



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica  
Laboratorio de Farmacología Experimental

**Sobre-expresión hepática de catalasa y su efecto en el consumo de alcohol  
en animales: desarrollo de vectores adenovirales codificantes de catalasa**

**PATROCINANTE**

Prof. Mario Rivera Meza  
Laboratorio de Farmacología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**DIRECTOR**

Prof. Mario Rivera Meza  
Laboratorio de Farmacología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**Braulio Pablo Rojas Bustos**

Santiago de Chile

Año 2019

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología Experimental del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Fue financiada por los siguientes proyectos: DQFT 2018-1 (M. Rivera), PEEI 2018 (M. Rivera) y FONDECYT 1150850 (Eduardo Karahanian).

## **PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

Los resultados de los experimentos desarrollados en esta tesis han dado origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

### **• Publicaciones**

Rivera-Meza M, Vásquez D, Quintanilla ME, Lagos D, **Rojas B**, Herrera-Marschitz M, Israel Y.

“Activation of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 Reduces both the Acquisition and Maintenance of Ethanol Intake in Rats: A Dual Mechanism?” *Neuropharmacology*. 2018 Dec 4;146:175-183. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.001.

### **• Congresos**

**Rojas B**, Rivera-Meza M.

“Fenofibrato y reducción de consumo de alcohol: Generación de vectores adenovirales codificantes de catalasa”. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Santa Cruz, Chile, 13-16 de noviembre de 2018. *Rev. Farmacol. Chile* (2018) 11 (1):52

Rivera-Meza M, Quintanilla ME, Vásquez D, Lagos D, **Rojas B**, Herrera-Marschitz M, Israel Y. “La administración de Alda-1, un activador de la deshidrogenasa aldehídica 2 (ALDH2), reduce de forma dosis-dependiente el consumo de etanol en ratas”. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Santa Cruz, Chile, 13-16 de noviembre de 2018. *Rev. Farmacol. Chile* (2018) 11 (1):86

## **AGRADECIMIENTOS**

He dejado los agradecimientos para el final, y por fin ha llegado el momento de escribirlos, lo cual significa, que ha llegado el momento de cerrar una etapa y comenzar una nueva.

Muchas personas se me vienen a la mente cuando pienso en dejarles un mensaje especial y que prospere. Los primeros, son mis seres queridos, los que siempre me han apoyado, en las buenas y malas, pero sobre todo en las malas. Y es gracias a ellos que he llegado hasta aquí.

Gracias a mi familia, ya que ellos me guiaron y alentaron para adentrarme en la aventura de estudiar esta hermosa carrera, la cual logró encantarme día a día. A mis padres, por motivarme a ser mejor, académicamente y aún más importante, como persona. A mi hermano mayor, por enseñarme a tomar riesgos y a ser valiente. Y a mi hermana pequeña, quien sigue mis pasos y sé que será una gran Q.F.

También quiero agradecerle a una persona muy especial, quien llegó al final de este viaje y es fundamental para mí, ya que me ha apoyado en momentos de frustración, me ha entregado su amor, paciencia, conocimiento, experiencias, valores, y me ha enseñado a disfrutar cada momento. Sé que lograremos todas nuestras metas y aún más.

Finalmente, pero no menos importante, quisiera agradecer a todos quienes me apoyaron en la realización de esta tesis, a los estudiantes en unidad de investigación, a los tesisistas, y a quien resultó fundamental en este proyecto, el profe Mario, quien siempre tuvo una excelente disposición, estuvo dispuesto a apoyarme y me ayudó siempre a resolver cualquier problema que pudiese emerger.

Se acaba una etapa de la vida y comienza otra.

## ÍNDICE GENERAL

<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	I
<b>PUBLICACIONES Y CONGRESOS</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	X
<b>SUMMARY</b> .....	XI
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. El alcoholismo .....	1
1.2. Metabolismo del etanol.....	2
1.3. Efectos del acetaldehído. ....	3
1.4. Relevancia de la catalasa en el metabolismo del etanol.....	4
1.5. Activación de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) y su relación con la actividad de la catalasa.....	5
1.6. Adenovirus recombinantes. ....	7
<b>2. Hipótesis.</b> .....	9
<b>3. Objetivo general</b> .....	9
3.1. Objetivos específicos.....	9
<b>4. Materiales</b> .....	10
4.1. Material Biológico.....	10
4.2. Reactivos .....	10
4.3. Plasmidios.....	11
<b>5. Métodos</b> .....	13
5.1. Cultivo de células HEK-293.....	13
5.2. Transformación de bacterias .....	13
5.3. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina.....	14
5.4. Electroforesis de ADN .....	14
5.4. Transfección de células HEK-293.....	15
5.5. Detección de la fluorescencia de GFP en cultivos celulares.....	15
5.6. Detección de la actividad catalasa mediante el método de la espuma. ....	16

5.7. Determinación de la actividad catalasa mediante el método colorimétrico.....	16
5.8. Determinación de expresión del ADNc de catalasa mediante Western blot.....	17
5.9. Generación de los vectores adenovirales.....	19
5.9.1. Obtención de plásmidos recombinantes adenovirales.....	21
5.9.2. Obtención y amplificación de los vectores adenovirales.....	21
5.9.3. Purificación de vectores adenovirales.....	23
5.10. Titulación de los vectores adenovirales mediante absorbancia a 260 nm.....	23
5.11. Cultivo de células H4-II-E-C3.....	23
5.12. Infección de células HEK-293 con los vectores adenovirales.....	24
5.13. Infección de células H4-II-E-C3 con los vectores adenovirales.....	24
5.14. Métodos Estadísticos.....	25
<b>6. Resultados.....</b>	<b>26</b>
6.1. Clonación del ADNc de catalasa en el plásmido pAdTrack-CMV.....	26
6.2. Estudio de la expresión de catalasa desde pAdTrack-CMV-catalasa.....	26
6.2.1. Análisis de la expresión de catalasa mediante el método de la espuma.....	28
6.2.2. Análisis cuantitativo de la expresión de catalasa mediante método colorimétrico.....	30
6.3. Generación de los plásmidos adenovirales.....	31
6.4. Obtención de vectores adenovirales.....	36
6.5. Determinación de la funcionalidad de los vectores adenovirales en células HEK-293.....	39
6.5.1. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método de la espuma.....	39
6.5.2. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método colorimétrico.....	40
6.5.3. Western Blot de lisados de células HEK-293 infectadas con los vectores AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.....	41
6.6. Amplificación final de vectores adenovirales.....	42
6.7. Purificación de los vectores adenovirales.....	43
6.8. Determinación de la funcionalidad de los vectores adenovirales en células H4-II-E-C3.....	44
6.8.1 Análisis de la expresión de catalasa en células H4-II-E-C3 infectadas con los vectores adenovirales mediante método de la espuma.....	45
6.8.2. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método colorimétrico.....	46
6.8.3. Western Blot de lisados de células H4-II-E-C3 infectadas con los vectores AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.....	47

<b>7. Discusión</b> .....	49
7.1. Análisis de funcionalidad de los plásmidos transportadores. ....	51
7.2. Recombinación homóloga de los plásmidos transportadores con el plásmido adenoviral AdEasy-1. ....	52
7.3. Generación, amplificación y purificación de los vectores adenovirales. ....	53
7.4. Actividad de vectores adenovirales en células HEK-293. ....	55
7.5. Funcionalidad de vectores adenovirales en células H4-II-E-C3. ....	56
<b>8. Conclusiones</b> .....	57
<b>9. Referencias</b> .....	58
<b>10. Anexo</b> .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalencia de los trastornos por consumo de alcohol en el mundo. ....	1
<b>Figura 2.</b> Diferentes vías del metabolismo del etanol.....	3
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción y principales ubicaciones de las diversas isoformas de los PPARs. ....	5
<b>Figura 4.</b> Efectos moleculares de los fibratos.....	6
<b>Figura 5.</b> Esquema resumen de generación adenoviral.....	20
<b>Figura 6.</b> Mapa del plásmido adenoviral pAdTrack-CMV y del plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa.....	26
<b>Figura 7.</b> Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdTrack-CMV-catalasa y pAdTrack-CMV .....	28
<b>Figura 8.</b> Resultados de expresión de catalasa mediante el método de espuma.....	29
<b>Figura 9.</b> Determinación de espuma generada de acuerdo con la cantidad de plásmido pAdTrack-CMV-catalasa (µg) .....	30
<b>Figura 10.</b> Actividad de catalasa en lisados celulares HEK-293 transfectados con diferentes cantidades de plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa y pAdTrack-CMV .....	31
<b>Figura 11.</b> Mapa de plásmido adenoviral pAdEasy-1 presente en <i>E. coli</i> AD-BJ5183 .....	31
<b>Figura 12.</b> Proceso de recombinación homóloga entre plásmido transportador y pAdEasy-1 en células <i>E. coli</i> AD-BJ5183 .....	32
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos transportadores pAdTrack-CMV y pAdTrack-CMV-catalasa digeridos con Pmel. ....	33
<b>Figura 14.</b> Fotografía de electroforesis de agarosa de los plásmidos adenovirales resultantes de la recombinación homóloga. ....	34
<b>Figura 15.</b> Alternativas de recombinación homóloga entre pAdEasy-1 y el plásmido transportador en células <i>E. coli</i> AD-BJ5183. ....	35
<b>Figura 16.</b> Fotografía de la digestión con Pacl de los plásmidos adenovirales recombinantes. ....	36
<b>Figura 17.</b> Microfotografías de campo luminoso y fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdV-GFP-Catalasa. ....	37
<b>Figura 18.</b> Microfotografías de campo luminoso y fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdV-GFP. ....	38
<b>Figura 19.</b> Determinación de la expresión de catalasa mediante el test de espuma en lisados de células HEK-293 infectadas con AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.....	39

<b>Figura 20.</b> Correlación entre la espuma generada y la cantidad de AdV-GFP-Catalasa en células HEK-293 .....	40
<b>Figura 21.</b> Actividad de catalasa en células HEK-293 infectadas con diferentes volúmenes de lisado celular conteniendo AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP. ....	41
<b>Figura 22.</b> Análisis de Western Blot para la expresión de catalasa en células HEK-293 infectadas con los virus AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP. ....	42
<b>Figura 23.</b> Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293 infectadas con lisado viral de AdV-GFP-Catalasa durante el proceso de amplificación final.....	43
<b>Figura 24.</b> Purificación de vectores adenovirales mediante ultracentrifugación por doble gradiente de cloruro de cesio .....	44
<b>Figura 25.</b> Microfotografías de fluorescencia de células H4-II-E-C3 infectadas con Virus GFP-Catalasa y Virus GFP .....	45
<b>Figura 26.</b> Determinación del nivel relativo de espuma generada de acuerdo con la cantidad de lisado viral agregado sea AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP.....	46
<b>Figura 27.</b> Nivel relativo de actividad de catalasa en lisados celulares de células H4-II-C3 infectados con diferentes cantidades de lisado viral AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP.....	47
<b>Figura 28.</b> Análisis de Western Blot para la expresión de catalasa en lisados celulares H4-II-E-C3 infectados con diferentes cantidades de lisado viral AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP (µL) y gráfico de intensidad relativa de señales de Western Blot.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes de geles concentrador 5% y resolutivo 10% para la electroforesis de ADN.....	18
--	----

## ABREVIATURAS

OMS:	Organización mundial de la salud.
OPS:	Organización panamericana de la salud.
SENDA:	Servicio nacional para la prevención y rehabilitación del consumo de drogas
Rata UChB:	Rata bebedora de alcohol de la Universidad de Chile.
ADH:	Alcohol deshidrogenasa
ALDH 1:	Aldehído deshidrogenasa tipo 1
ALDH 2:	Aldehído deshidrogenasa tipo 2
CYP2E1:	Citocromo P450 2E1
SNC:	Sistema nervioso central
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
PPAR:	Receptor activados por proliferadores de peroxisomas
ADV:	Adenovirus
HEK-293:	Células de embrionarias de riñón humana
H4-II-E-C3:	Células de hepatoma de rata
IgG-HRP:	Inmunoglobulina de peroxidasa de rábano picante
CMV:	Citomegalovirus
GFP:	Proteína fluorescente verde
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
BSA:	Albúmina de suero bovino
DMEM:	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
LB:	Luria Bertani
PEI:	Polietilenimina
NaCl:	Cloruro de sodio
PBS:	Amortiguador fosfato salino
SDS:	Dodecilsulfato sódico
CsCl:	Cloruro de cesio
LPS:	Lipopolisacárido

## RESUMEN

El alcohol es la droga más consumida en el mundo y su uso excesivo genera graves problemas. A pesar de la relevancia del alcoholismo, en la actualidad no existen herramientas farmacológicas efectivas para su tratamiento. El etanol se metaboliza en el hígado por acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) a acetaldehído, el cual es transformado a acetato por la aldehído deshidrogenasa (ALDH2). La catalasa hepática también metaboliza el etanol a acetaldehído pero en menor proporción.

