, y se centrifugó la mezcla a 3.000 g durante 8 min. El sobrenadante se utilizó para inocular 15 placas de HEK 293 80% confluentes. Estas placas se trataron usando el mismo protocolo anterior. El sobrenadante de estas 15 placas se utilizó para inocular 150 placas HEK 293 80% confluentes. En este caso, al lograrse el 80% de las células despegadas, las células de las 150 placas se recolectaron por centrifugación a 5.000 g durante 8 min en 4 tubos Falcon de 50 mL eliminando el sobrenadante. Después de la última centrifugación, se dejaron en cada tubo 8 mL de medio de cultivo. Las células se lisaron con 3 ciclos de congelación y descongelación, se centrifugaron a 5.000 g durante 8 min y se recolectaron los sobrenadantes.

5.2.6.3. Purificación de los adenovirus recombinantes por doble gradiente de CsCl

Los sobrenadantes con los adenovirus del punto 5.2.6.2. se colocaron encima de los tubos de polialómero de 25 x 89 mm conteniendo una gradiente discontinua de CsCl formada por 8 mL de CsCl 1,4 g/mL y 6 mL de CsCl de 1,2 g/mL. Las células se lavaron con 5 mL de medio de cultivo y se colocaron encima de los tubos de polialómero hasta llenarlos. Los tubos se colocaron en capachos del rotor “swinging bucket” (SW 28 Beckman) preequilibrados a 4°C y se ultracentrifugaron a 100.000 g (23.000 rpm) durante 90 min a 4°C ajustado sin

freno. La banda de adenovirus se recolectó pinchando los tubos de polialómero con una jeringa de 5 mL y aguja de 18G x 1', se depositó en un tubo de polipropileno de 15 mL estéril y se diluyó en TE 1X estéril hasta completar 12 mL.

En un nuevo tubo de polialómero de 25 x 89 mm se generó una gradiente continua de CsCl, utilizando un generador de gradiente mezclando 12 mL de CsCl 1,4 g/mL con 14 mL de CsCl 1,2 g/mL. Sobre esta gradiente se depositó los 12 mL de adenovirus obtenidos de la gradiente discontinua. El tubo se colocó en un capacho del rotor "swinging bucket" (SW 28 Beckman) preequilibrado a 4°C y se contrapesó con un tubo preparado en forma equivalente pero sin virus. Los tubos se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 20 h a 4°C ajustado sin freno. La banda de adenovirus se recolectó nuevamente pinchando el tubo de polialómero con una jeringa de 5 mL y aguja de 18G x 1', y se depositó en una bolsa de diálisis que fue previamente hervida en agua destilada y enfriada. Después de sellar la bolsa de diálisis, los virus se dializaron a 4°C tres veces durante 1 h cada vez contra 330 mL de solución de virus (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2mM, sacarosa al 5% p/v). Al término de la diálisis los virus se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

5.2.6.4. Cuantificación de los adenovirus purificados

La cuantificación de los adenovirus se realizó espectrofotométricamente. Una alícuota de virus se diluyó al doble o 5 veces con amortiguador de lisis de virus (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, SDS al 1% p/v, EDTA 1 mM) y las diluciones se incubaron a 56°C durante 20 min. Como blanco se prepararon las mismas

diluciones pero con el sobrenadante de la diálisis. Las mezclas se diluyeron posteriormente 1:5 y 1:10 y se midió su absorbancia a 260 nm. El número de las partículas virales se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de partículas virales/mL} = A_{260} \times \text{dilución} \times 1,1 \times 10^{12}$$

5.2.7. Caracterización de los adenovirus recombinantes

Los adenovirus recombinantes se caracterizando transduciendo cardiomiocitos y determinando en extractos proteicos de estas células los niveles de ECA2 por Western blot y la actividad enzimática en extractos proteicos de estas células.

5.2.7.1. Transducción de cardiomiocitos de rata neonata

1×10^6 cardiomiocitos en placas de 35 mm se transdujeron con distintas multiplicidades de infección (MOI) de los adenovirus ECA2 sentido y antisentido (Ad ECA2 sense y Ad ECA2 anti, respectivamente). Como control se utilizó un adenovirus vacío (Ad vacío). Las células se incubaron durante 48 h a 37°C en cámara humidificada CO₂ 5%, aire 95%.

5.2.7.2. Western blot de ECA2

Los cardiomiocitos transducidos con los adenovirus se lavaron 3 veces con PBS frío y luego se lisaron con 50 µL de amortiguador RIPA (Tris-HCl 10 mM,

pH 7.2, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 1% p/v, SDS al 1% p/v, deoxicolato de sodio al 1% p/v, leupeptina 2 µg/mL, benzamidina 10 mM, PMSF 1mM, Na₃VO₄ 100 mM). El homogeneizado se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry, se desnaturalizó en solución SDS-PAGE 4X y luego se almacenó a -20°C.

La separación de las proteínas se realizó en geles SDS-PAGE al 10%, de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli y cols.³⁴ Se cargó 30 µg de extracto proteico por cada muestra y un estándar de peso molecular preteñido. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la base del gel.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 µm a 0,45 A durante 90 min. Las membranas se bloquearon con PBS 1X, Tween-20 al 1%, leche sin grasa al 3% p/v durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario para ECA2 humano diluido 1:5.000 en PBS 1X, Tween-20 al 0,1%, leche sin grasa al 3% p/v durante toda una noche a 4°C con agitación suave. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min en PBS 1X, Tween-20 al 0,1% y se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-Ig G de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:5.000 en PBS 1X, Tween-20 al 0,1%, leche sin grasa al 3% p/v.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron con los sustratos Luminol y H₂O₂ (Biological Industries, Israel. Cat. 20-500-BKA) durante 1 min en la reacción “Western Lightning” y se expusieron a la película de fotografía Kodak. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a una densitometría con ayuda del programa computacional UN-SCAN-IT. Se esperan dos bandas, cuya intensidad dependerá del tiempo de exposición de la película, alrededor de 84 y 120 kDa.

5.2.7.3. Determinación de la actividad enzimática de ECA2

La actividad de ECA2 en cardiomiocitos neonatos se determinó según Ocaranza y cols.¹⁷ con modificaciones. Esta técnica se basa en el uso del sustrato fluorogénico 7-(metoxicoumarin-R-P-G-F-S-A-F-K-(Dnp)-OH), donde (Dnp) es un grupo 2,4dinitrofenilo. Brevemente, 1 x 10⁶ cardiomiocitos contenidos en placas de 35 mm se transdujeron con distintos MOI de los Ad ECA2 sense y Ad ECA2 anti. Como control se utilizó un Ad vacío. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C en cámara humidificada CO₂ 5%, aire 95%. Luego, se lisaron con 50 µL de amortiguador para ECA2 (TrisHCl 75 mM a pH 7,5, NaCl 1 M) y se recolectó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, 10 µL de muestra se incubaron con 70 µL de amortiguador para ECA2, 10 µL captopril 10 mM (inhibidor de ECA) y 10 µL de sustrato fluorogénico. Para los controles se utilizó la misma mezcla, adicionándole 10 µL EDTA 100 mM del cual se le restó del amortiguador. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 45 min y, para detener la reacción,

a 100°C durante 5 min. Las muestras se centrifugaron a 13.000 g a 4°C durante 10 min y el sobrenadante se traspasó a una placa de 96 pocillos negra especiales para fluorímetro. En el ensayo, ECA2 remueve la porción dinitrofenilo C-terminal y permite que el grupo 7-metoxicoumarina emita fluorescencia. De esta manera la actividad de ECA2 se determinó como el aumento de la fluorescencia en un espectrofluorómetro BioTeK calibrado a emisión 405 nm y excitación 320 nm, y utilizando el programa computacional Gen5[®]. La actividad ECA2 específica se expresó en fmol de sustrato convertido a producto por unidad de tiempo y normalizado por la concentración de proteínas de cada muestra. La curva estándar se generó usando desde 0 hasta 245 pmoles de 7-metoxicoumarin-4-acetil-Pro-Leu (Sigma, M-0546).

5.2.8. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA usando análisis de Tuckey's. se consideró a un $p < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Verificación de la identidad del gen de ECA2 humano

La identidad del gen que codifica para ECA2 humano clonado en los sitios Xho I (5´) y Xba I (3´) del vector pCI-neo, y que fue gentilmente donado por el Dr. Anthony Turner,²¹ se verificó por secuenciación utilizando los partidores universales T7 y T3 anclados en el vector pCI-neo y los partidores ECA2 sentido 5´-GCTAACGGACCCAGGAAA-3´ y antisentido 5´-GGCAGAGTCCCAACAATC-3´ generados para su amplificación por PCR.

Ejemplos de los resultados de la secuenciación utilizando los partidores T7 y T3 se muestran en el Anexo I y de los resultados utilizando los partidores sentido y antisentido de ECA2 para PCR se muestran en el Anexo II. El Anexo III muestra el alineamiento entre el gen de ECA2 secuenciado y el descrito en el EMBL código de acceso AF241254. Se determinó que la secuencia ECA2 clonada en el vector pCI-neo correspondió exactamente al descrito para el gen ECA2 humano sólo desde el codón de inicio hasta el codón de término del gen estructural. En este vector no se encuentran clonados las secuencias flanqueantes 3´ río arriba y 5´ río abajo del gen estructural descritos en el cDNA completo que codifica para ECA2 humano.

6.2. Clonamiento del gen ECA2 humano en un vector adenoviral

La Figura 1 muestra un esquema del clonamiento del gen ECA2 humano en el vector adenoviral pDC316. La estrategia experimental involucra la linearización del vector adenoviral pDC316 con Sal I, el aislamiento del gen ECA2 del vector pCI-neo por digestión doble con Xho I y Sal I, ligación de los fragmentos purificados e identificación y caracterización de los plasmidios recombinantes. Se espera obtener dos plasmidios, uno con el gen ECA2 clonado en la misma orientación del promotor P_{CMV} del plasmidio pDC316 (sentido) y otro en orientación opuesta (antisentido). La caracterización de los plasmidios recombinantes mediante digestiones con enzimas de restricción permitió distinguir ambos clones.

El vector adenoviral pDC316, un adenovirus de primera generación, fue utilizado debido a que presenta todas las características necesarias para poder realizar una transducción exitosa. Su sitio de clonamiento se encuentra: río abajo del promotor P_{CMV} , el cual permite la expresión del gen en casi todos los tipos celulares y tejidos, y; río arriba del sitio loxP, esencial en el proceso de co-transfección del vector adenoviral recombinante con el resto de su genoma adenoviral (ver punto 6.4).