El fenofibrato es un fármaco hipocolesterolémico que activa el factor de transcripción PPAR-alfa (Receptor alfa activados por proliferadores de peroxisomas), induciendo la expresión de enzimas del metabolismo lipídico, entre ellas la catalasa. También se le han descrito acciones antiinflamatorias a nivel del SNC. Experimentos en ratas bebedoras de alcohol UChB mostraron que la administración de fenofibrato resulta en aumento de 3 veces en la actividad catalasa hepática y una reducción de 90% en la ingesta voluntaria de alcohol. Sin embargo, se desconoce si estos efectos son resultados de cambios a nivel periférico por una mayor producción de acetaldehído a nivel del hígado o por sus efectos antiinflamatorios a nivel central. Con el objetivo de poder disociar los efectos periféricos y centrales de fenofibrato, en esta tesis se desarrollaron vectores adenovirales que permitan la sobreexpresión selectiva de catalasa en tejido hepático de rata.

Para ello, mediante recombinación homóloga en células *E. coli* AD-BJ5183 se obtuvieron plásmidos adenovirales recombinantes codificantes para catalasa y GFP (pAdV-GFP-catalasa) y codificante para GFP (pAdV-GFP). Posteriormente, estos plásmidos se transfectaron en células HEK-293 para obtener los vectores adenovirales AdV-GFP-catalasa y AdV-GFP. Los adenovirus se amplificaron en estas mismas células y se purificaron mediante doble gradiente de cloruro de cesio. Los títulos virales obtenidos fueron bajos para su uso *in vivo*, pero adecuados para estudiar su efecto en células hepáticas H4-II-E-C3. Estos estudios mostraron que el vector AdV-GFP-catalasa es funcional en células de origen hepático, aumentando la actividad y los niveles de catalasa, además se encontró que el vector AdV-GFP no generó cambios en la actividad y niveles de catalasa.

## SUMMARY

### **Hepatic over-expression of catalase and its effect on alcohol consumption in animals: development of adenoviral vectors encoding catalase**

Alcohol is the most consumed drug in the world and its excessive use generates serious problems. Despite the relevance of alcoholism, there are no effective pharmacological tools for its treatment. Ethanol is metabolized in the liver by the action of alcohol dehydrogenase (ADH) to acetaldehyde, which is converted to acetate by the aldehyde dehydrogenase (ALDH2). Hepatic catalase also metabolizes ethanol to acetaldehyde but to a lesser extent.

Fenofibrate is a hypocholesterolemic drug that activates the PPAR-alpha (Alpha receptor activated by peroxisome proliferators) transcription factor, inducing the expression of lipid metabolism enzymes, including catalase. It has also been described anti-inflammatory actions at CNS level. Experiments in UChB alcohol drinking rats showed that the administration of fenofibrate results in 3-fold increase in hepatic catalase activity and 90% reduction in voluntary alcohol intake. However, it is unknown whether these effects are the result of changes at the peripheral level due to an increased production of acetaldehyde in the liver or due to its anti-inflammatory effects at central level. In order to dissociate between the peripheral and central effects of fenofibrate, adenoviral vectors that allow the selective overexpression of catalase in rat liver were developed in this thesis.

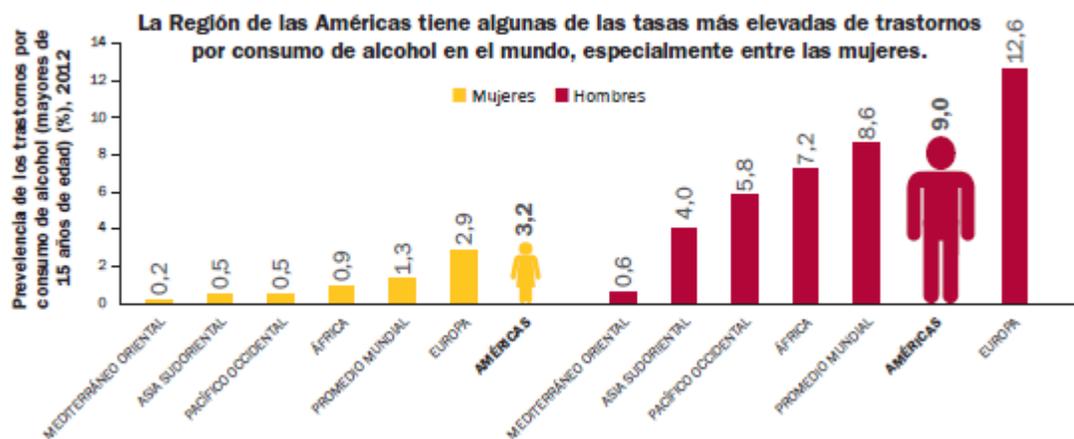
To do this, recombinant adenoviral plasmids coding for catalase and GFP (pAdV-GFP-catalase) or coding for GFP (pAdV-GFP) were obtained by homologous recombination in *E. coli* AD-BJ5183 cells. Subsequently, these plasmids were transfected into HEK-293 cells to obtain the adenoviral vectors AdV-GFP-catalase and AdV-GFP. The adenoviruses were amplified in these same cells and purified by a double gradient of cesium chloride. The viral titers obtained were low for *in vivo* use, but adequate to study their effect on hepatic cells H4-II-E-C3. These studies showed that the AdV-GFP-catalase vector is functional in cells of hepatic origin, increasing the activity and the levels of catalase, in addition it was found that the AdV-GFP vector did not generate changes in the activity and levels of catalase.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El alcoholismo

El consumo de alcohol es uno de los principales factores de riesgo para la salud pública a nivel mundial al ser responsable anualmente de 3,3 millones de muertes, lo que representa un 5,9% de la mortalidad anual total según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014). El consumo de alcohol es el principal factor en la mortalidad y discapacidad entre las personas de 15-49 años, franja etaria en la que los individuos suelen ser más productivos económicamente (Organización Panamericana de la Salud, OPS, 2015).

En el contexto mundial, el continente americano muestra la mayor prevalencia en mujeres de trastornos asociados al consumo excesivo de alcohol (Figura 1), mientras que en hombres nuestra región se encuentra en segundo lugar en la prevalencia de trastornos relacionados con el consumo de alcohol, sólo por detrás del continente europeo (OPS, 2015).



**Figura 1. Prevalencia de los trastornos por consumo de alcohol en el mundo.** *Situación regional del consumo de alcohol y la salud en las Américas 2015, en la cual la región de las Américas presenta mayor en el mundo en mujeres y las segunda en hombres.*

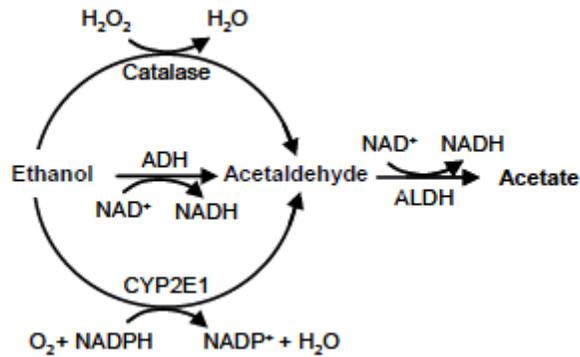
El alcohol en Chile es responsable de 1 de cada 10 muertes y alrededor del 20% del total de años de vida potencialmente perdidos. Es un factor de riesgo de suma importancia en la población, pero por sobre todo en la población masculina joven en el rango etario 18-30 años (Castillo-Carniglia y cols., 2013).

Según datos recogidos por el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) en el año 2014, la prevalencia del consumo de alcohol en la población chilena fue de 63%, lo que implica que 6.180.000 personas entre 12 y 64 años consumieron alcohol durante ese año. Un 5% de este grupo, aproximadamente 600.000 personas, son alcohólicos o bebedores excesivos (SENDA, 2016). A pesar de la relevancia del alcoholismo en la salud de la población, en la actualidad no existen tratamientos farmacológicos efectivos para tratar esta enfermedad.

Para estudiar los efectos y posibles tratamientos para el alcoholismo, se han utilizado modelos animales de consumo excesivo de alcohol. Entre estos modelos se encuentran las ratas UChB, que es una línea de ratas derivada de la cepa Wistar que ha sido seleccionada por más de 70 años (más de 90 generaciones), en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de acuerdo a su elevado consumo de alcohol que puede llegar a los 6-8 gramos de etanol por kilo por día (Quintanilla y cols., 2006).

## **1.2. Metabolismo del etanol**

El etanol se metaboliza en el hígado por acción de la deshidrogenasa alcohólica (ADH) que lo oxida a acetaldehído, y después el acetaldehído se convierte en acetato por acción de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) (Figura 2). Existen también otras vías de metabolización del etanol, las que están representadas por la catalasa y el citocromo P4502E1 (CYP2E1), encontrándose que ambas enzimas también transforman el etanol a acetaldehído (Handler y cols., 1988) (Figura 2). A pesar de la preponderancia de la ADH en el metabolismo del etanol, la evidencia experimental sugiere que la catalasa hepática representa un 25% de la metabolización del etanol en acetaldehído.



**Figura 2. Diferentes vías del metabolismo del etanol.** En el hígado el etanol se puede metabolizar a acetaldehído por 3 vías: (i) por la ADH, la cual necesita del cofactor  $NAD^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) que es reducido a  $NADH$ ; (ii) por la catalasa, que utiliza como cofactor el etanol en la reducción del peróxido de hidrógeno y (iii) por el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que utiliza como cofactor oxígeno y  $NADPH$  (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) que es oxidado a  $NADP^+$  (Karahanian y cols., 2014).

A nivel cerebral, la enzima ADH presenta una muy baja expresión, por lo que la metabolización del etanol en el sistema nervioso central es mediada principalmente por la catalasa, y en menor medida por el CYP2E1 (Tampier y Mardones, 1979). Estudios *in vitro* en homogenizados cerebrales han mostrado que la generación de acetaldehído en este tejido se debe en 70% a la acción de la catalasa y en 20% a la acción del CYP2E1 sobre el etanol (Zimatkin y cols., 2006).

### 1.3. Efectos del acetaldehído.

El acetaldehído proveniente del metabolismo del etanol es metabolizado por acción de la ALDH, la cual es una familia de enzimas que se encuentran distribuidas ampliamente en el organismo. De la familia ALDH, las más importantes en el metabolismo del acetaldehído son la ALDH1 que se ubica en el citosol, y la ALDH2 que es una enzima mitocondrial. Debido a la alta afinidad de la ALDH2 por el acetaldehído ( $K_m < 1 \mu M$ ), esta enzima es la más relevante en la metabolización del acetaldehído a las concentraciones que se pueden encontrar en el organismo. Esta enzima se expresa en la mayoría de los tejidos tanto periféricos como centrales. Interesantemente, el endotelio vascular presenta una elevada actividad ALDH2 lo que implica que el acetaldehído generado periféricamente difunde con mucha dificultad hacia el SNC (Eriksson y cols., 1977). Se ha descrito un polimorfismo en

el gen de la ALDH2 en poblaciones asiáticas (ALDH2\*2), el que codifica para una enzima ALDH2 que es prácticamente inactiva (Singh y cols., 1989). Los portadores de la ALDH2\*2 al consumir etanol no pueden eliminar el acetaldehído generado, acumulándose en la sangre y generando una serie de efectos disfóricos como rubor facial, taquicardia, náuseas y que finalmente llevan a una disminución del consumo de alcohol (Mizoi y cols., 1979). En este principio se basa la acción del fármaco disulfiram, que es un inhibidor de la ALDH2 y que se utiliza para el tratamiento del alcoholismo.

Sin embargo, estudios recientes en animales de experimentación han mostrado que el efecto del acetaldehído en el cerebro es totalmente opuesto al que produce en los territorios periféricos. En este sentido, se ha encontrado que ratas son capaces de auto administrarse acetaldehído intracerebralmente a concentraciones micromolares (Rodd y cols., 2005), sugiriendo que el acetaldehído actúa como un agente reforzante a nivel del SNC.

#### **1.4. Relevancia de la catalasa en el metabolismo del etanol.**

La catalasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades idénticas, codificada por un gen situado en el cromosoma 11p13 en el humano. Esta enzima, que es inhibida por aminotriazol, cianuro y plomo, se ubica en los peroxisomas y su función más importante es la eliminación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generado en las células. El peróxido de hidrógeno intracelular proviene de reacciones propias del metabolismo, como por ejemplo, la oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas, en donde justamente la catalasa presenta sus mayores niveles. El peróxido de hidrógeno es un oxidante fuerte y potencialmente dañino para la célula, por lo que debe ser eliminado rápidamente. (Iwase y cols., 2013).

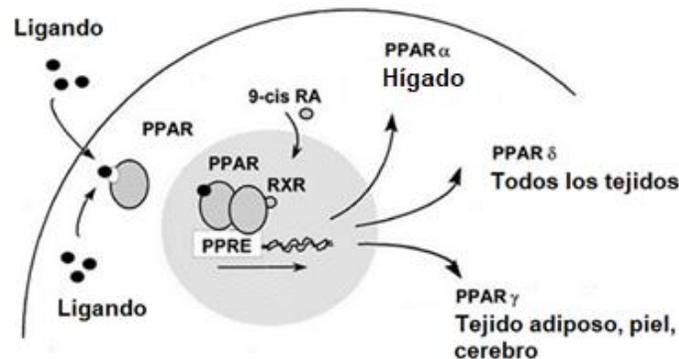
Experimentos en ratas han mostrado que bajo condiciones nutricionales normales, la catalasa es responsable del 25% de la metabolización periférica del etanol (principalmente hepática). sin embargo, bajo condiciones de dieta grasa que induce la actividad de la catalasa, la oxidación del etanol en los peroxisomas puede llegar a representar un 65% de la eliminación total de este compuesto (Handler y Thurman, 1988).

En estudios realizados por Quertemont y cols., (2003) se encontró que el inhibidor de la catalasa aminotriazol redujo significativamente el consumo y la preferencia de etanol en ratones. Además, anteriormente se demostró que este efecto del aminotriazol se verificaba sin modificaciones de los niveles de etanol en sangre (Aragon y cols., 1989). En este mismo

sentido, experimentos realizados por Virgolini y cols., (2013) mostraron que un aumento de la actividad de catalasa cerebral mediante la exposición a ácido 3-nitropropiónico aumentaba el consumo de etanol por parte de ratas.

### 1.5. Activación de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) y su relación con la actividad de la catalasa.

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción que desempeñan un papel esencial en la regulación de la diferenciación celular y el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas (Berger y Moller, 2002). Se han identificado tres tipos de PPAR: alfa, gamma y beta/delta. Se encuentra que PPAR $\alpha$  (alfa) es la isoforma más abundante en el hígado; PPAR $\gamma$  (gamma) se expresa principalmente en tejido adiposo, piel, cerebro y finalmente PPAR $\beta/\delta$  (beta/delta) se expresa ubicuamente en todos los tejidos (Braissant y cols., 1996) (Figura 3).

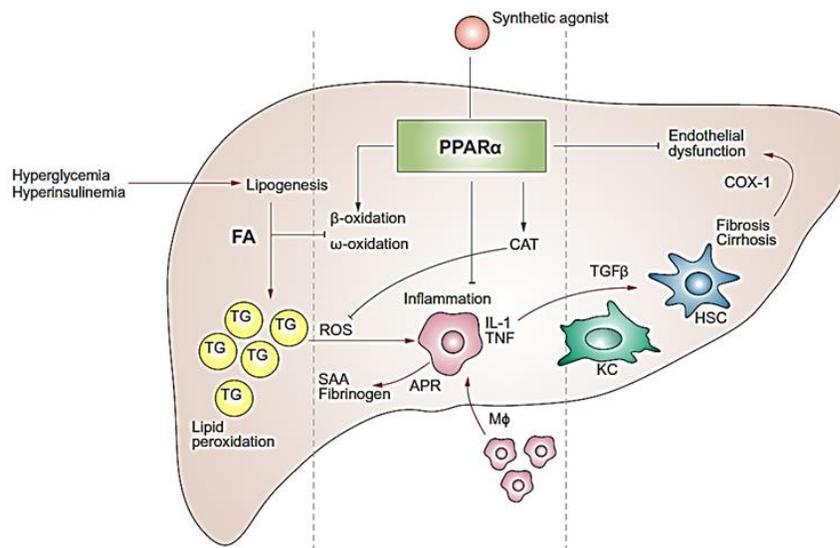


**Figura 3. Mecanismo de acción y principales sitios de expresión de PPAR.** *9-cis Ra: 9-cis ácido retinoico, RXR: receptor x retinoide, receptor nuclear que actúa como factor de transcripción, PPRE: elemento de respuesta de proliferadores peroxisomales.*

Existe evidencia de que los PPAR $\alpha$  son activados por fármacos del tipo fibrato, agentes hipolipidémicos que químicamente son ácidos carboxílicos anfipáticos y entre los que encontramos el clofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, bezafibrato y fenofibrato (Schoonjans y cols., 1996). La activación de PPAR $\alpha$  por fibratos resulta en un aumento de la expresión

de la lipoprotein-lipasa y la oxidación de ácidos grasos. Debido a esto, son ampliamente utilizados para el tratamiento de hipertrigliceridemia (Cignarella y cols., 2006).

Los fibratos al activar PPAR $\alpha$  son capaces también de inducir la proliferación de peroxisomas y junto con ello también aumentan los niveles de enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico y entre ellas, la catalasa (Berger y Moller, 2002; Clouet y cols., 1990) (Figura 4). En esta misma línea, estudios en ratones a los que se les administró oralmente fenofibrato durante 3 semanas, mostró que la actividad de la catalasa en el hígado aumentó 506% respecto a animales control que no recibieron la droga en su dieta (Arnaiz y cols., 1995).



**Figura 4. Efectos moleculares de los fibratos.** Los fibratos actúan activando los receptores PPAR $\alpha$ , que actúan a nivel genético aumentando la expresión de los genes que codifican para enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación de lípidos, metabolización de lípidos y en la proliferación de peroxisomas.

Experimentos recientes realizados en ratas bebedoras de la línea UChB, mostraron que la administración oral de fenofibrato resultó en un aumento de 3 veces en la actividad de la catalasa hepática y un aumento de 10 veces en los niveles de acetaldehído tras recibir una dosis estándar de etanol. Todos estos efectos se tradujeron en una reducción de casi 90% en la ingesta voluntaria de alcohol por los animales. La actividad hepática de las enzimas ADH y ALDH no se vio alterada por la administración de fenofibrato (Karahanian y cols., 2014).

Experimentos realizados en ratones por Blednov y cols., (2015; 2016) mostraron que la administración de fenofibrato resulta en una disminución del consumo voluntario de alcohol, así como también en cambios en otros comportamientos como la disminución de la reactividad a contextos novedosos y aumento de los síntomas de abstinencia a alcohol. Interesantemente, se encontró que los metabolitos activos del fenofibrato alcanzan efectivamente el tejido cerebral a las pocas horas de su administración. Experimentos recientes en ratas bebedoras UChB muestran que la administración de fenofibrato no aumenta los niveles de catalasa en cerebro (Rivera-Meza y cols., 2017).

Tomando en consideración estos antecedentes, es claro que el fenofibrato reduce el consumo de alcohol en animales, siendo el mecanismo más probable el aumento de la actividad catalasa en el hígado y la consiguiente reacción aversiva originada por los elevados niveles de acetaldehído que se generan después del consumo de alcohol. Sin embargo, existe evidencia experimental de que los efectos farmacológicos del fenofibrato también podrían estar relacionados con acciones a nivel del sistema nervioso central.

Con el objetivo de poder disociar los efectos periféricos y centrales asociados al mecanismo de acción del fenofibrato en la reducción del consumo de alcohol, es posible imitar los efectos periféricos de fenofibrato mediante la sobreexpresión específica de catalasa en el hígado mediante la administración de vectores adenovirales.

## **1.6. Adenovirus recombinantes.**

Los adenovirus (AdV) son virus de ADN que pertenecen a la familia Adenoviridae. Existen casi 50 serotipos distintos de adenovirus, de los cuales los tipos 2 y 5 (Ad2 y Ad5) son los más utilizados como vectores génicos. Los adenovirus recombinantes usados como vectores se les han eliminado regiones de su genoma con la finalidad de inhibir su replicación (E1). Debido a que no se integran en el genoma del huésped, estos virus sólo expresan el transgén en forma temporal durante su estancia en la célula (Lucero A. 2016).

Los adenovirus deben su uso exitoso al hecho de su seguridad biológica. Su producción se realiza por el método más comúnmente utilizado, el cual implica clonar el gen de interés en un vector transportador y transferir el gen al genoma de adenovirus mediante recombinación homóloga para obtener el genoma adenoviral con el gen de interés y posteriormente empaquetarlo en células HEK-293 (Rivera-Meza. 2009).

Los vectores adenovirales presentan un elevado tropismo hepático que se explica por el tamaño de los vectores adenovirales que es de aproximadamente 60 nm. Solamente en el hígado se encuentran poros en los vasos sanguíneos de un tamaño suficiente para permitir el paso de los adenovirus a los hepatocitos. En otros tejidos los poros endoteliales son demasiado pequeños para que los adenovirus puedan pasar a través de ellos a los tejidos correspondientes (Rivera-Meza y cols., 2010).

En este trabajo de tesis se plantea el desarrollo de los vectores adenovirales codificantes de catalasa y estudiar su funcionalidad *in vitro* en células hepáticas en cultivo. La validación *in vitro* de estos vectores adenovirales servirá de base para futuros experimentos *in vivo* destinados a estudiar los efectos de la sobreexpresión hepática de catalasa en el consumo de etanol en animales.

## **2. HIPÓTESIS.**

Vectores adenovirales codificantes de catalasa son capaces de aumentar los niveles y actividad de catalasa en células hepáticas en cultivo.

## **3. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar vectores adenovirales de la catalasa de ratas y estudiar su funcionalidad en células hepáticas de rata en cultivo.

### **3.1. Objetivos específicos**

- Desarrollar vectores adenovirales codificantes y no codificante del gen de la catalasa de rata.
- Comprobar la funcionalidad de los vectores adenovirales en cultivos de células de hepáticas de rata mediante la medición de la actividad y niveles de proteína catalasa.

## **4. MATERIALES**

### **4.1. Material Biológico.**

#### **Líneas celulares.**

Se utilizaron dos líneas celulares; HEK-293 (ATCC CRL-1573) de riñón de embrión humano y H4-II-E-C3 (ATCC CRL-1600) de hepatoma de rata, ambas provenientes de American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.

#### **Cepas de *Escherichia coli*.**

**DH5- $\alpha$** : cepa con baja capacidad de recombinación (*recA1*), obtenidas del Laboratorio de Farmacología Experimental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

**AD-BJ5183**: cepa con gran capacidad de recombinación (*recBC*) transformada con el plásmido AdEasy-1 que codifica el genoma del adenovirus del serotipo 5 (con delección de los genes E1). Se obtuvo en estado electrocompetentes de Stratagene (Cedar Creek, EE.UU.).