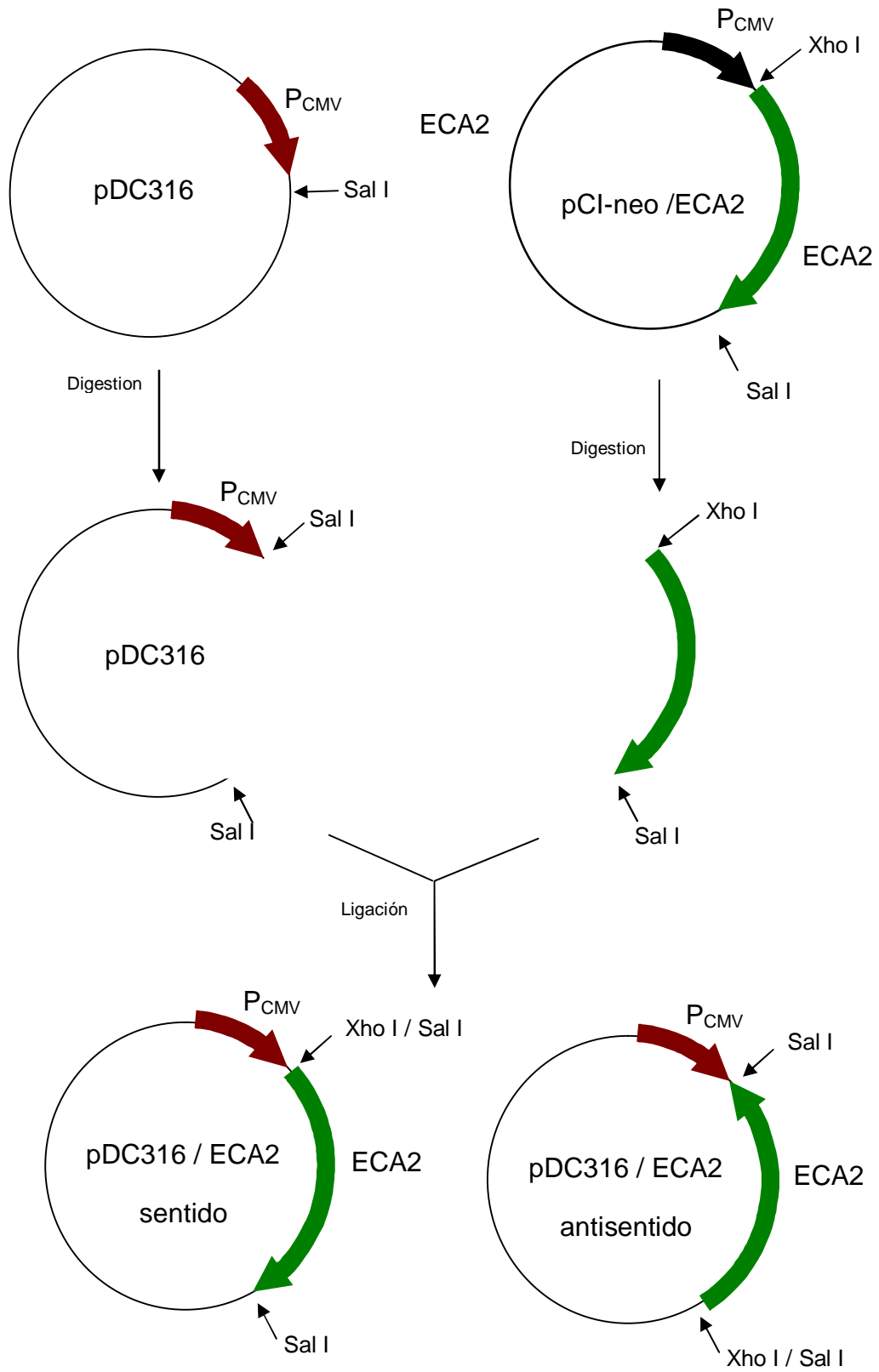


Figura 1. Esquema de clonamiento del gen ECA2 en el vector adenoviral PDC316.

6.2.1 Obtención de pDC316 linearizado

La digestión de pDC316 se realizó con Sal I, debido a que este corte es compatible con los sitios Xho I y Sal I utilizados para aislar el gen de ECA2 humano del vector pCI-neo-ECA2. La digestión de pDC316 con Sal I permitió su linearización generando un fragmento de 3913 pb (dato no mostrado). Este vector se trató con fosfatasa alcalina para remover el fosfato en ambos extremos 5' del DNA. La eliminación de ambos grupos fosfatos impide que este vector linearizado se religue al tratar con DNA ligasa. La única posibilidad para su recirculación es mediante la inserción de un trozo de DNA durante la ligación. Esta estrategia se utilizó para aumentar la probabilidad de obtener clones recombinantes. Posteriormente, el plasmidio linearizado y sin grupos fosfato se purificó utilizando el sistema comercial Wizard®.

6.2.2. Obtención del gen aislado que codifica para ECA2 humano

La digestión de pCI-neo-ECA2 con las enzimas de restricción Xho I y Sal I generó 2 fragmentos, uno correspondiente al vector pCI-neo y el otro correspondiente al cDNA que codifica para ECA2 (Figura 1). El fragmento de cDNA que codifica el gen de ECA2 humano, tiene un tamaño de 2431 pb (dato no mostrado). Este fragmento se separó del vector pCI-neo por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se aisló la banda correspondiente del gel y posterior purificación utilizando el sistema comercial Wizard®.

6.2.3. Reacción de ligación del inserto de ECA2 humano con pDC316 linealizado

La unión entre el vector pDC316 (linealizado con Sal I) y el inserto ECA2 (obtenido por doble digestión Sal I Xho I) es posible debido a que los extremos protuberantes obtenidos con el corte con las enzimas Sal I y Xho I son cohesivos entre sí y por lo tanto son capaces de ligarse. Al producirse esta ligación se pierden los sitios Sal y Xho I originales (Figura 2).

La unión del vector pDC316 con el cDNA para ECA2 humano debería generar un nuevo plasmidio con un tamaño de 6.344 pb. Sin embargo, como principal contaminante de la mezcla de ligación se obtuvo el plasmidio pdc316 vacío de 3.913 pb.

Como se describió en la Figura 1, la ligación del vector pDC316 linealizado con el gen ECA2 humano aislado puede generar dos plasmidios recombinantes. El primero llamado “sentido”, siguiendo el esquema Sal I / Xho I – Sal I / Sal I y, el segundo denominado “antisentido”, siguiendo el esquema Sal I / Sal I – Xho I / Sal I (Figuras 1 y 2). Debido a que ambos plasmidios tienen el mismo tamaño, es imposible diferenciarlos mediante electroforesis en agarosa. Para su diferenciación, se diseñó un procedimiento basado en la generación de un mapa de restricción (ver punto 6.2.6.).

6.2.4. Obtención del plasmidio recombinante pDC316 / ECA2

La mezcla de ligación pDC316 / ECA2 se usó para transformar *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron los clones transformantes por resistencia a ampicilina. De todos los clones obtenidos se purificaron plasmidios y se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la Figura 3 se muestra un gel representativo de este análisis. Se puede apreciar que se obtuvieron plasmidios pDC316 recircularizados, y por lo tanto vacíos, en los carriles 6, 7, 10 y 11, cuyo tamaño fue idéntico al plasmidio pDC316 estándar (carril 2). Los carriles 3, 4, 5, 8,

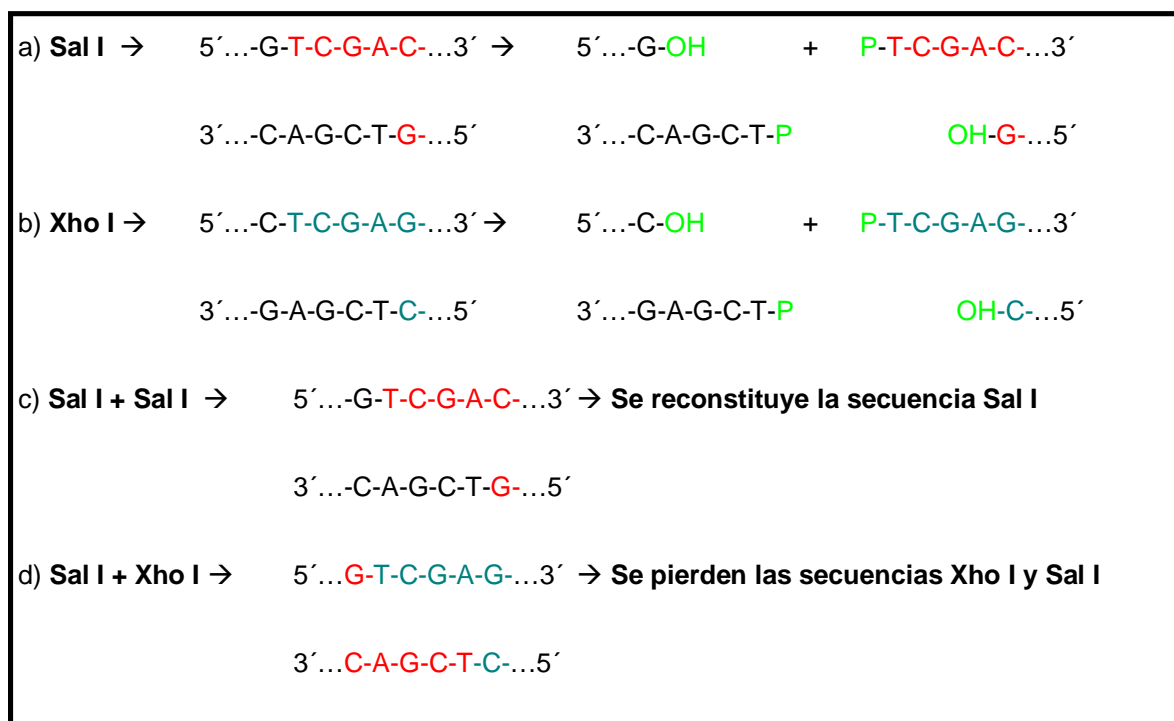


Figura 2. Compatibilidad de ligación entre los sitios de restricción Xho I y Sal I.

a) y b) Secuencias que son reconocidas por Sal I y Xho I, respectivamente. Ambas enzimas generan extremos cohesivos salientes que son idénticos, indicando que son compatibles entre sí. **c)** Al ligarse extremos Sal I con Sal I se reconstituye la secuencia Sal I. **d)** Al ligarse los extremos Sal I con Xho I se pierden las secuencias de reconocimiento para Sal I y Xho I.

9, 12 y 13 corresponderían, de acuerdo al criterio del tamaño, a plasmidios recombinantes pDC316 / ECA2 con un tamaño que se aproxima a los 6.344 pb esperados.

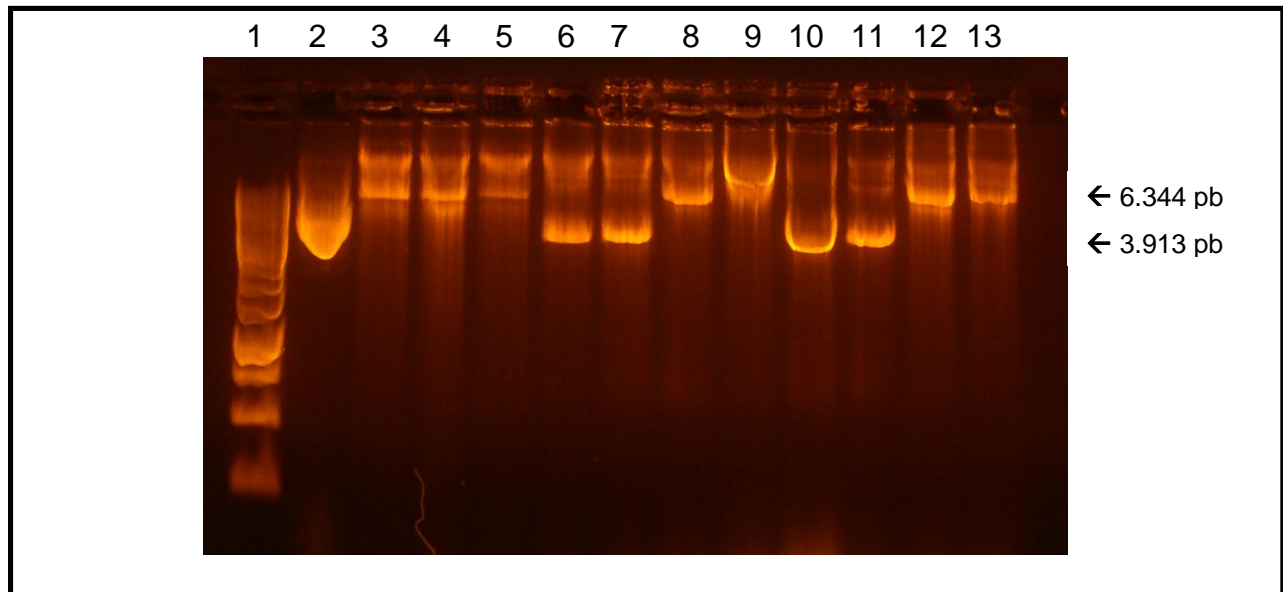


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de plasmidios purificados a partir de los clones transformantes obtenidos a partir de la mezcla de ligación pDC316 / ECA2.

Carril 1: Estándar de tamaño molecular; carril 2: plasmidio control pDC316; carriles 6, 7, 10 y 11 son clones portadores de plasmidio pDC316 vacío; carriles 3, 4, 5, 8, 9, 12 y 13 son clones sospechosos de portar plasmidios recombinantes.

6.2.5. Caracterización de los clones recombinantes

Para identificar cuáles de los plasmidios recombinantes portan el gen ECA2 y además saber cuales el sentido de inserción del gen, se procedió a realizar una digestión de cada uno de los plasmidios con la enzima de restricción EcoR I. Esta enzima corta el vector pDC316 en su sitio de múltiple clonamiento y también hace

un corte dentro del cDNA para ECA2. Si el clon corresponde a un pDC316 / ECA2 clonado en sentido, entonces la digestión debería generar dos fragmentos: uno de 4.513 bp y otro de 1.831 pb. En cambio, si el clon corresponde a un pDC316 / ECA2 clonado en antisentido, entonces la digestión debería generar dos fragmentos de 5.684 pb y otro de 660 pb. En la Figura 4 se puede apreciar que los clones 5, 6, 8, 9, 11, 12 y 13 corresponden a clones pDC316 / ECA2 en el cual el cDNA para ECA2 humano está orientado en sentido, mientras que los clones 3, 4, 7, 10 y 14 son clones pDC316 / ECA2 en el cual el cDNA es antisentido.

Como una manera de confirmar que los clones pDC316 / ECA2 portan el cDNA que codifica para ECA2 se procedió a realizar una reacción de PCR para ECA2 de un clon vacío, un clon sentido y un clon antisentido. En la figura 5 se aprecia que los clones pDC316 / ECA2 sentido y antisentido (carriles 5 y 6, respectivamente) dieron amplificación positiva (indicada con la flecha), cuyo tamaño molecular de 425 bp es idéntico al control positivo generado por amplificación por PCR del plasmidio pCI-neo-ECA2. Por otro lado, a partir del vector vacío pDC 316 no se observa un amplificado para ECA2 (carril 4).

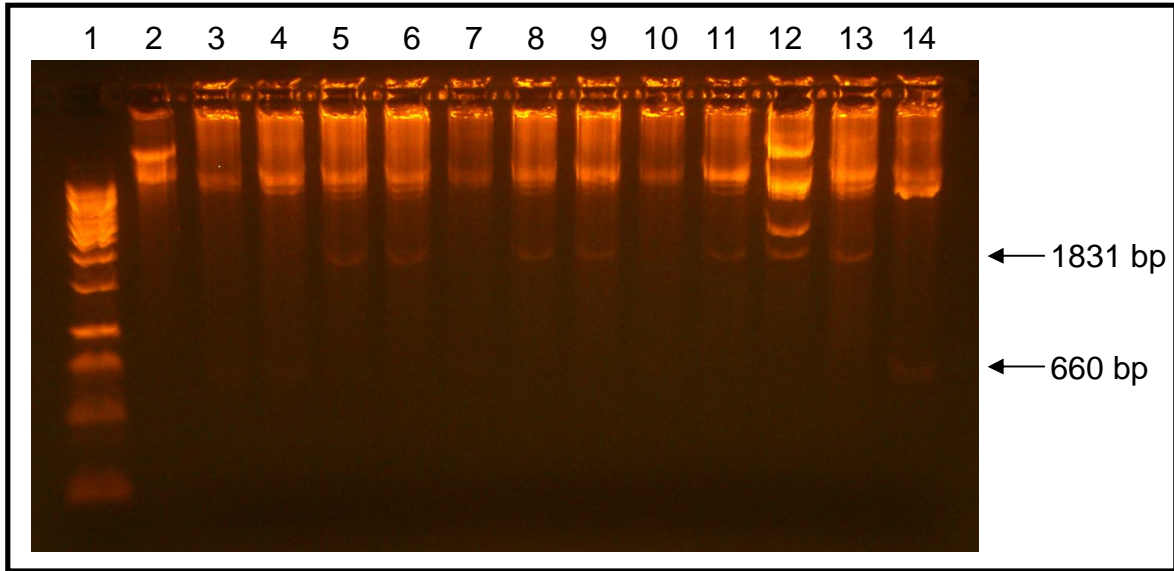


Figura 4. Digestión con EcoRI de los clones sospechosos de ser recombinantes pDC316 / ECA2.

Carril 1: Estándar de tamaño molecular; carril 2: plasmidio control pDC316 / ECA2 sin digerir; carriles 5, 6, 8, 9, 11, 12 y 13 son clones pDC316 / ECA2 sentido; carriles 3, 4, 7, 10 y 14 son clones pDC316 / ECA2 antisentido.

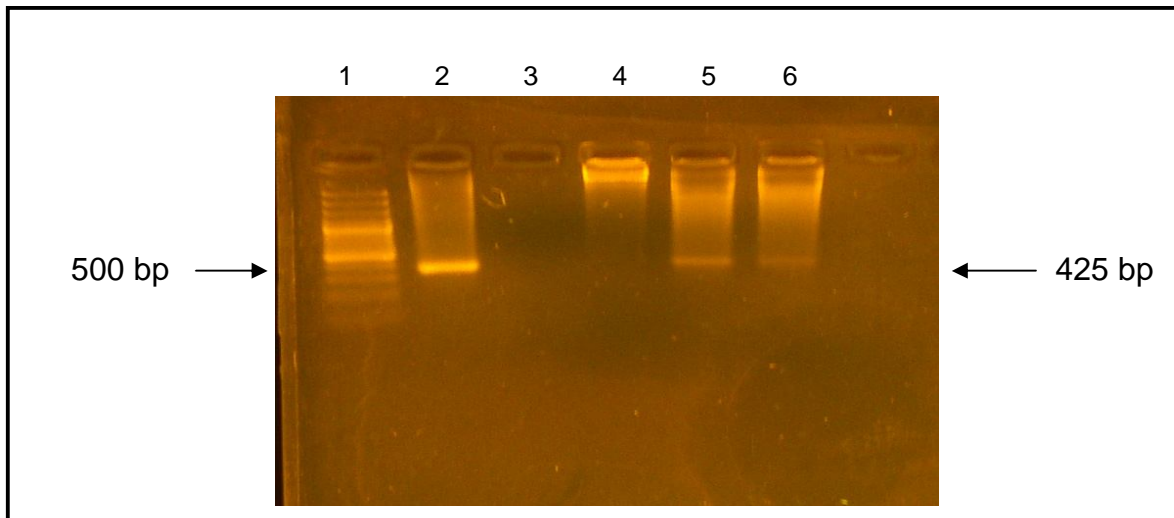


Figura 5. Reacción de PCR para ECA2 de clones recombinantes pDC316 / ECA2.

Carril 1: Estándar de tamaño molecular; carril 2: reacción de PCR de control positivo usando pCI-neo-ECA2; carril 3: blanco de reacción de PCR; carril 4: reacción de PCR con plasmidio pDC316 vacío; carril 5: reacción de PCR con plasmidio pDC316 / ECA2 sentido; y carril 6: reacción de PCR con plasmidio pDC316 / ECA2 antisentido.

6.2.6. Determinación del mapa de restricción de los clones pDC316 / ECA2 sentido y antisentido

La confirmación de la identidad final de los clones pDC316 / ECA2 sentido y antisentido se realizó mediante la confección de un mapa de restricción. Para esto, se utilizó un juego de tres enzimas de restricción: EcoR I, Hind III y Bgl II. Estas enzimas presentan sitios de corte tanto en pDC316 como en el gen de ECA2 humano. Por esto, se espera que una vez realizada la digestión aparezcan dos fragmentos por cada enzima. Los pesos moleculares y los mapas de restricción esperados están descritos en la Tabla 1 y en la Figura 6.