### **4.2. Reactivos**

#### **Enzimas.**

Se utilizaron las enzimas *Pac* I (Anza®18) de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.) y *Pme* I de New England BioLabs (Ipswich, MA, EE.UU.).

#### **Anticuerpos.**

Se utilizaron dos anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.): anti-catalasa (goat, sc-34285), anti-goat IgG-HRP (sc-2020). Además, se utilizó Anti-beta-actina (goat-G043) de Applied Biological Materials Inc (Crestwood Place, Canada).

#### **Reactivos de cultivo celular.**

Gibco BRL (Grand Island, NY, EE.UU.): medios de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), fungizona, penicilina, estreptomycin, tripsina, suero fetal bovino y suero equino.

### **Reactivos generales.**

**Merck** (Darmstadt, Alemania): Cloruro de sodio (NaCl), Tris-HCl, ácido acético glacial, hidróxido de sodio (NaOH), Dodecilsulfato sódico (SDS), isopropanol, etanol, peróxido de hidrógeno 30%, fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), metanol, glicina, glicerol, Tween 20. **Sigma-Aldrich** (St. Louis, MO, EE.UU.): Agar, glucosa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), acetato de potasio, Tritón X-100, 2-mercaptoetanol, azul bromofenol, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, Tetrametiletilendiamina (TEMED), Tampón fosfato salino (PBS). **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EE.UU.): Lipofectamina, kanamicina. **MoBio** (Carlsbad, CA, EE.UU.): Medio LB. **Lonza** (Cohasset, MN, EE.UU.): Agarosa. **Biotium** (Fremont, CA, EE.UU.): GelRED. **Winkler** (Lampa, Santiago, Chile): Tris-acetato-EDTA (TAE), rojo ponceau. **JTBaker** (Madrid, Madrid, España): Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). **May & Baker** (Wandsworth, Londres, Inglaterra): Dicromato de potasio. **Thermo Scientific** (Waltham, Massachusetts, EE.UU.): Inhibidor de proteasas. **VWR** (Matsonford Radnor, PA, EE.UU.): Tris-base. **Chemix** (Lampa, Santiago, Chile): Ácido clorhídrico (HCl). **Nestlé** (Graneros, Chile): leche descremada (Svelty).

### **4.3. PLASMIDIOS.**

**pAdTrack-CMV**: Forma parte del sistema de generación de adenovirus AdEasy, sirviendo como transportador del gen terapéutico. Contiene un sitio de múltiple clonación río abajo del promotor del CMV, seguido de un casete de expresión de GFP bajo el control del promotor del CMV.

**pAdTrack-CMV-Catalasa**: Derivado de la ligación entre pAdTrack-CMV y gen de catalasa (1764 pb). Contiene el gen del ADNc de la enzima catalasa de rata (GenBank BC081853-1) desde el nucleótido 2522 al 4285, además contiene el gen GFP ambos genes bajo el control del promotor del CMV. Construido por Catalina Salinas, 2016.

**pAdEasy-1**: Forma parte del sistema de generación de adenovirus AdEasy; contiene el genoma del adenovirus del serotipo 5, con deleciones en las regiones E1 (nucleótidos 1 al 3.533) y E3 (nucleótidos 28.130 al 30.820).

**pAdv-GFP-Catalasa:** Generado luego de la recombinación homóloga entre el plásmido pAdEasy-1 y pAdTrack-CMV-Catalasa. Contiene el gen de Catalasa y GFP ambos genes bajo el control del promotor del CMV (tamaño: 39.163 p.b.).

**pAdv-GFP:** Generado luego de la recombinación homóloga entre el plásmido pAdEasy-1 y pAdTrack-CMV. Contiene el gen de GFP. Bajo el control del promotor del CMV (tamaño: 35.727 p.b.).

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Cultivo de células HEK-293.

Las células HEK-293 (ATCC CRL-1573) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, esterilizado mediante filtración en filtro de nitrocelulosa de 0,2 µm (Sartorius Stedim, Alemania) y suplementado con 10 mL de penicilina 10.000U/mL - estreptomicina 10.000µg/mL y 1mL de anfotericina B 250 µg/mL, 10% de suero bovino fetal. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Midi 40 Series (Thermo Fisher Scientific) a 37°C y una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cultivaron en placas de poliestireno 35 o 100 mm de diámetro (Corning, NY, EE.UU.), o en matraces de cultivo de poliestireno de 25 o 75 cm<sup>2</sup> de superficie (Trueline, NY, EE.UU.). Los traspasos de cultivo celular se realizaron cuando la placa que contenía las células presentaba una confluencia mayor a un 80%, para ello se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25% y se llevó a la incubadora durante 5 minutos. Terminado este período de incubación se agregó 5 mL medio de cultivo y mediante pipeteo se soltaron las células de la superficie de la placa. Finalmente se agregó una alícuota (1/10 - 1/20) de células suspendidas a una nueva placa de cultivo.

### 5.2. Transformación de bacterias

La transformación de bacterias *E. coli* DH5α se realizó bajo mechero (esterilidad), la cual consistió en mezclar 0,1 µg de plásmido con 100 µL de bacterias *E. coli* DH5α competentes. La mezcla de plásmido con bacterias se incubó durante 30 minutos en hielo. Terminada la incubación se aplicó un shock térmico de 42°C durante 2 minutos. Finalizado el shock térmico se tomó los 110 µL de reacción y se traspasó a un tubo de cultivo estéril conteniendo 900 µL de medio LB sin antibióticos. Luego, el tubo se incubó a 37°C durante 90 minutos con agitación a 250 rpm. Terminado el periodo de incubación, se tomó 200 µL de la suspensión de células para sembrar una placa de LB/agar, la que se incubó de forma invertida a 37°C durante 15 horas.

### **5.3. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina.**

Para purificar un plásmido mediante este método, inicialmente se seleccionó un clon aislado portador del plásmido de interés, el que se cultivó en 4 mL medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C durante 15 horas y con agitación a 250 rpm. Luego, las células se precipitaron mediante centrifugación a 5000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el precipitado de células se suspendió en 200 µL de solución de suspensión (glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH=8) 25 mM, EDTA (pH=8) 10 mM, ARNasa A 10 µg/µL) mediante vórtex. Luego, se agregaron 200 µL de solución de lisis (NaOH 0,2N, SDS 1%), se invirtió repetidamente hasta lograr una mezcla homogénea y se agregó 200 µL de solución de precipitación (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 2 M). La mezcla se homogenizó mediante inversión y se centrifugó a 15.100 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se traspasó el sobrenadante a un microtubo de 1,5 mL, se agregó 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15.100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante, el precipitado se suspendió en 500 µL de etanol 70% y se centrifugó a 15.100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío durante 20 minutos. Una vez seco el precipitado, se disolvió en 50 µL de agua nanopura y se almacenó a -20°C.

### **5.4. Electroforesis de ADN**

Para la caracterización y visualización de los plásmidos se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 0,8% [0,8 g de agarosa en 100 mL de TAE x1 (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,4), el cual se fundió mediante microondas. Aproximadamente 40 mL de la solución de agarosa se vertieron a un soporte plástico, y se instaló una peineta plástica que permitió después de la solidificación de la agarosa la formación de 8 pocillos de 0,7 cm de ancho por 0,1 cm de alto. En ellos se cargó la mezcla de DNA y amortiguador de carga 6X (0,03% azul bromofenol, 0,03% xileno cianol, glicerol 60%, EDTA 60 mM pH 7,6). Luego, se procedió a realizar la electroforesis horizontal en una cámara que contenía tampón TAE 1X suficiente para cubrir el gel de agarosa. La corrida se realizó a 80 voltios durante 60 minutos. Terminado el tiempo de corrida se llevó el gel a una cámara de revelado que contenía 100 mL de TAE 1X y gelRED® (1:10000 en TAE 1X) durante 20 minutos. Luego las bandas de

DNA se revelaron mediante iluminación UV y posterior registro fotográfico con una cámara CANON PowerShot G16.

#### **5.4. Transfección de células HEK-293.**

La transfección se realizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Rivera-Meza (2009). Este protocolo consiste en sembrar aproximadamente  $1 \times 10^6$  células HEK-293 en una placa de 35 mm de diámetro. Al día siguiente, las células presentaron una confluencia mayor al 80% y se procedió a la transfección las células utilizando como agente de transfección polietilenimina. La cantidad de polietilenimina (PEI) a usar fue dependiente de la cantidad de plásmido a transfectar y se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{PEI } (\mu\text{l}) = 3 \times P \times (15) / S \quad (1)$$

En donde,

P= Cantidad de plásmido a transfectar ( $\mu\text{g}$ )

S= Concentración de PEI (mM)

En un microtubo estéril se mezcló la cantidad de plásmido a transfectar con cloruro de sodio (NaCl) 150 mM estéril suficiente para un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y en otro microtubo se mezcló PEI 7,5 mM (según el cálculo de la Fórmula 1) con NaCl 150 mM estéril hasta un volumen de 100  $\mu\text{L}$ . Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se mezclaron y se incubaron nuevamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se retiró el medio de cultivo de las células HEK-293 y se agregó 1 mL de medio DMEM con antibióticos y sin suero a 37°C. Luego, se agregó gota a gota la mezcla (plásmido, PEI y NaCl) por toda la superficie de la placa y se incubó durante 6 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. A las 6 horas, se suplementó la placa con 1 mL de medio DMEN 20% suero fetal bovino. Luego de 48 horas de realizada la transfección se retiraron las células de la placa de cultivo para realizar los respectivos estudios.

#### **5.5. Detección de la fluorescencia de GFP en cultivos celulares.**

La detección de la fluorescencia se realizó mediante un microscopio invertido Olympus CKX41 con filtro incorporado IX2-SLP (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japan), asociado a una fuente de fluorescencia Olympus U-RFL-T (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japan). Las capturas fotografías se realizaron utilizando una cámara Nikon DS-Fi2 (Nikon, Tokio, Japón). Para

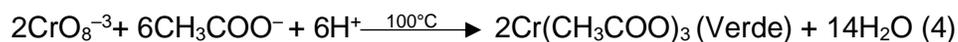
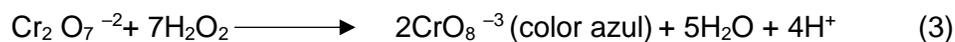
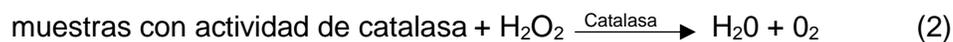
determinar el porcentaje de transfección, lo primero que se realizó fue una fotografía bajo luz visible. Posteriormente al mismo campo de células se observó bajo fluorescencia, detectándose las células que expresaron la proteína fluorescente verde (GFP). El porcentaje de transfección se determinó mediante la razón entre las células que emiten fluorescencia y la totalidad de células en el campo multiplicado por 100.

### 5.6. Detección de la actividad catalasa mediante el método de la espuma.

Este método está descrito como un ensayo simple para medir la actividad de la catalasa en células en cultivo mediante una apreciación visual (Iwase y cols., 2013). Las células fueron desprendidas de sus placas mediante pipeteo y traspasadas a microtubos de 1,5 mL. Luego, se centrifugaron a 1.500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular resultante se suspendió en 200 µL de amortiguador fosfato salino (NaCl 0,137 M; KCl 0,0027 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0018 M) (PBS). En un tubo de ensayo de vidrio de 10 mL, se añadieron 100 µL de las células suspendidas en PBS 1x, 100 µL de Tritón X-100 1% y 100 µL de peróxido de hidrógeno 30%. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La actividad catalasa de los lisados se determinó de acuerdo a la altura en centímetros de la espuma generada en cada tubo.

### 5.7. Determinación de la actividad catalasa mediante el método colorimétrico.

Este método permite determinar la actividad de catalasa en células en cultivo a través de la determinación de acetato crómico, el cual proviene de la reacción de peróxido de hidrógeno con dicromato de potasio en ácido acético (Hadwan, 2016) de acuerdo a la siguiente serie de reacciones:



Para ello, se tomó 100 µL de células suspendidas en PBS (Métodos 3.4.) a las que se les agregó 1 µL de inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se homogeneizó mediante ultrasonido (Omniruptor 250, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Alemania) en 2

ciclos de 5 pulsos de sonicación cada uno (50% power, 60% pulser), incubando las muestras en hielo durante 5 minutos entre cada ciclo de sonicación. Luego se centrifugó a 17.318 x g durante 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para el ensayo enzimático. Una fracción del homogeneizado se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EEUU). Se ajustó la concentración de proteínas del lisado a 100 µg/mL con amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,077 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,019 M) suplementado al 0,1% con BSA. Cien microlitros del homogeneizado se llevaron a un tubo de polipropileno de 15 mL, se agregó 1 mL de peróxido de hidrógeno 65 mM y se incubó a 37°C durante 3 minutos. Luego se agregó 2 mL de dicromato de potasio en ácido acético glacial al 5% (1,25 g de dicromato de potasio en 25 mL de ácido acético glacial) y se incubó la mezcla a 100°C durante 10 minutos. El producto de la reacción de peróxido de hidrógeno con dicromato de potasio, el acetato crómico se detectó mediante absorbancia a 570nm. La actividad de catalasa se expresó en términos de kilounidades (kU) de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Actividad de Catalasa (kU)} = \frac{2.303}{T} * \left[ \log \frac{S^{\circ}}{S-M} \right] * \frac{Vt}{Vs}$$

T= Tiempo.  
S°= Absorbancia de tubo estándar (sin muestra con actividad de catalasa).  
S= Absorbancia del tubo de prueba.  
M= Absorbancia del tubo control (sin peróxido de hidrógeno).  
Vt= Volumen total.  
Vs= Volumen de muestra con actividad.

(5)

### 5.8. Determinación de expresión del ADNc de catalasa mediante Western blot.

Para la determinación de los niveles de catalasa se utilizó la técnica de Western blot que nos permitió conocer los niveles de esta proteína en lisados celulares tratados con los plásmidos y vectores adenovirales.

Para ello se comenzó con la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Para realizar este procedimiento se prepararon 2 geles, un gel concentrador al 5% y un gel resolutivo al 10%.

Reactivos	Gel concentrador 5%	Gel resolutivo 10%
Agua destilada	5,14 mL	7,9 mL
Acrilamida/Bis (29:1) al 30%	1,25 mL	6,7 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8	0,95 mL	5 mL
SDS	0,075 mL	0,2 M
Persulfato de amonio 10%	0,075 mL	0,2 mL
TEMED	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L

**Tabla 1.** Componentes de geles concentrador 5% y resolutivo 10% para la electroforesis de ADN.

Se agregó primero el gel resolutivo en el soporte plástico y posterior a su gelificación se agregó el gel concentrador junto con un peine que permitió generar los pocillos para las muestras. El gel y su soporte se llevaron a la cámara de electroforesis que contenía amortiguador de corrida [100mL de solución base 10X, (Tris-HCl 0,250 M, glicina 1,9 M) SDS 0,1%, 900 mL de agua destilada]. Las muestras a analizar se mezclaron con tampón Laemmli 4X (8% SDS, 20% 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,08% azul de bromofenol, 0,250 M de Tris HCl pH=6,8) y se incubaron a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se cargaron en cada uno de los pocillos (20  $\mu$ g de proteínas por pocillo). Se procedió con la electroforesis, la cual se dividió en 2 etapas, la primera a un voltaje de 70 voltios durante la corrida en el gel concentrador y a 100 voltios durante el gel resolutivo.

- Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa:

Para la transferencia se preparó en un “emparedado” formado por dos esponjas de fibra, dos papeles filtros, una membrana de nitrocelulosa y el gel de la electroforesis, sujeto entre dos soportes plásticos que estuvieron sumergidos en tampón de transferencia (200 mL de solución base 10x, 400 mL de metanol, 1,4 L de agua destilada). Este conjunto se colocó en la cámara de transferencia Trans Blot (Bio-Rad) con la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo. La transferencia se realizó a 100 voltios durante 60 minutos con agitación en amortiguador de transferencia y la cámara de transferencia cubierta con hielo. La membrana se incubó en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,1%, ácido acético 50 mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este compuesto permitió visualizar las proteínas y tener un control sobre la eficiencia de la transferencia y la

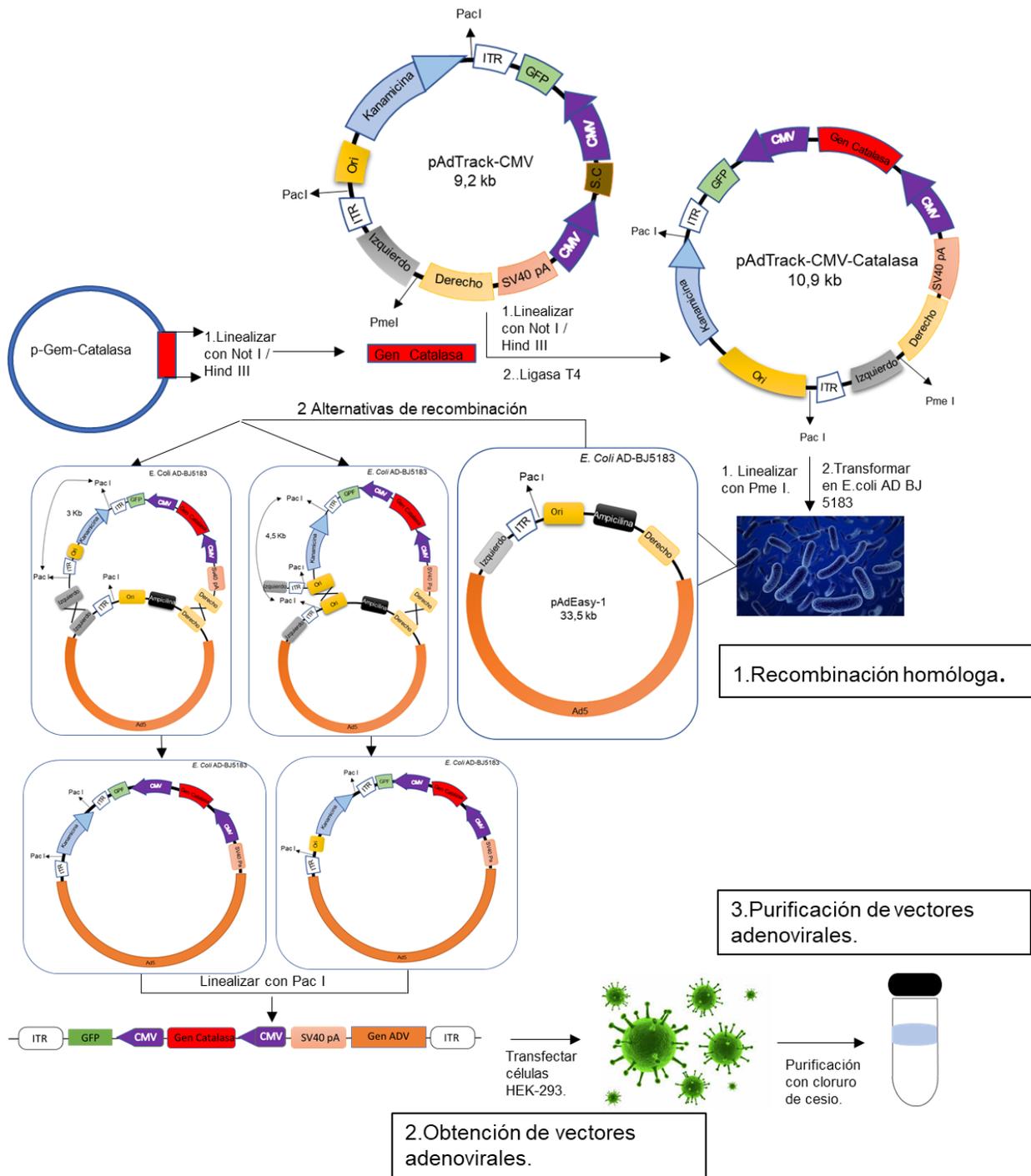
integridad de las proteínas. Se extrajo el exceso de solución y se lavó cuidadosamente con agua hasta obtener una buena visualización.

- **Reacción antígeno–anticuerpo:**

La membrana de nitrocelulosa se incubó en solución de bloqueo [amortiguador TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1%, pH 7.6, 5% de leche descremada) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Finalizado el bloqueo de los sitios inespecíficos, la membrana se lavó 5 veces durante 5 minutos con agitación en amortiguador TBST. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido a una concentración adecuada en una bolsa plástica del tamaño de la membrana, incubándola durante 15 horas a 4°C con agitación. Se lavó la membrana 4 veces con TBST durante 15 minutos. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la membrana 4 veces con TBST durante 5 minutos cada uno. La membrana se reveló con luminol (1 mL de solución peróxido y 1 mL de solución Luminol, SuperSignal West Pico) durante 5 minutos en oscuridad, para finalmente registrar imágenes digitales en un equipo ChemiScope 2000.

## **5.9. Generación de los vectores adenovirales.**

Los vectores adenovirales se generaron mediante el sistema AdEasy (Vogelstein y cols., 1998). Este sistema se basa en la recombinación homóloga entre un plásmido que contiene los genes adenovirales (pAdEasy-1) y un plásmido transportador que codifica el gen de interés. El proceso de recombinación se realiza transformando células *E. coli* AD-BJ5183 con el plásmido transportador previamente digerido con *Pme* I. Las células *E. coli* AD-BJ5183 contienen el plásmido adenoviral pAdEasy-1 y presentan una elevada actividad recombinante. Como resultado de la recombinación homóloga se obtiene un plásmido adenoviral recombinante de aproximadamente 37 kilobases. La verificación de la estructura del plásmido adenoviral se realiza mediante digestión con *Pac* I. Si la recombinación ocurrió entre los brazos de homologación, la digestión con *Pac* I genera un fragmento de 3 kb, mientras que si la recombinación ocurrió entre uno de los brazos y el origen de replicación se obtiene un fragmento de 4,5 kb. El plásmido adenoviral recombinante digerido con *Pac* I es transfectado en células empaquetadoras de adenovirus (HEK-293) para la generación de los vectores adenovirales (Figura 5).



**Figura 5. Esquema resumen de generación adenoviral.** Número 1: recombinación homóloga entre el plásmido transportador y pAdEasy-1 en células *E. coli* AD-BJ5183. Número 2: transfección con plásmido adenoviral en células HEK-293. Número 3: purificación de los vectores adenovirales en doble gradiente de cloruro de cesio.

### **5.9.1. Obtención de plásmidos recombinantes adenovirales.**

Para la obtención de los plásmidos recombinantes, se cortaron los plásmidos transportadores (pAdTrack-CMV-catalasa y pAdTrack-CMV) con la enzima *Pme* I para obtener una secuencia lineal y un correcto reconocimiento entre las zonas de homología entre el plásmido transportador y pAdEasy-1. Para ello, se hicieron varias digestiones de los plásmidos transportadores con *Pme* I durante 14 horas a 37°C en CutSmart 10x [tris-acetato 20 mM (pH 7,9), KCH<sub>3</sub>COO 50 mM, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/mL), con el fin de obtener una cantidad de ADN necesario para la transformación. Los productos de la digestión se purificaron en geles de agarosa 0,8% mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Mexico) y se ajustaron a una concentración 30 ng/μL.