Se puede apreciar en la Figura 7 que los tamaños de los fragmentos de restricción generados por las digestiones con las enzimas EcoR I, Hind III y Bgl II, tanto para los clones pDC / ECA2 sentido como antisentido, corresponden al tamaño teórico predicho por el mapa de restricción de la Tabla I y Figura 6.

Tabla I. Tamaños de los fragmentos (bp) generados por la digestión de pDC316 / ECA2 sentido y antisentido con Eco RI, Hind II y Bgl II.

Modo de ligación	Enzima Restricción	Nº Fragmentos	Fragmento 1 (pb)	Fragmento 2 (pb)
Sentido	EcoR I	2	4513	1831
	Bgl II	2	5820	524
	Hind III	2	6051	293
Antisentido	EcoR I	2	5684	660
	Bgl II	2	4401	1943
	Hind III	2	4082	2262

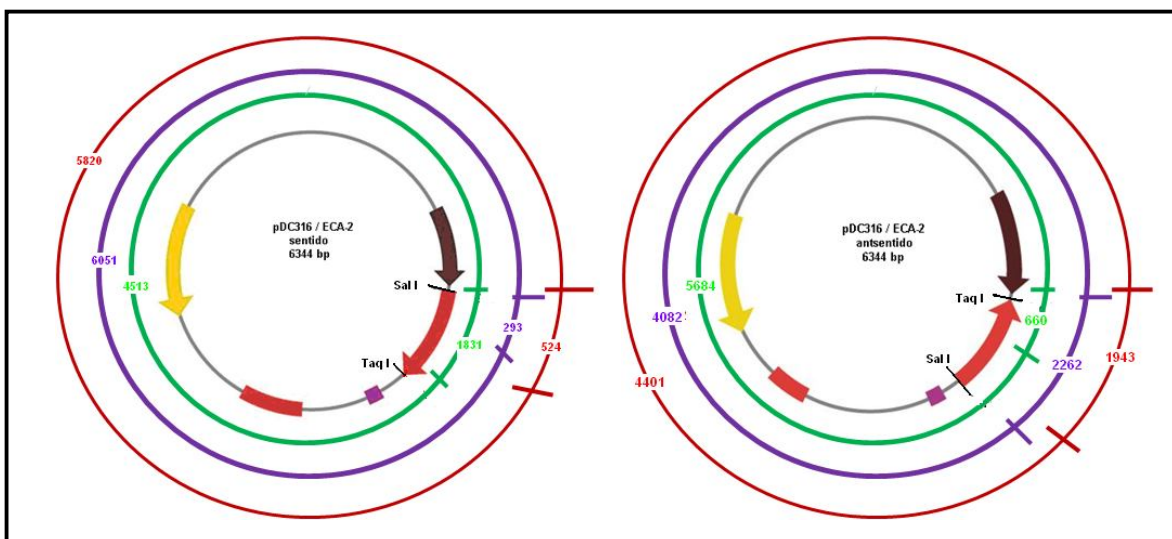


Figura 6. Mapas de restricción de los plásmidos pDC316 / ECA2 sentido y antisentido.

En verde, EcoR I y sus fragmentos; en morado, Hind III y sus fragmentos; en rojo, Bgl II y sus fragmentos. Tamaño de las figuras no son proporcionales.

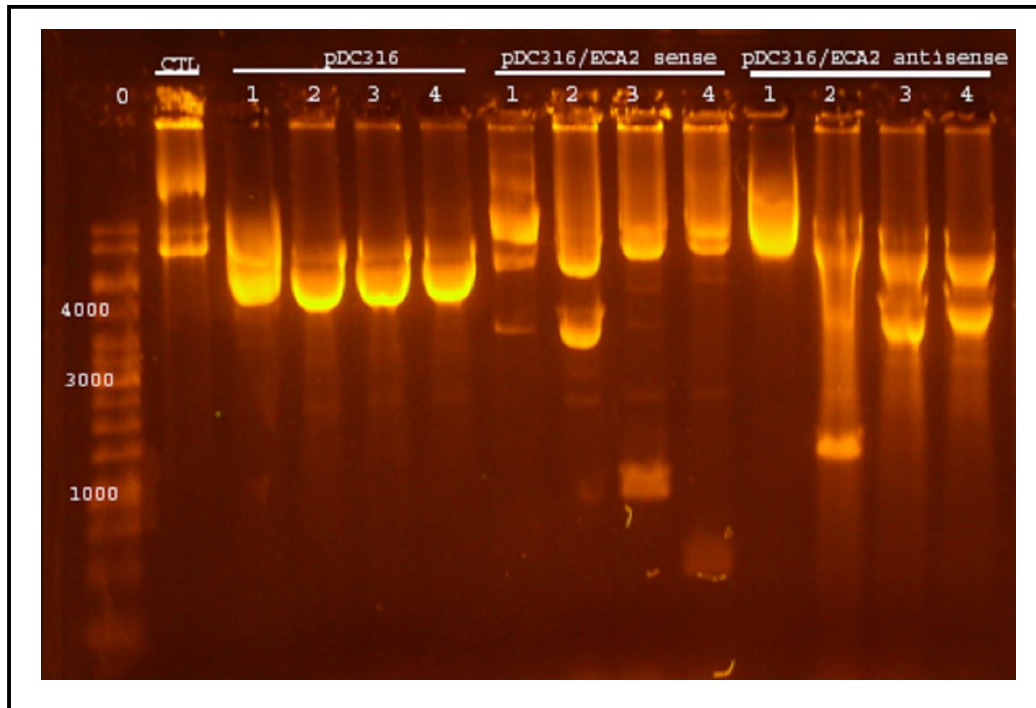


Figura 7. Electroforesis de los fragmentos de restricción de los plasmidios pDC316 / ECA2 sentido y antisentido.

0: Marcador de DNA 1 Kb y pesos moleculares de referencia; CTL: pCI-Neo-ECA2 vacío; 1: DNA sin digestión; 2: DNA digerido con EcoR I; 3: DNA digerido con Hind III; 4: DNA digerido con Bgl II. Cada reacción de digestión se realizó con 10 μ L de DNA y 5 μ L de cada enzima de restricción durante 8 h.

6.3. Amplificación y purificación de los plasmidios pDC316 / ECA2 sentido y antisentido

Una vez corroborada la identidad de los plasmidios pDC316 / ECA2 sentido y antisentido, se procedió amplificarlos y purificarlos por una gradiente de CsCl.

Finalmente, se pudo obtener purificados de pDC316 / ECA2, los cuales fueron cuantificados mediante el cociente de absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}). Se logró obtener 1 mL de solución de cada uno de los plasmidios,

cuyas concentraciones fueron: 0,85 µg/mL de pDC316 / ECA2 sentido, y 4,13 µg/mL de pDC316 / ECA2 antisentido.

6.4. Obtención de adenovirus recombinantes

En la Figura 8 se visualiza un esquema para la producción de adenovirus recombinantes para ECA2, tanto sentido como antisentido. La estrategia experimental involucra la reacción de recombinación entre el plasmidio pDC316 / ECA2 sentido y antisentido con el plasmidio pBHGloxPΔE1,3Cre en células HEK, a través de la recombinación Cre-loxP. Por lo tanto, se espera obtener 2 adenovirus recombinantes diferentes, uno sentido y otro antisentido. Esta reacción es posible gracias a la recombinasa Cre, la cual cataliza la recombinación de los sitios loxP de pBHGloxPΔE1,3Cre y el sitio loxP del plasmidio pDC316, transfiriendo así el gen que codifica para ECA2 hacia pBHGloxPΔE1,3Cre. El adenovirus recombinante así obtenido tiene ahora un solo sitio loxP.

Se realizaron series de 3 experimentos (1 por semana) de 6 placas de cultivo cada uno, 18 placas en total, cotransfectando el plasmidio pDC316 ECA2 sentido con el plasmidio pBHGloxPΔE1,3Cre, y 18 placas más, pero cotransfectando el plasmidio pDC316 / ECA2 antisentido con el plasmidio pBHGloxPΔE1,3Cre. En forma paralela, como control de la generación de adenovirus, se realizó la cotransfección de 18 placas con el plasmidio pDC316 con pBHGloxPΔE1,3Cre, que permitió la obtención de adenovirus vacío (Ad vacío). A partir de los 30 días post-cotransfección comenzaron a aparecer placas que mostraban lisis celular. Con el objeto de determinar que la lisis era debida a la

presencia de partículas adenovirales, 1 mL del sobrenadante de las placas sospechosas se agregaron a placas de 100 mm sembradas con HEK 293 80% confluentes. Los clones positivos produjeron lisis celular al cabo de 2 a 3 días post-transducción. Usando este procedimiento se logró obtener 10 clones de Ad vacío, 8 clones de adenovirus ECA2 sentido (Ad ECA2 sense) y 12 clones de adenovirus ECA2 antisentido (Ad ECA2 anti).