Para la electroporación, se mezclaron 40 μL de células BJ5283-AD-1 electrocompetentes y 120 ng de plásmido purificado lineal en un microtubo y luego se traspasaron a una cubeta de electroporación de 400 μL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Luego, la mezcla de células y plásmido fue expuesta a un pulso de corriente eléctrica (2,5 kV; 200 ohms; 25 μF, 5 milisegundos) en un electroporador Eppendorf 2510. Las células se recuperaron rápidamente en 1 mL de medio LB a 37°C durante 1 hora con agitación, para posteriormente sembrarlas en placas de LB/Agar/kanamicina (50μg/ml), las cuales se incubaron durante 48 horas a 37°C. Los clones aislados en las placas se cultivaron en 5 mL de LB/kanamicina (50 μg/mL) a 37°C durante 14 horas. Luego, los plásmidos se purificaron mediante lisis alcalina y su estructura se confirmó mediante digestión con *Pac* I, que se realizó mezclando 5 μg del plásmido recombinante con 2 unidades de *Pac* I en amortiguador comercial ANZA® (composición registrada) e incubación a 37°C durante 14 horas.

Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células *E. coli* DH5alfa, para luego purificar el plásmido amplificado mediante el kit Midi-prep (Omega Bio-tek, Inc. EEUU). Los plásmidos adenovirales obtenidos se denominaron pAdV-GFP-Catalasa y pAdV-GFP.

### **5.9.2. Obtención y amplificación de los vectores adenovirales.**

Para la obtención de los vectores adenovirales, se procedió a transfectar células HEK-293 con el plásmido adenoviral pAdV-GFP-Catalasa o pAdV-GFP. Para este procedimiento, se usaron 5 μg de plásmido lineal (digerido con *Pac* I) para transfectar 2 x 10<sup>6</sup> células HEK-293 en una botella de 25 cm<sup>2</sup> usando polietilenimina como agente de transfección. Luego

de 13 a 15 días de transcurrida la transfección, se observaron cambios morfológicos en las células, que dejaron de presentar el aspecto estrellado normal y adquiriendo una morfología redonda, incluso algunas presentaron pérdida de adherencia al matraz (efecto citopático). Cuando más de un 50% de la placa presentó este efecto, se procedió a retirar las células del matraz con pipeteo, para recolectarlas en un tubo estéril de 15 mL, el cual se centrifugó a 3.350 x g durante 5 min, obteniendo así un precipitado de células. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se suspendió en 3 mL de PBS. Las células se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (25°C) (lisado primario). La amplificación de los vectores adenovirales consistió 4 ciclos de infección/expansión. El primer ciclo consistió en infectar un matraz de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo 2 x 10<sup>6</sup> células HEK-293 con 1,5 mL de lisado primario. Luego de 13 días las células presentan efecto citopático, se despegaron mediante pipeteo y se precipitaron mediante centrifugación a 3.350 x g durante 5 minutos. Se redujo el volumen de medio a 5 mL y las células se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-80°C/ 25°C).

El segundo ciclo de amplificación consistió en infectar un matraz de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 7x 10<sup>6</sup> células HEK-293 con 3 mL de lisado de la primera amplificación. Luego de 5 días las células presentan efecto citopático, se despegaron mediante pipeteo y se precipitaron mediante centrifugación a 3.350 x g durante 5 minutos. Se redujo el volumen de medio a 10 mL y las células se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-80°C/25°C).

El tercer ciclo de amplificación consistió en infectar 3 matraces de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 7 x 10<sup>6</sup> células HEK-293 cada uno con 800 µL de lisado de la segunda amplificación. Luego de 7 días desde la infección, las células presentan efecto citopático, se despegaron de la placa mediante pipeteo y se precipitaron mediante centrifugación a 3.350 x g durante 5 minutos. Las células se re-suspendieron en 25 mL de PBS y se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-80°C/25°C).

El cuarto ciclo de amplificación consistió en infectar 50 matraces de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 7 x 10<sup>6</sup> células HEK-293 cada uno con 450 µL de lisado de la tercera amplificación. Luego de 9 días después de la infección, las células presentaron efecto citopático, se despegaron de la placa mediante pipeteo y se precipitaron mediante centrifugación 3.350 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en 8 mL de PBS y se lisaron mediante 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-80°C/25°C).

### **5.9.3. Purificación de vectores adenovirales.**

Los vectores adenovirales se purificaron mediante doble gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Para la primera gradiente, a una botella para ultracentrífuga de 10,4 mL se agregaron 2,8 mL de CsCl de densidad 1,4 g/mL y luego se agregó cuidadosamente sobre este volumen 2,1 mL de CsCl de densidad 1,2 g/mL. Luego se agregó en la zona superior el lisado viral de la amplificación final previamente clarificado mediante centrifugación a 3.350 x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, la botella se llevó a una ultracentrífuga Optima XL-90 (Beckman, Palo Alto, CA, EEUU) y utilizando un rotor 80-Ti se centrifugó a 42.000 x g durante 90 minutos a 4°C. Luego, se extrajo mediante una pipeta Pasteur la banda que contenía los vectores adenovirales (interfase de las soluciones de CsCl) y se suspendió en 10,4 mL de CsCl de densidad 1,35 g/mL. Este tubo se centrifugó a 190.000 x g durante 18 horas a 15°C, sin freno al finalizar la corrida. La banda correspondiente a los vectores adenovirales se retiró usando un a pipeta Pasteur y se almacenó a -80°C.

### **5.10. Titulación de los vectores adenovirales mediante absorbancia a 260 nm.**

Para la cuantificación de las partículas virales se utilizó un método por espectrofotometría, que cuantifica el genoma adenoviral a través de su absorbancia a 260 nm (Mittereder y cols., 1996). Para ello, se realizaron 5 diluciones del stock adenoviral (1:2, 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50) en amortiguador de lisis viral (SDS 0,1%, Tris-HCL 10 mM, pH 7,4 , EDTA 1 mM). La mezcla de reacción se incubó a 56°C durante 10 minutos con agitación. Una vez finalizada la lisis, se determinó la absorbancia a 260 nm de las mezclas usando como blanco el amortiguador de lisis viral.

El cálculo del título de los adenovirus se obtuve aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Partículas virales/mL} = \text{ABS } 260 \text{ nm} \times \text{dilución} \times 1,1 \times 10^{12}. \quad (6)$$

El promedio de los títulos de las distintas diluciones se utilizó como título viral final.

### **5.11. Cultivo de células H4-II-E-C3.**

Las células H4-II-E-C3 (ATCC CRL-1600) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, esterilizado mediante filtración a 0,2 µm y suplementado con 10 mL de penicilina 10.000 UI/mL - estreptomycin 10.000µg/mL, anfotericina B 250 µg/mL, 5% de

suero bovino fetal y 20% de suero equino. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Midi 40 Series a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cultivaron en placas de poliestireno 35 y 100 mm. Los trasposos de cultivo celular se realizaron cuando la placa que contiene las células presentó una confluencia mayor a 80%, para ello se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25% y se llevó la incubadora durante 5 minutos. Terminado este periodo de incubación se agregó 5 mL medio de cultivo, mediante pipeteo se soltaron las células de la superficie de la placa, finalmente se agregó una alícuota (1/5 - 2/5) de células suspendidas a una nueva placa de cultivo.

### **5.12. Infección de células HEK-293 con los vectores adenovirales.**

Para analizar y cuantificar la actividad de la enzima catalasa en muestras tratadas con lisados virales, lo primero que se realizó fue sembrar  $1 \times 10^6$  células HEK-293 en placas de 35 mm. Al día siguiente, las células se infectaron con diferentes cantidades de lisados virales provenientes de la tercera amplificación viral. Estas muestras se dejaron incubar durante cuarenta y ocho horas en la incubadora a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizado el tiempo de incubación, las células se observaron al microscopio de fluorescencia (excitación 495 nm), se retiraron de la placa mediante pipeteo y se centrifugaron a 3.350 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células en 220 µL de PBS, para realizar las respectivas pruebas como el método de la espuma y el método colorimétrico.

### **5.13. Infección de células H4-II-E-C3 con los vectores adenovirales.**

Para analizar y cuantificar la actividad de la enzima catalasa en muestras tratadas con lisados virales, lo primero que se realizó fue sembrar  $1 \times 10^6$  células H4-II-E-C3 en placas de 35 mm. Al día siguiente, las células se infectaron usando Opti-MEN como medio de infección en una proporción de 1:3 con los lisados virales (1 parte de lisados virales con 3 partes de medio Opti-MEM) durante 6 horas. Una vez finalizado este tiempo, se suplementó con medio de cultivo y se incubó durante 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizado el tiempo de incubación, las células se observaron al microscopio de fluorescencia (excitación 495 nm, emisión 520 nm) y se retiraron de la placa mediante pipeteo y se centrifugaron a 3.350 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células en 220 µL de PBS, para realizar las respectivas pruebas como el método de la espuma y el método colorimétrico.

#### **5.14. Métodos Estadísticos**

Los experimentos en células H4-II-E-C3 se realizaron en cuadruplicado y los resultados se expresaron como el promedio de los resultados  $\pm$  el error estándar de la media.

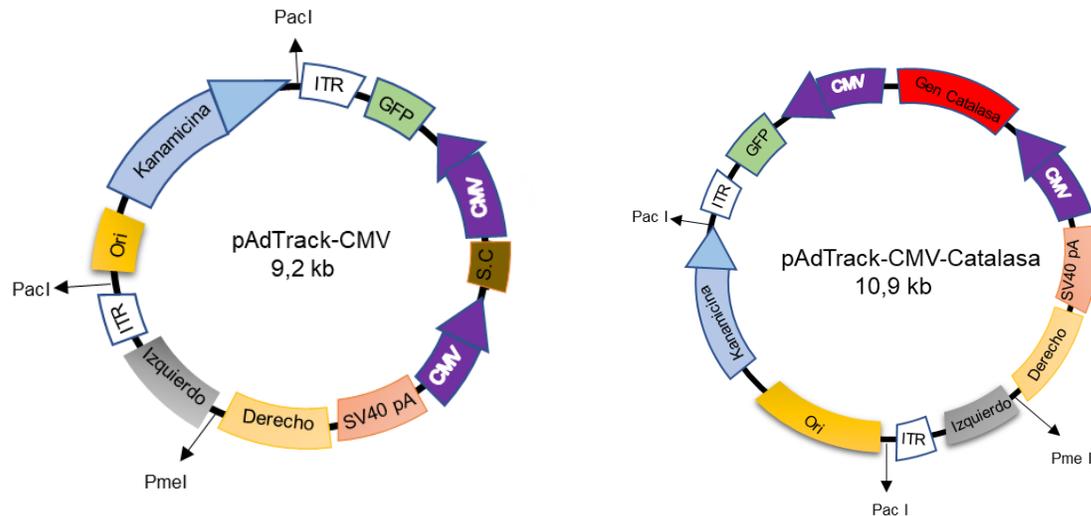
Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p \leq 0,05$ . El cálculo de la significancia de los resultados para cada experimento se realizó mediante análisis de t de Student. Se utilizó el programa Excel.

Para calcular la intensidad de las señales en Western Blot se utilizó el programa ImageJ, donde se cuantificó el área bajo la curva cada señal obtenida posterior a revelado con luminol.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Clonación del ADNc de catalasa en el plásmido pAdTrack-CMV.

En estudios previos realizados por Catalina Salinas (Materiales 4.3) se logró la clonación del ADNc de catalasa en el plásmido adenoviral pAdTrack-CMV para obtener el plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa (Figura 6). Las características del plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa son que contiene el ADNc de catalasa de rata bajo control del promotor CMV, también presenta como reportero la proteína fluorescente verde (GFP) cuya expresión también está bajo control del promotor CMV. Este plásmido también presenta un gen que le confiere resistencia a kanamicina. Adicionalmente, estos plásmidos transportadores presentan secuencias denominadas de homología que permiten su posterior recombinación homóloga con un plásmido que contiene el genoma adenoviral para generar el genoma de los vectores adenovirales que se proyectan en este estudio.



**Figura 6. Mapa del plásmido adenoviral pAdTrack-CMV y del plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa.** SV40 Pa: señal de poliadenilación. Ori: origen de replicación. Izquierdo y Derecho: brazos de homología con secuencias complementarias. PacI y PmeI: sitios de restricción. S.C: sitio de clonación. ITR: repeticiones terminales invertidas.