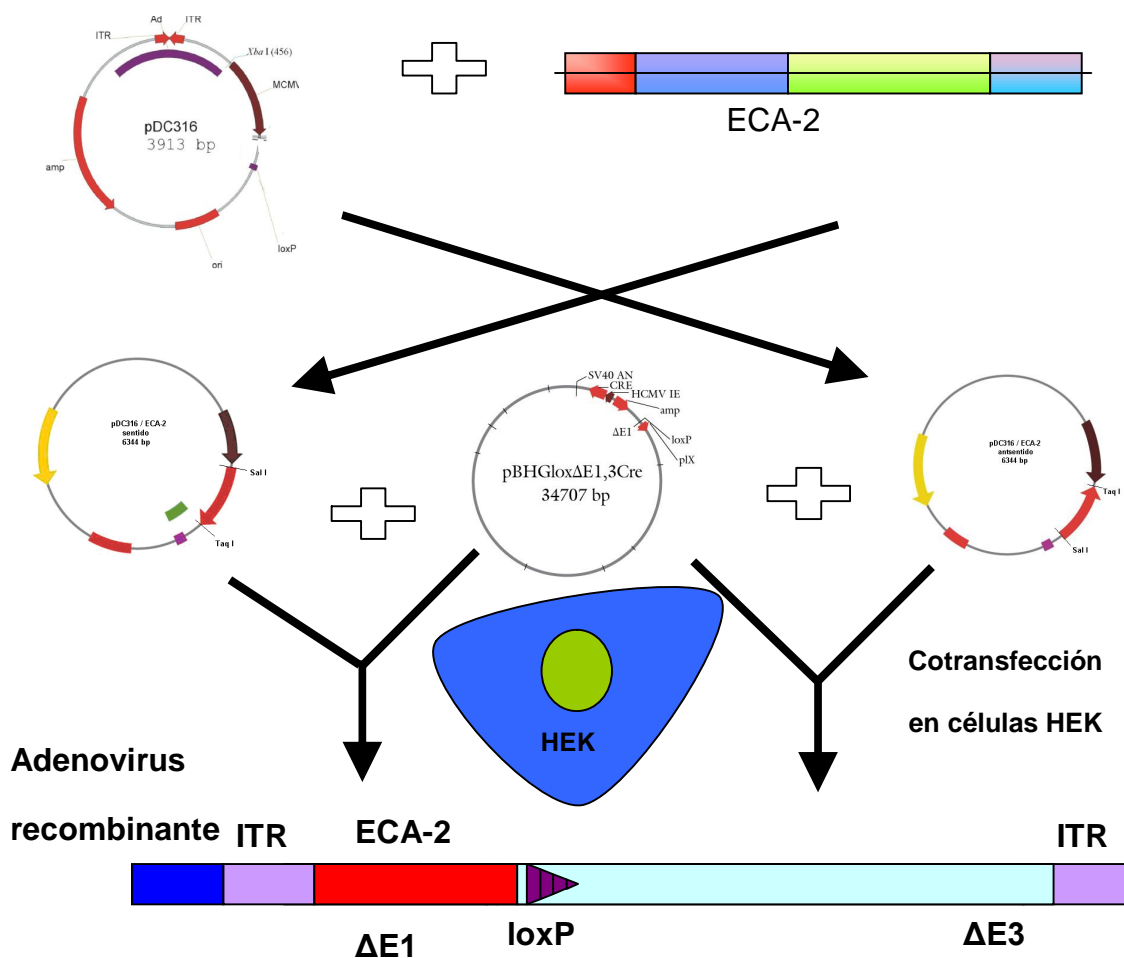


Figura 8. Esquema para producción de adenovirus recombinantes que contienen el gen ECA2 sentido y antisentido.

Con el objeto de determinar los niveles proteicos de ECA2 en los clones adenovirales producidos, se procedió a transducir HEK 293 con estos adenovirus por 24 h y se determinó los niveles de ECA2 en extractos proteicos totales de estas células mediante Western blot. En la Figura 9 se muestra un ejemplo de estos resultados. En los clones de Ad ECA2 anti (carriles 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 y 14) los perfiles de revelados por el Western blot fueron muy similares al observado en células controles sin transducir (carril 1) o transducidos con clones de Ad vacío (carril 2). Sin embargo, en los clones de Ad ECA2 sense (carriles 3, 4, 5 y 8) se detectó una gran sobreexpresión de una proteína inmunoreactiva al anticuerpo ECA2 humano usado para el Western blot (Figura 9).

A partir de los resultados de los Western blot se eligió un clon Ad ECA2 sense y un clon Ad ECA2 anti para ser amplificado y purificado. Ambos adenovirus se amplificaron a gran escala en células HEK 293 de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.2.5.2. y se purificaron con doble gradiente de CsCl de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.5.3. se logró obtener 4,5 mL totales de Ad ECA2 sense $3,59 \times 10^{12}$ partículas virales/mL y 4 mL totales de Ad ECA2 anti $3,14 \times 10^{12}$ partículas virales/mL. La caracterización de ambos adenovirus se realizó utilizando Ad ECA2 sense y Ad ECA2 anti, purificados.

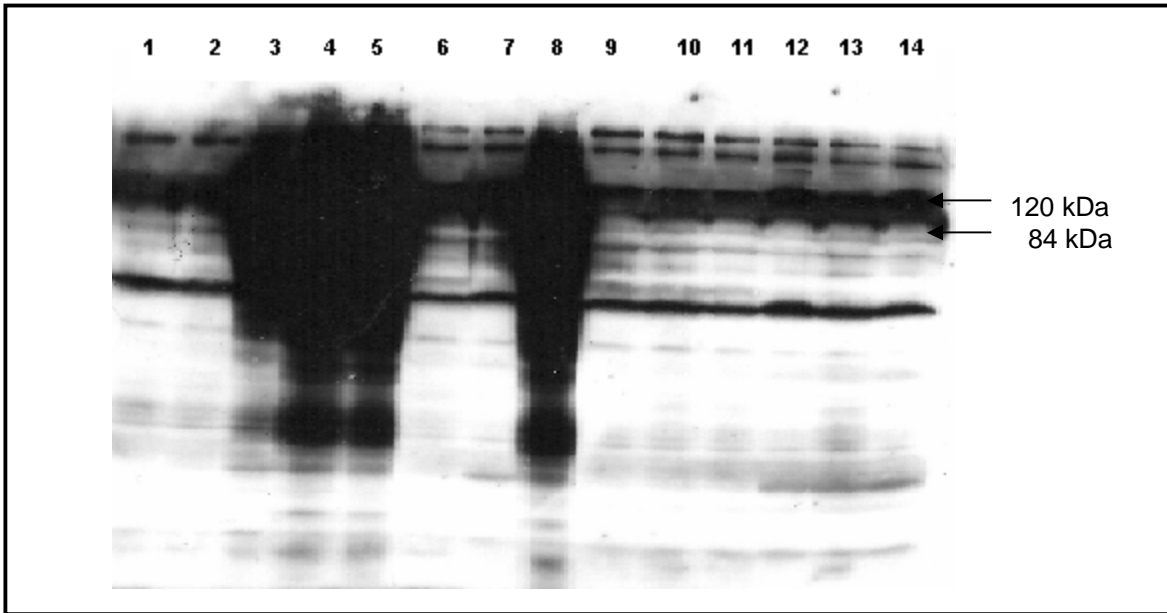


Figura 9. Determinación de los niveles proteicos de ECA2 producidos por los distintos clones adenovirales en células HEK293.

Células HEK293 se transdujeron con los distintos clones adenovirales por 24 h, se cosecharon las células, se extrajo proteínas totales y los niveles proteicos de ECA2 se determinaron por Western blot. Se cargaron 18 μ g de proteínas totales y se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: células HEK293 sin transducir; carril 2: células HEK293 transducidas con Ad vacío; carriles 3, 4, 5 y 8: células HEK293 transducidas con Ad ECA2 sense; carriles 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 y 14: células HEK293 transducidas con Ad ECA2 anti.

6.5 Caracterización de los adenovirus recombinantes

Con el objeto de caracterizar si los adenovirus ECA2 producidos son funcionales, se determinó si los Ad ECA sense y anti eran capaces de sobreexpresar e inhibir la expresión de ECA2, respectivamente. Por otra parte, la cantidad de ECA2 presente en las células transducidas con los adenovirus con los adenovirus debiera correlacionar con su actividad enzimática. Esta caracterización se realizó en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas.

6.5.1. Sobreexpresión de la proteína ECA2 humana en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense

Se obtuvo cardiomiocitos de ratas neonatas de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.2.3. y se sembraron 1×10^6 cardiomiocitos en placas de 35 mm. Los cardiomiocitos se transdujeron de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.2.6.1. con Ad ECA2 sense usando MOI de 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 y 5.000. En la Figura 10 se aprecia que la cantidad de proteína ECA2 aumenta proporcionalmente al MOI empleado. Además, se determinó que el nivel basal de ECA2 en cardiomiocitos en cultivo era muy bajo e indetectable por Western blot en las condiciones ensayadas (ver Figura 10, carril 1).

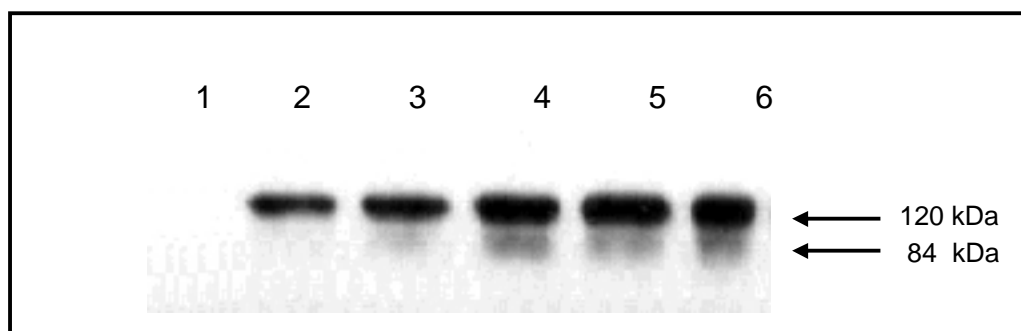


Figura 10. Sobreexpresión de ECA2 en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense.

Cardiomiocitos de rata neonata se transdujeron por 24 h usando MOI=1.000 (carril 2); MOI 2.000 (carril 3); MOI 3.000 (carril 4); MOI 4.000 (carril 5) y MOI 5.000 (carril 6). Como control se ocuparon cardiomiocitos no transducidos (carril 1). Se obtuvieron extractos proteicos totales, 20 μ g totales de proteína de cada extracto se resolvieron por electroforesis en poliacrilamida al 12% y la proteína ECA2 se detectó por Western blot y posterior ECL según lo descrito en Materiales y Métodos.

6.5.2. Sobreexpresión de un antisentido ECA2 en cardiomiocitos por transducción con Ad ECA2 anti

Para determinar si el Ad ECA2 anti tenía efecto disminuyendo la expresión del gen ECA2, se transdujeron los cardiomiocitos en cultivo primero con Ad ECA2 sense usando MOI 1.000, con el objeto de incrementar los niveles basales de ECA2 a niveles susceptibles de ser determinados. Luego, 30 min después, se transfectaron con Ad ECA2 anti usando MOI de 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 y 5.000. la Figura 11 muestra que el Ad ECA2 anti silenció la expresión de ECA2 en forma dependiente del MOI.

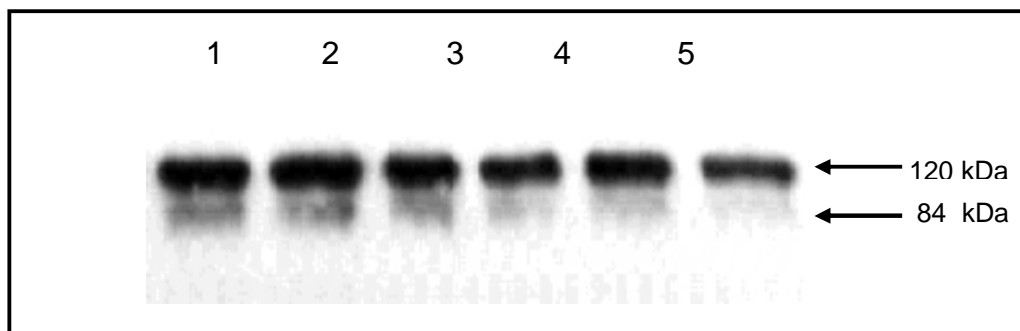


Figura 11. Sobreexpresión de un antisentido ECA2 en cardiomiocitos usando el Ad ECA2 anti.

Cardiomiocitos de rata neonata se transdujeron con Ad ECA2 sense MOI=1000 (carril 1) por 30 min y luego con Ad ECA2 anti usando MOI=1.000 (carril 2); MOI 2.000 (carril 3); MOI 3.000 (carril 4); MOI 4.000 (carril 5) y MOI 5.000 (carril 6). Después de incubar 24 h, se obtuvieron extractos proteicos totales, 20 μ g totales de proteína de cada extracto se resolvieron por electroforesis en poliacrilamida al 12% y la proteína ECA2 se detectó por Western blot y posterior ECL según lo descrito en Materiales y Métodos.

6.5.3. Actividad enzimática de ECA2

La Figura 12 muestra la actividad enzimática de ECA2 en lisados de cardiomiocitos transducidos a distintos MOI de Ad ECA2 sense y Ad ECA2 anti. Como control se utilizó Ad vacío. Después de 48 h de transducción se determinó la actividad enzimática de ECA2 usando un sustrato que al ser proteolizado por ECA2 genera un producto fluorescente, de acuerdo al procedimiento descrito en 5.2.6.3. En cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense se detectó un aumento significativo de la actividad enzimática de ECA2 al usar MOI de 300 ($3,2 \pm 0,6$ veces, $p < 0,05$ vs control) a 10.000 ($3,9 \pm 0,9$ veces, $p < 0,01$ vs control) (Figura 12^a). Sin embargo, Ad ECA2 anti no disminuyó la actividad basal de ECA2 a ninguno de los MOI ensayados (Figura 12B). transduciendo los cardiomiocitos con Ad vacío tampoco se observó cambio en la actividad enzimática de ECA2 (Figura 12C).

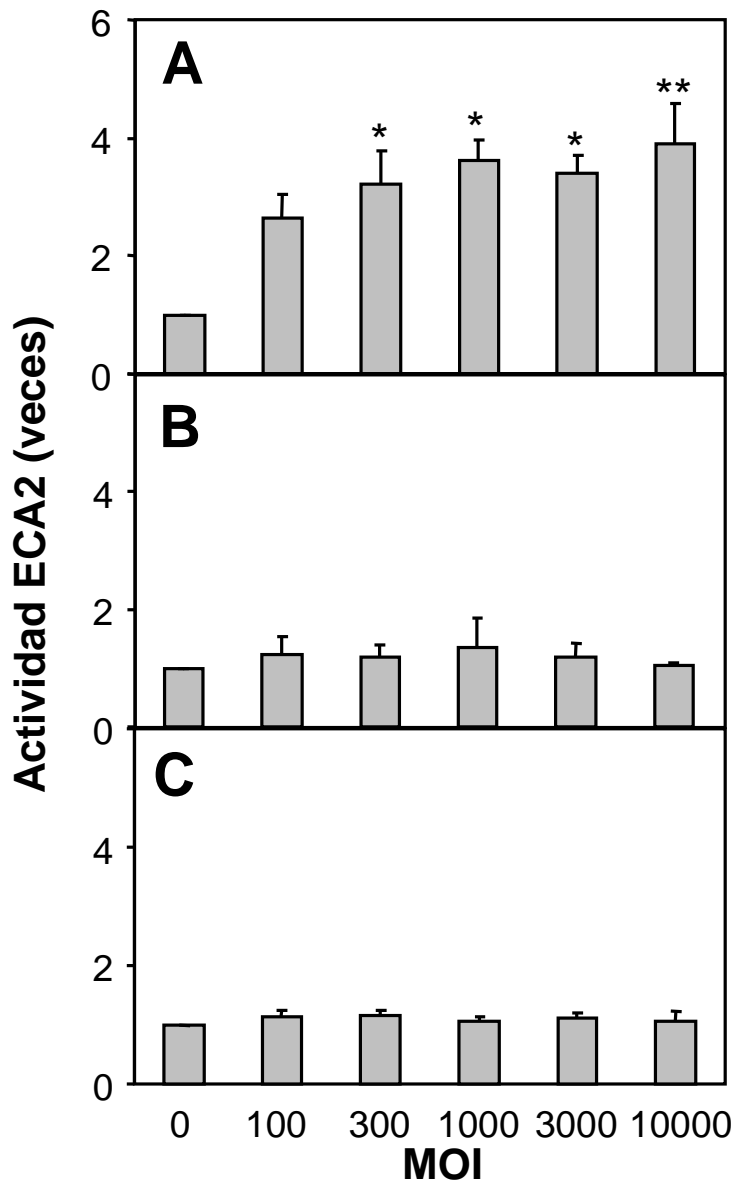


Figura 12. Actividad enzimática de ECA2 en cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense, Ad ECA2 anti y Ad vacío.

Cardiomiocitos en cultivo (1×10^6) se transdujeron con MOI crecientes de (A) Ad ECA2 sense, (B) Ad ECA2 anti y (C) Ad vacío según el protocolo indicado en Materiales y Métodos. Después de incubar 48 h, las células se lisaron con 50 μ L de amortiguador para ECA2 y 10 μ L de muestra fue utilizado para medir actividad ECA2 según lo indicado en Materiales y Métodos. En los ensayos se inhibió la actividad ECA usando captopril 100 μ M. La actividad ECA2 se expresó como veces de aumento respecto al control (MOI=0). Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ vs MOI=0.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró: a) clonar el gen que codifica para ECA2 en un vector adenoviral generando dos construcciones, sentido y antisentido; b) producir ECA2 a partir de ambos vectores adenovirales; c) demostrar que Ad ECA2 sense sobreexpresa ECA2, determinado por el nivel proteico y por actividad enzimática.

ECA2 es el componente más nuevo del SRA, y se ha demostrado que es responsable de la formación de los péptidos Ang (1-9) y Ang II, respectivamente.⁵ Sin embargo, existen pocos antecedentes en la literatura que describan su papel en la homeostasis del sistema cardiovascular y en la génesis y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

Uno de los primeros indicios sobre la función fisiológica de ECA2 se originó cuando se logró determinar que el gen que codifica para ECA2 mapeaba en el loci cuantitativo (quantitative trait loci [QTL]) que afecta la susceptibilidad a la hipertensión^{22,23} en el cromosoma X en ratas hipertensas. Esta región cromosómica se sobrepone con el SS-X QTL en ratas Sabra sensibles a sal, con el BP3 QTL en ratas espontáneamente hipertensas susceptibles a infartos y el BB.Xs QTL en ratas espontáneamente hipertensas.¹⁶ En todas estas cepas de rata, los niveles de mRNA y proteína de ECA2 se encuentran muy reducidos y correlacionan inversamente con la presión arterial.¹⁶

Una de las primeras aproximaciones para determinar la función de ECA2 en el organismo fue la obtención de ratones deficientes para esta enzima.¹⁶ A pesar

de la asociación genética de ECA2 con la hipertensión arterial, estos ratones se desarrollaron normalmente y poseían presión arterial e histología renal normal. Sin embargo, los niveles plasmáticos de Ang II estaban moderadamente elevados.¹⁶ La presión normal en los ratones deficientes para ECA2 podría explicarse por efectos compensatorios. Dado que ECA2 tiene un amplio rango de especificidades de sustrato, no se puede excluir la posibilidad que en los ratones deficientes en ECA2 los efectos hipertensivos que provoca los niveles elevados de Ang II son contrarrestados por cambios compensatorios en otros péptidos regulatorios, tales como Ang-(1-7),^{12,24} los metabolitos de kininas²⁵ o el recientemente descubierto sistema de Apelina.²⁶ Debido a que la susceptibilidad a la hipertensión arterial es multifactorial, parece ser que la deficiencia de ECA2 predispone, más que causa, hipertensión.^{23,27}

Como una manera de dilucidar el rol de ECA2 en el sistema cardiovascular, Diez-Freire y cols⁹ desarrollaron experimentos mediante la sobreexpresión de ECA2. Para ello utilizaron un lentivirus recombinante que sobreexpresa ECA2 (lenti-ECA2). Este lentivirus, al igual que el Ad ECA2 sense generado en este trabajo, aumenta significativamente la actividad de ECA2 en cardiomiocitos transducidos *in vitro*. Ratas transducidas intracardiamente con lenti-ECA2 incrementaron 3 veces los niveles de mRNA para ECA2 en relación con ratas transducidas con lentiGFP.⁹ La infusión de Ang II (200 ng·kg⁻¹·min⁻¹) durante 4 semanas aumentó la presión arterial sistólica en 80 mmHg, el peso relativo del corazón respecto al peso total y la fibrosis cardíaca. La transducción con el

lentivirus ECA2 atenuó el aumento del peso relativo del corazón respecto al peso total y la fibrosis inducida por ECA2.²⁸ Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de ECA2 intracardiaco usando el lentivirus ECA2 protege al corazón frente a un infarto al miocardio, ya que las ratas que sobreexpresaban ECA2 preservaron la función cardíaca, el movimiento y contractibilidad de la pared del ventrículo izquierdo, y atenuó el adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo.²⁹

En este trabajo no se logró detectar la proteína ECA2 en extractos proteicos de cardiomiocitos en cultivo usando Western blot (ver carril de la Figura 10). En la literatura tampoco existen trabajos que describan la detección de la proteína ECA2 en cardiomiocitos en cultivo por Western blot. Esto sugiere que probablemente los niveles de proteína ECA2 en los cardiomiocitos son muy bajos y por lo tanto difícil de detectar. Sin embargo, se ha descrito que ECA2 se expresa en cardiomiocitos ya que se ha detectado en estas células el mRNA que codifica para esta enzima,³⁰ aunque no siempre esta regla se cumple, pues deben existir condiciones que generen la transducción del mRNA. Debido a este problema, no se pudo evaluar directamente el efecto de Ad ECA2 anti sobre los niveles de proteína ECA2 en cardiomiocitos en cultivo. Como una manera de solucionar este inconveniente, se sobreexpresó la proteína ECA2 usando el Ad ECA2 sense, y en estas células se evaluó el efecto de la sobreexpresión del ECA2 antisentido usando el Ad ECA2 anti. Usado esta estrategia se demostró que el Ad ECA2 anti inhibe la expresión de la proteína ECA2.