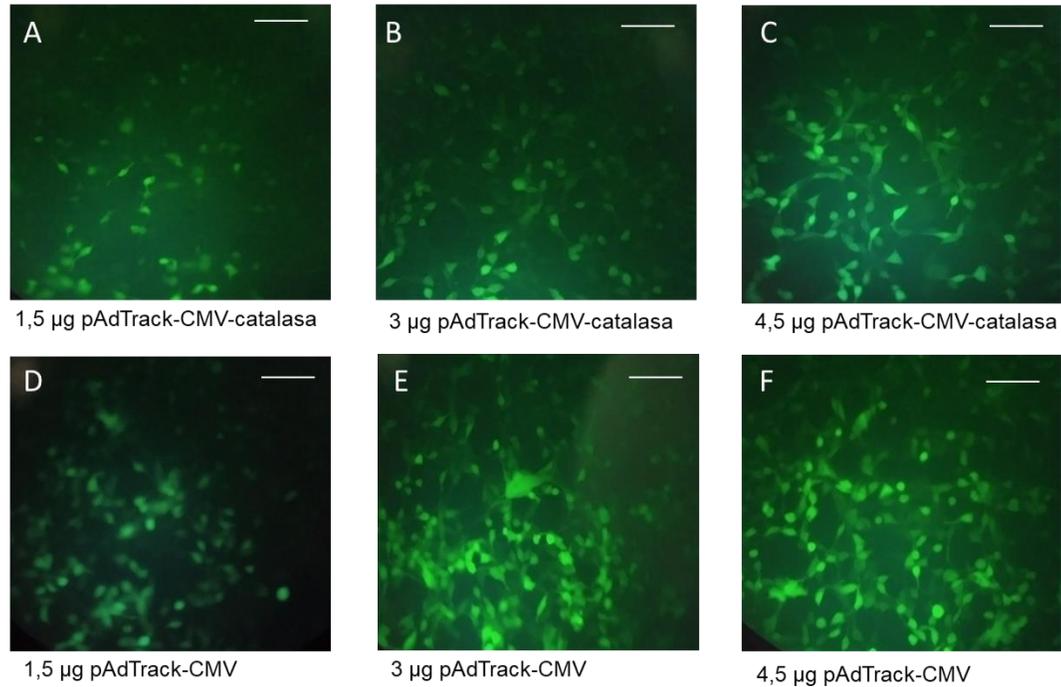
### 6.2. Estudio de la expresión de catalasa desde pAdTrack-CMV-catalasa.

Para comprobar si el ADNc de catalasa clonado en el plásmido pAdTrack-CMV-catalasa genera una proteína funcional, se transfectaron células HEK-293 con el plásmido pAdTrack-CMV-catalasa usando como agente de transfección polietilenimina y como control de transfección pAdTrack-CMV. Para este experimento se utilizaron células HEK-293, ya que

esta línea celular no presenta actividad catalasa intrínseca y además presenta una buena eficiencia de transfección.

La transfección de las células HEK-293 se realizó usando 1,5; 3 y 4,5  $\mu\text{g}$  de pAdTrack-CMV-catalasa o pAdTrack-CMV como control. Luego de 48 horas posteriores a la transfección se determinó la expresión del reportero GFP mediante microscopía de fluorescencia y la expresión de catalasa en los lisados celulares mediante el método de espuma (métodos.5.6) y el método colorimétrico (métodos 5.7).

Los resultados de los estudios de microscopía de fluorescencia mostraron que en todos los cultivos se observó fluorescencia verde. También se observó que a medida que aumentaba la cantidad de plásmido transfectados, aumentaba la fluorescencia de GFP en las células HEK-293 (Figura 7). En el caso de pAdTrack-CMV-Catalasa se observa que al usar 1,5  $\mu\text{g}$  de plásmido se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 20% (Figura 7A), al aumentar la cantidad de plásmido a 3  $\mu\text{g}$  se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 45% (Figura 7B) y finalmente para 4,5  $\mu\text{g}$  de plásmido este porcentaje aumentó a 65% (Figura 7C). En cambio, para el plásmido pAdTrack-CMV se observó un mayor número de células fluorescentes a una misma cantidad de plásmido en relación a pAdTrack-CMV-Catalasa. Al usar 1,5  $\mu\text{g}$  de pAdTrack-CMV se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 25% (Figura 7D), para 3  $\mu\text{g}$  de este plásmido se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 55% (Figura 7E) y finalmente para 4,5  $\mu\text{g}$  de plásmido se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 70%.



**Figura 7. Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdTrack-CMV-catalasa y pAdTrack-CMV.** *El porcentaje de fluorescencia se determinó mediante el análisis de la cantidad de células que emiten fluorescencia comparada con la cantidad de células presentes en un cuadrante. La barra blanca representa 100µm.*

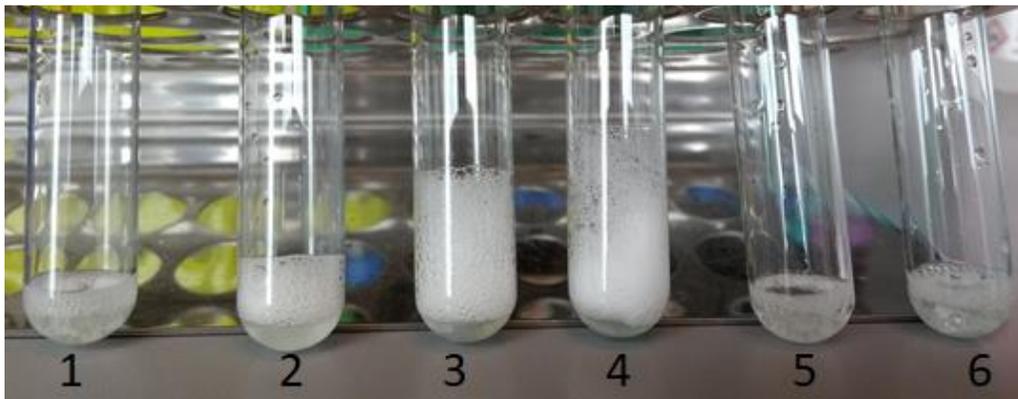
### **6.2.1. Análisis de la expresión de catalasa mediante el método de la espuma.**

Para realizar este método, se utilizaron los mismos cultivos celulares analizados anteriormente por microscopía de fluorescencia. Las células se recolectaron desde la placa de cultivo y se lisaron usando Tritón X-100. La adición de peróxido de hidrógeno al 30% al lisado, permite la acción de la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno generando agua y oxígeno. El oxígeno generado permite la formación de espuma, cuya medición puede asociarse a la actividad de catalasa en los lisados (ver métodos 5.6).

Los resultados mostraron que los lisados de las células transfectadas con 1,5 µg de pAdTrack-CMV-Catalasa generaron 1,1 cm de espuma (Figura 8, tubo 2), las células transfectadas con 3 µg de este plásmido generaron 2,1 cm de espuma (Figura 8, tubo 3), y las células transfectadas con 4,5 µg generaron 2,6 cm de espuma (Figura 8, tubo 4). En cambio, los lisados de las células transfectadas con pAdTrack-CMV sólo generaron 0,1 cm

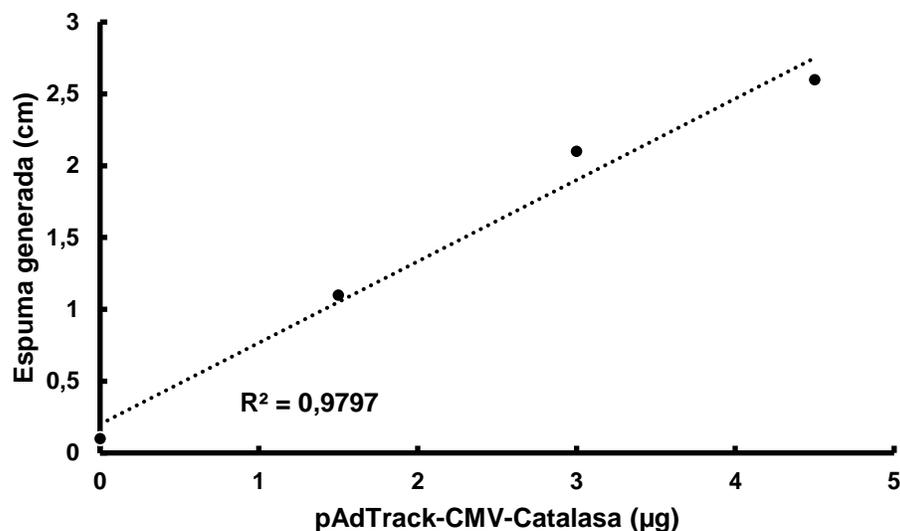
de espuma (Figura 8, tubos 5 y 6), la misma cantidad de espuma generada por el lisado de células sin transfectar (Figura 8, tubo 1).

La correlación entre la espuma generada y la cantidad de pAdTrack-CMV-catalasa (Figura 9) mostró un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) de 0,9797. Esto indica que a medida que se aumenta la cantidad de plásmido transfectados, aumenta proporcionalmente la cantidad de espuma generada, debido al aumento de expresión de la enzima catalasa.



**Figura 8. Resultados de expresión de catalasa mediante el método de espuma.**

*Medición de espuma generada en lisados celulares transfectados con plásmidos pAdTrack-CMV-Catalasa y pAdTrack-CMV, además se agrega un lisado sin transfectar. Fotografía realizada 5 minutos después de agregar peróxido de hidrógeno 30%. Lisados de células HEK-293 analizados. 1: sin transfectar; 2: transfectados con 1,5  $\mu$ g de pAd-Track-CMV-catalasa; 3: transfectados con 3  $\mu$ g de pAd-Track-CMV-catalasa; 4: transfectados con 4,5  $\mu$ g de pAd-Track-CMV-catalasa; 5: transfectados con 1,5  $\mu$ g de pAd-Track-CMV y 6: transfectados con 3  $\mu$ g de pAd-Track-CMV.*

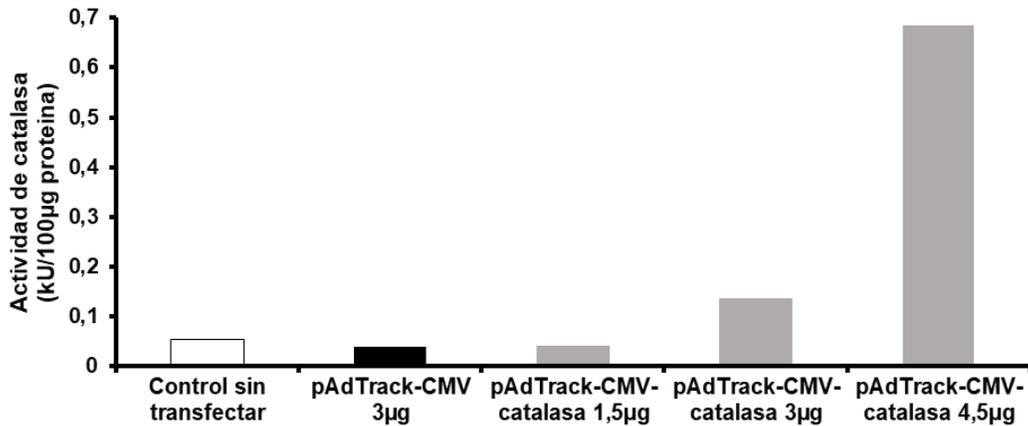


**Figura 9. Determinación de espuma generada de acuerdo con la cantidad de plásmido pAdTrack-CMV-catalasa.** *Correlación entre los centímetros de espuma generada con lisados celulares HEK-293 transfectados con diferentes cantidades de plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa.*

### 6.2.2. Análisis cuantitativo de la expresión de catalasa mediante método colorimétrico.

Para realizar este método, se ocupó una alícuota de las células transfectadas con pAdTrack-CMV-catalasa y pAdTrack-CMV suspendidas en PBS. La suspensión de células se sometió a sonicación para obtener un lisado celular y posteriormente se cuantificaron las proteínas totales. Los ensayos se realizaron usando 100 µg de proteínas totales de acuerdo a lo indicado en Métodos 5.7.