Por otro lado, en este trabajo se logró detectar la actividad enzimática de ECA2 en cardiomiocitos en cultivo. Esta actividad no cambió debido a la transducción adenoviral, ya que la transducción con un adenovirus control vacío no alteró la actividad enzimática basal de la ECA2. Sin embargo, la transducción usando diferentes MOI de Ad ECA2 anti por 48 h no logró reducir la actividad enzimática de ECA2 en los cardiomiocitos. Este resultado negativo podría explicarse por el balance entre la síntesis y la degradación de la proteína ECA2. Si la vida media de la proteína ECA2 es muy larga, no se podría detectar una disminución de la actividad enzimática ECA2, a pesar de que el Ad ECA2 anti inhiba su síntesis. Lamentablemente no existen datos en la literatura sobre la vida media de la proteína ECA2 que puedan apoyar esta explicación.

ECA2 es una proteína transmembrana que se libera a través de una ruptura proteolítica por diversas proteasas, generando formas secretadas *in vivo* y en cultivo celular.²³ Donoghue y cols.⁴ determinaron que en cultivos de células CHO transfectadas con plasmidios de expresión que contenían cDNA para ECA2 o sin inserto (control), la ECA2 recombinante se secreta tanto en células lisadas como en medio condicionado. Además, en ensayos de actividad enzimática para ECA2 usando el medio condicionado se detectó una alta capacidad catalítica de ECA2 para hidrolizar Ang I a Ang-(1-9). Nuestros experimentos, aunque sí comprobaron la capacidad catalítica de ECA2 hidrolizando el sustrato fluorogénico 7-(metoxicoumarin-Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys-(Dnp)-OH) enlisados de

cardiomiocitos transducidos con Ad ECA2 sense, no se comprobó si el medio de mantención de estas células transducidas presentaba la proteína de ECA2.

Recientemente, Hernández Prada y cols.²³ identificaron 2 compuestos que incrementan selectivamente la actividad enzimática de ECA2, y no de ECA, de manera dosis dependiente, en ensayos *in vitro*. Esto fue posible gracias a una nueva estrategia de descubrimiento de drogas basada en conformaciones racionales.²³ También, Zhong y cols.²⁴ realizaron un estudio *in vivo* en ratas SHR y WKY a las cuales se administró ácido retinoico para evaluar su papel en el SRA y en la patofisiología de la HTA esencial. Estos investigadores lograron determinar el papel antihipertensivo y cardioprotector de este ácido graso, al aumentar en forma significativa la expresión tanto de mRNA como de proteína de ECA2 en corazón y riñón en ratas SHR, en comparación a su control que solo recibió vehículo. No se detectó ningún cambio significativo en ratas WKY.²⁴ lamentablemente, no hubo una medición de la actividad catalítica de ECA2. Estos argumentos abren la posibilidad de evaluar en el futuro si una sobreexpresión de ECA2 mediante el uso de adenovirus recombinante, junto a la combinación de drogas que aumentan la actividad enzimática de ECA2, pudiesen lograr disminuir tanto el MOI efectivo de transducción como de dosis de drogas para obtener aumentos significativos de actividad catalítica. Por otra parte, se podría evaluar si la sobreexpresión de un sentido de ECA2 revierte la baja actividad observada en ratas post-infartadas. De igual modo, existen polimorfismos de ECA2 que generan en la población tanto una baja producción de esta proteína como su capacidad de

hidrolizar Ang II para formar Ang-(1-7).²⁵ Por lo tanto, se podrá buscar una terapia combinada efectiva que logre disminuir la presión arterial como el remodelado cardiovascular.

Finalmente, como perspectiva a futuro, la construcción de lentivirus recombinantes tanto para ECA2 sentido como antisentido, resultaría beneficioso para estudios *in vivo* como *in vitro*. Su capacidad de integrarse en el cromosoma de las células huésped, su larga duración de expresión en modelos *in vivo*, debido a una baja respuesta inmunitaria, la hacen una herramienta eficiente para proseguir en estudios de la influencia de ECA2 tanto en el SRA como en SCV.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que la secuencia ECA2 humana clonada en el vector pCI-neo corresponde exactamente a la descrita para el gen ECA2, EMBL código de acceso GenBank AF241254.
- Se clonó el gen ECA2 en el vector adenoviral pDC316, generando dos plasmidios: uno que porta el gen ECA2 en sentido y otro en antisentido respecto al promotor de expresión P_{CMV}.
- Usando los vectores adenovirales pDC316 / ECA2 sentido y antisentido, se obtuvieron los adenovirus ECA2 sentido y antisentido, respectivamente.
- Ambos adenovirus se amplificaron y purificaron, obteniéndose $3,6 \times 10^{12}$ partículas virales/mL de Ad ECA2 sense, y $3,1 \times 10^{12}$ partículas virales/mL.
- La proteína y actividad enzimática de ECA2 se sobreexpresó en cardiomiocitos transducidos con el Ad ECA2 sense en forma MOI dependiente.
- El Ad ECA2 anti atenuó la sobreexpresión de ECA2 mediada por Ad ECA2 sense. Sin embargo, Ad ECA2 anti no disminuyó la actividad enzimática de ECA2 en cardiomiocitos en cultivo.

9. REFERENCIAS

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;**42**:1206-1252.
2. Kannel WB. The Framingham study. *Br Med J* 1976;**2**:1255.
3. Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;**34**:1435-1442.
4. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;**87**:E1-E9.
5. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000;**275**:33238-33243.
6. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005;**26**:369-375.
7. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;**277**:14838-14843.

8. Der SS, Huentelman MJ, Stewart J, Katovich MJ, Raizada MK. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**91**:163-198.
9. Diez-Freire C, Vazquez J, Correa de Adjounian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics* 2006;**27**:12-19.
10. Jacob HJ. Physiological genetics: application to hypertension research. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;**26**:530-535.
11. Iyer SN, Yamada K, Diz DI, Ferrario CM, Chappell MC. Evidence that prostaglandins mediate the antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) during chronic blockade of the renin-angiotensin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**36**:109-117.
12. Ren Y, Garvin JL, Carrertero OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 2002;**39**:799-802.
13. Santos RA, Ferrerira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 2004;**17**:292-299.
14. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994;**35**:293-298.

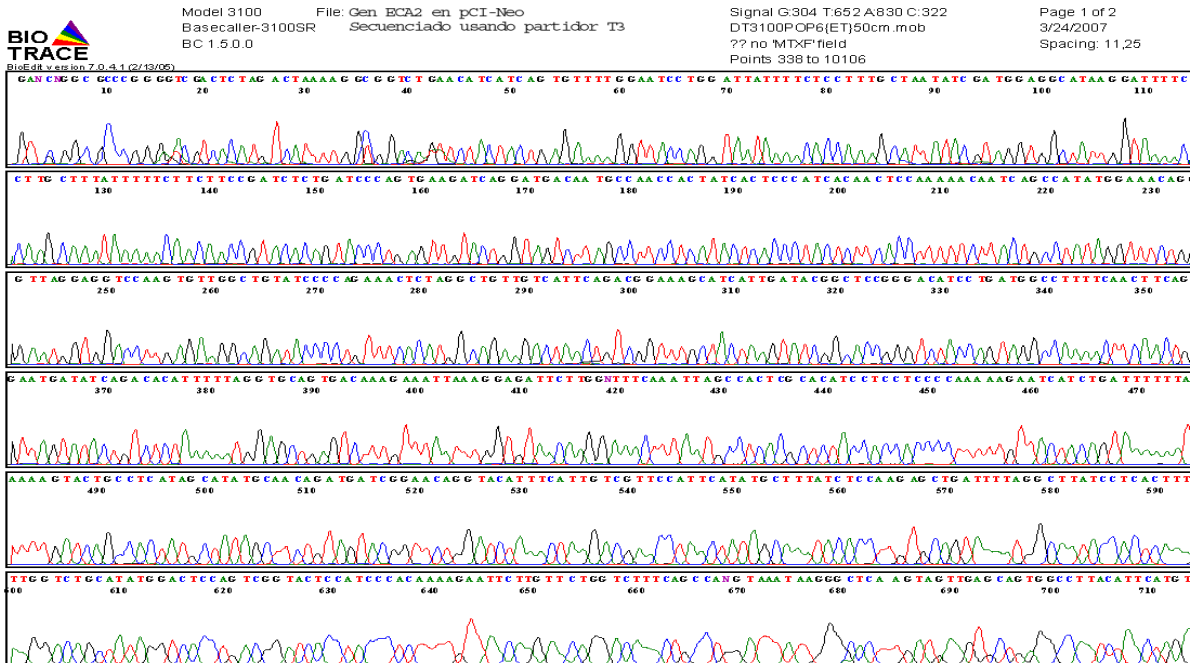
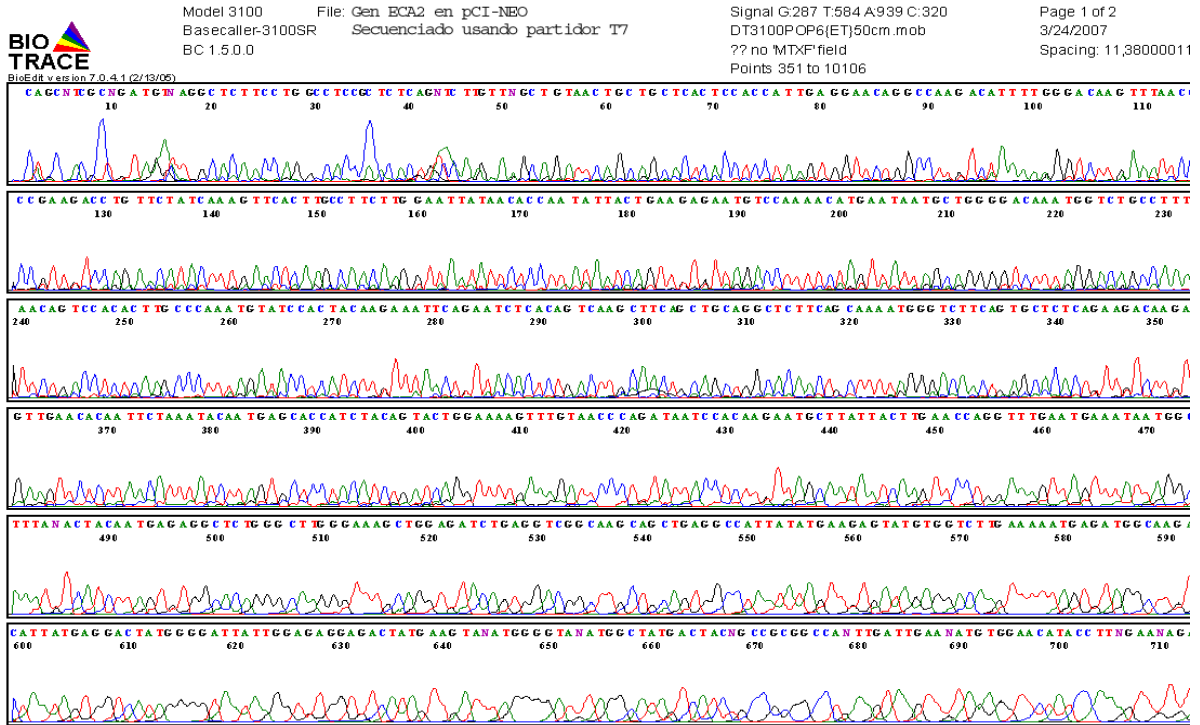
15. Yagil Y, Yagil C. Hypothesis: ACE2 modulates blood pressure in the mammalian organism. *Hypertension* 2003;**41**:871-873.
16. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;**417**:822-828.
17. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, mPinto M, et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension* 2006;**48**:572-578.
18. Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension* 2006;**47**:718-726.
19. Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, et al. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;**272**:19115-19124.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-685.
21. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory síndrome-coronavirus

- (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005;**280**:30113-30119.
22. Korstanje R, Paigen B. From QTL to gene: the harvest begins. *Nat Genet* 2002;**31**:235-236.
23. Stoll M, Kwitek-Black AE, Cowley AW, Jr., Harris EL, Harrap SB, Krieger JE, et al. New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res* 2000;**10**:473-482.
24. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 1997;**29**:394-400.
25. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 2001;**88**:275-281.
26. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001;**99**:87-92.
27. Stoll M, Jacob HJ. Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2001;**3**:157-164.
28. Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp. Physiol* 2005;**90**:783-790.

29. Der SS, Grobe JL, Yuan L, Narielwala DR, Walter GA, Katovich MJ, et al. Cardiac overexpression of angiotensin converting enzyme 2 protects the heart from ischemia-induced pathophysiology. *Hypertension* 2008;**51**:712-718.
30. Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Sumida H, Sugiyama S, et al. Aldosterone, but not angiotensin II, reduces angiotensin converting enzyme 2 gene expression levels in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ J* 2008;**72**:1346-1350.

10. ANEXOS

Anexo I. Secuenciación del gen de ECA2 humano clonado en el vector pCI-Neo usando los partidores universales T3 y T7.



Anexo III. Alineamiento entre el gen ECA2 clonado en el vector pCI-Neo y el cDNA de ECA2 humano.

	
<i>H sapiens</i> ECA2	cgcccaacc aagttcaaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta	60
pCINeo ECA2	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	gggaaagtca ttcagtggat gtgatccttg ctcacagggg acgatgtcaa gctcttctcg	120
pCINeo ECA2	TTAATACG ACTCActATA GGCTAGCCTC GAgatgtcaa gctcttctcg	
<i>H sapiens</i> ECA2	gctccttctc agccttgttg ctgtaactgc tgctcagtc accattgagg aacaggccaa	180
pCINeo ECA2	gctccttctc agccttgttg ctgtaactgc tgctcagtc accattgagg aacaggccaa	
<i>H sapiens</i> ECA2	gacatttttg gacaagtta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaa gttcacttgc	240
pCINeo ECA2	gacatttttg gacaagtta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaa gttcacttgc	
<i>H sapiens</i> ECA2	ttcttggaa tataacacca atattactga agagaatgac caaaacatga ataatgctgg	320
pCINeo ECA2	ttcttggaa tataacacca atattactga agagaatgac caaaacatga ataatgctgg	
<i>H sapiens</i> ECA2	ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaagt atccactaca	360
pCINeo ECA2	ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaagt atccactaca	
<i>H sapiens</i> ECA2	agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaa atgggtcttc	420
pCINeo ECA2	agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaa atgggtcttc	
<i>H sapiens</i> ECA2	agtgtctca gaagacaaga gcaaacggtt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat	480
pCINeo ECA2	agtgtctca gaagacaaga gcaaacggtt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat	
<i>H sapiens</i> ECA2	ctacagtact ggaaaagttt gtaaccaga taatccaaa gaatgcttat tacttgaacc	540
pCINeo ECA2	ctacagtact ggaaaagttt gtaaccaga taatccaaa gaatgcttat tacttgaacc	
<i>H sapiens</i> ECA2	aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga	600
pCINeo ECA2	aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga	
<i>H sapiens</i> ECA2	aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtctt	660
pCINeo ECA2	aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtctt	
<i>H sapiens</i> ECA2	gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga	720
pCINeo ECA2	gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga	
<i>H sapiens</i> ECA2	ctatgaagta aatgggtag atggctatga ctacagccgc ggccagtga ttgaagatgt	780
pCINeo ECA2	ctatgaagta aatgggtag atggctatga ctacagccgc ggccagtga ttgaagatgt	
<i>H sapiens</i> ECA2	ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc	840
pCINeo ECA2	ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc	
<i>H sapiens</i> ECA2	aaagttgatg aatgcctatc cttcctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt	900
pCINeo ECA2	aaagttgatg aatgcctatc cttcctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt	
<i>H sapiens</i> ECA2	gcttggatg atgtgggta gattttggac aaatctgtac tctttgacag ttcccttgg	960
pCINeo ECA2	gcttggatg atgtgggta gattttggac aaatctgtac tctttgacag ttcccttgg	
<i>H sapiens</i> ECA2	acagaaacca aacatagatg ttactgatgc aatgggtggac caggcctggg atgcacagag	1020
pCINeo ECA2	acagaaacca aacatagatg ttactgatgc aatgggtggac caggcctggg atgcacagag	
<i>H sapiens</i> ECA2	aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttgg cttcctaata tgactcaagg	1080
pCINeo ECA2	aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttgg cttcctaata tgactcaagg	

<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	attctgggaa aattccatgc taacggacc aggaaatggt cagaaagcag tctgccatcc	1140
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat	1200
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcatatc cagtatgata tggcatatgc	1260
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	tgcacaacct tttctgctaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctggtgggga	1320
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	aatcatgtca ctttctgcag ccacacctaa gcatttaaaa tccattggtc ttctgtcacc	1380
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttctg ctcaaacaag cactcacgat	1440
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	tgttgggact ctgccattta cttacatggt agagaagtgg aggtggatgg tctttaaagg	1500
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ggaaattccc aaagaccagt ggatgaaaa gtggtgggag atgaagcgag agatagttgg	1560
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ggtggtggaa cctgtgcccc atgatgaaac atactgtgac cccgcatctc	1620
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ttctaagat tactcattca ttcgatatta cacaaggacc ctttaccat tccagtttca	1680
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	agaagcactt tgtcaagcag ctaaaccatga aggccctctg cacaaatgtg acatctcaaa	1740
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgctgagg cttggaaaat cagaacctg	1800
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	gaccctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa	1860
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac aagaattctt ttgtgggatg	1920
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	gagtaccgac tggagtccat atgcagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaatc	1980
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	agctcttggg gataaagcat atgaaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcatc	2040
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	tgttgcatat gctatgaggc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttctttttgg	2100
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	ggaggaggat gtgcgagtgg ctaatttgaa accaagaatc tcctttaatt tctttgtcac	2160
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat	2220
<i>H sapiens</i> ECA2 PCINeo ECA2	gtcccggagc cgtatcaatg atgctttccg tctgaatgac aacagcctag agtttctggg	2280

<i>H sapiens</i> ECA2	gatacagcca	acacttggac	ctcctaacca	gccccctggt	tccatatggc	tgattgtttt	2340
PCINeo ECA2	gatacagcca	acacttggac	ctcctaacca	gccccctggt	tccatatggc	tgattgtttt	
<i>H sapiens</i> ECA2	tgggagttgt	gatgggagtg	atagtgggtg	gcattgtcat	cctgatcttc	actgggatca	2400
PCINeo ECA2	tgggagttgt	gatgggagtg	atagtgggtg	gcattgtcat	cctgatcttc	actgggatca	
<i>H sapiens</i> ECA2	gagatcggaa	gaagaaaaat	aaagcaagaa	gtggagaaaa	tccttatgcc	tccatcgata	2460
PCINeo ECA2	gagatcggaa	gaagaaaaat	aaagcaagaa	gtggagaaaa	tccttatgcc	tccatcgata	
<i>H sapiens</i> ECA2	ttagcaaagg	agaaaataat	ccaggattcc	aaaacactga	tgatgttcag	acctcctttt	2520
PCINeo ECA2	ttagcaaagg	agaaaataat	ccaggattcc	aaaacactga	tgatgttcag	acctcctttt	
<i>H sapiens</i> ECA2	agaaaaatct	atgtttttcc	tcttgagggtg	atgttaaagt	taatttcattg	2580	
PCINeo ECA2	agTCTaGAGt	CGACCCCGGG	CGCCNGNTC-	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	gtatagaaaa	tataagatga	taaagatattc	attaaatgtc	aaaactatga	ctctgttcag	2640
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	aaaaaaaaatt	gtccaaagac	aacatggcca	aggagagagc	atcttcattg	acattgcttt	2700
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	cagtatttat	ttctgtctct	ggatttgact	tctgttctgt	ttcttaataa	ggattttgta	2760
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	ttagagtata	ttagggaaaag	tgtgtatttg	gtctcacagg	ctgttcaggg	ataatctaaa	2820
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	tgtaaagtgc	tgttgaattt	ctgaagttga	aaacaaggat	atatcattgg	agcaagtgtt	2880
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	ggatcttgta	tggaaatg	atggatcact	tgtaaggaca	gtgcctggga	actggtgtag	2940
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	ctgcaaggat	tgagaatggc	atgcattagc	tcactttcat	ttaatccatt	gtcaaggatg	3000
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	acatgctttc	ttcacagtaa	ctcagttcaa	gtactatggt	gatttgccta	cagtgatggt	3060
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	tggaatcgat	catgctttct	tcaaggtgac	aggtctaaag	agagaagaat	ccagggaaaca	3120
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	ggtagaggac	attgcttttt	cacttccaag	gtgcttgatc	aacatctccc	tgacaacaca	3180
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	aaactagagc	caggggcctc	cgtgaactcc	cagagcatgc	ctgatagaaa	ctcattttcta	3240
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	ctgttctcta	actgtggagt	gaatggaaat	tccaactgta	tgttcacctc	ctgaagtggg	3300
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	taccagctct	cttaaactct	ttgtatttgc	tcacagtgtt	tgagcagtgc	tgagcacaaa	3360
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>H sapiens</i> ECA2	gcagacactc	aataaatgct	agatttacac	actcaaaaaa	aaaaaa		3406
PCINeo ECA2	-----	-----	-----	-----	-----		