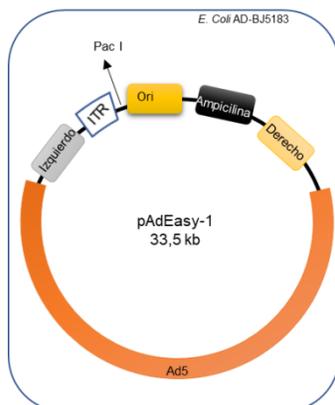
Los resultados mostraron que para los lisados provenientes de células transfectadas con 1,5 µg de pAdTrack-CMV-catalasa se detectó una actividad de catalasa de 0,041 kU/100 µg de proteína. Para los lisados de células transfectadas con 3 µg de plásmido se encontró una actividad de catalasa de 0,1371 kU/100 µg de proteína, mientras que los lisados de células transfectadas con 4,5 µg de plásmido la actividad fue de 0,68 kU/100 µg de proteína. Los lisados de células transfectadas con el plásmido control pAdTrack-CMV (3 µg) presentaron una actividad de catalasa de 0,039 kU/100 µg de proteína, y el control sin transfectar presentó una actividad de catalasa de 0,035 kU/100 µg de proteína (Figura 10).



**Figura 10. Actividad de catalasa en lisados celulares HEK-293 transfectados con diferentes cantidades de plásmido pAdTrack-CMV-Catalasa y pAdTrack-CMV.** La actividad de catalasa se expresa en términos de kilo unidades (kU) por 100 µg de proteínas totales. Una kU equivale a la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 mmol de peróxido de hidrógeno cada 1 minuto de reacción.

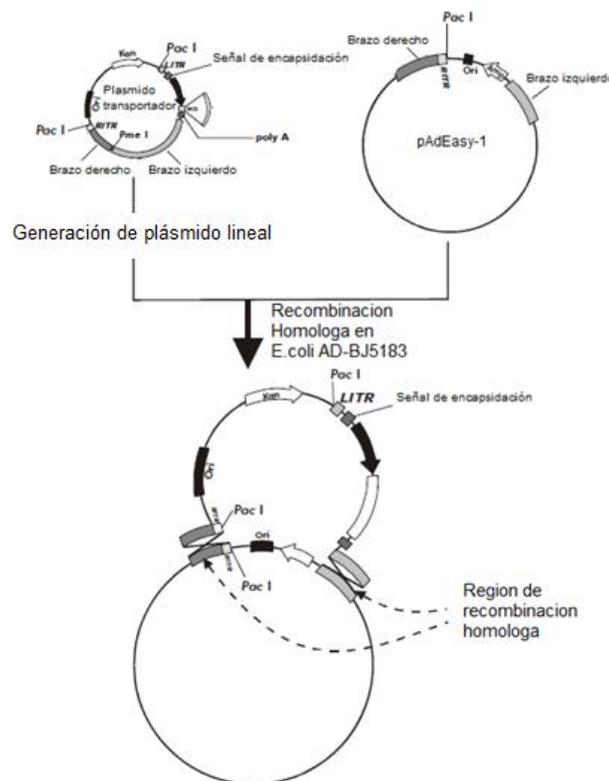
### 6.3. Generación de los plásmidos adenovirales.

Los resultados anteriores confirmaron que el plásmido transportador pAdTrack-CMV-catalasa expresa correctamente el ADNc de catalasa, ya que se pudo detectar la actividad de la enzima mediante los métodos de espuma y colorimétrico. En el siguiente paso, se procedió a obtener plásmidos adenovirales codificantes de catalasa y control mediante la recombinación homóloga de estos plásmidos transportadores con el plásmido adenoviral AdEasy-1 que también presenta los brazos de homología presentes en los plásmidos transportadores (Figura 11).



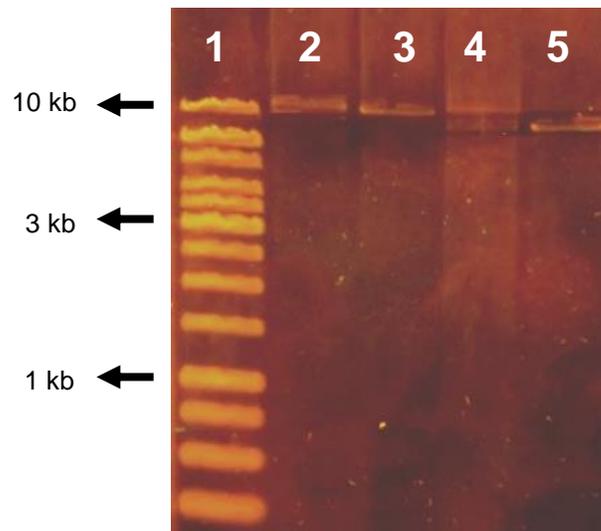
**Figura 11. Mapa de plásmido adenoviral pAdEasy-1 presente en E. coli AD-BJ5183.** Ad5 genoma de adenovirus tipo humano de serotipo 5. Izquierdo y Derecho: brazos de homología con secuencias complementarias. Pac I: sitio de restricción. Ori: origen de replicación. Ampicilina: gen de resistencia ampicilina. ITR: repeticiones terminales invertidas.

Para la recombinación homóloga, los plásmidos transportadores se linearizaron mediante digestión con *Pme* I. Luego, esta secuencia lineal se utilizó para electroporar células *E. coli* AD-BJ5183 que contenían en su interior el plásmido adenoviral pAdEasy-1. El reconocimiento de los brazos de homología presente en ambos plásmidos (transportador y pAdEasy-1) y la presencia de una recombinasa en las células *E. coli* AD-BJ5183 permitió el intercambio entre los plásmidos de las secuencias comprendidas entre los brazos de homología. Este proceso resultó en la generación de un plásmido adenoviral recombinante que posee los genes adenovirales provenientes de pAdEasy-1 más la secuencia del gen de interés que estaba presente en el plásmido transportador (Figura 12). Esta recombinación también puede ocurrir en la secuencia Ori y el brazo derecho de homología, obteniendo igualmente un plásmido adenoviral funcional.



**Figura 12. Proceso de recombinación homóloga entre plásmido transportador y pAdEasy-1 en células *E. coli* AD-BJ5183.** Proceso de recombinación homóloga para la obtención del plásmido adenoviral recombinante que contiene los genes adenovirales y el gen de interés. Esta recombinación también se puede realizar entre el brazo derecho de homología y el origen de replicación. El plásmido adenoviral resultante presenta resistencia a kanamicina.

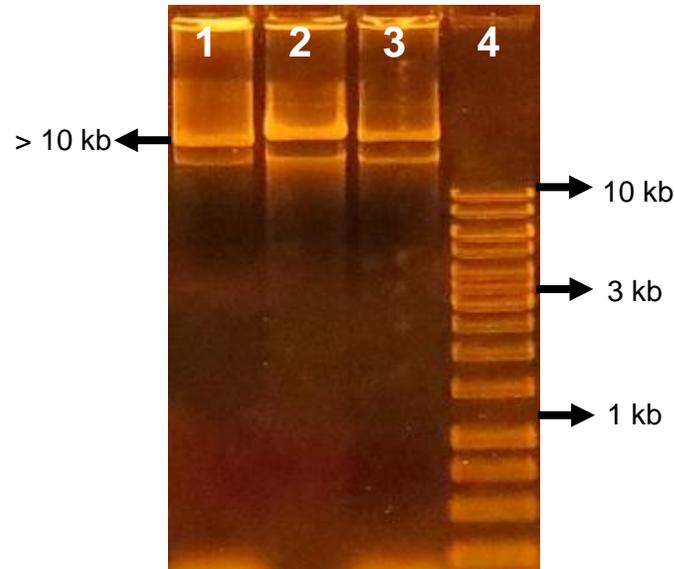
Para la recombinación homóloga, los plásmidos pAdTrack-CMV-catalasa y pAdTrack-CMV se digirieron por la enzima de restricción *Pme* I (Figura 13). Los resultados de la digestión enzimática muestran que ambos plásmidos generaron una banda única de 10,97 kb para el plásmido pAdTrack-CMV-catalasa y para pAdTrack-CMV de 9,24 kb. Luego, se ajustó la concentración de los plásmidos a 30 ng/μL y se electroporaron células *E. coli* AD-BJ5183 de acuerdo con lo indicado en Métodos 5.9.1.



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos transportadores pAdTrack-CMV y pAdTrack-CMV-catalasa digeridos con *Pme* I.** En cada carril se cargaron 3 μL de muestra, carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: pAdTrack-CMV-catalasa; carril 3: pAdTrack-CMV-catalasa/*Pme*I; carril 4: pAdTrack-CMV; carril 5: pAdTrack-CMV/*Pme*I.

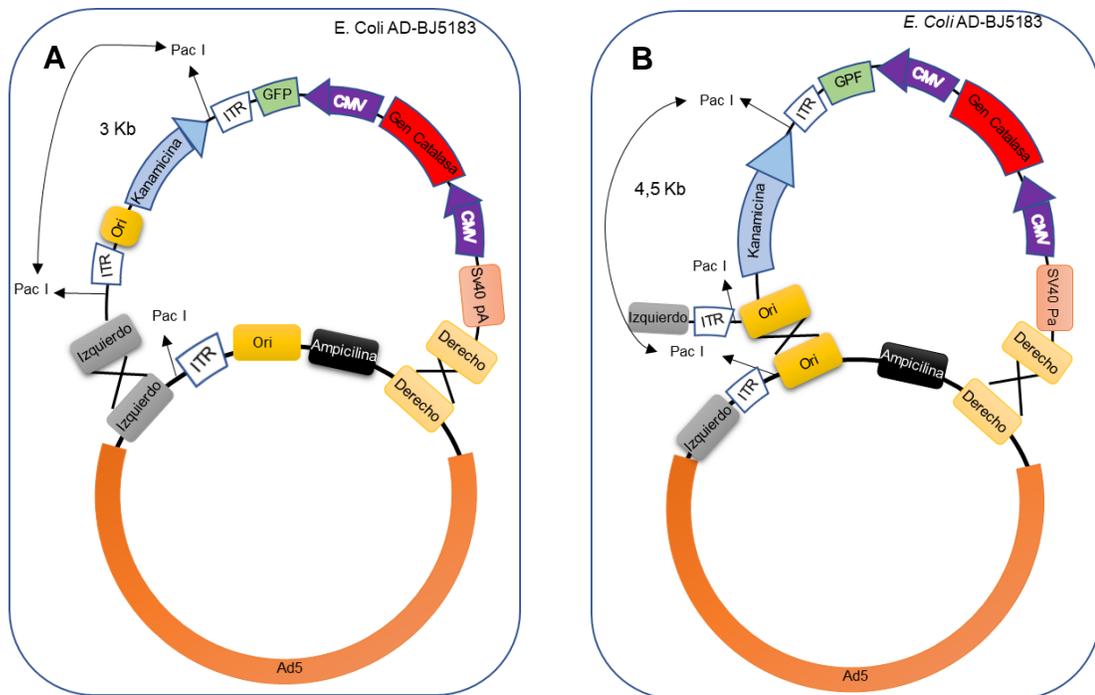
Las células electroporadas se sembraron en 3 placas LB/agar/kanamicina, en una de ellas se sembraron 100 μL, en otra 300 μL y en la última 600 μL para obtener los clones de interés. Para la recombinación entre pAdTrack-CMV-catalasa y pAdEasy-1 se obtuvo sólo una colonia en la placa de 600 μL, mientras que para la recombinación entre pAdTrack-CMV y pAdEasy-1 se obtuvo 6 colonias en la placa que se sembraron 100 μL, 18 colonias para la placa que se sembraron 300 μL y 36 colonias para la placa que se sembraron 600 μL. La purificación de los plásmidos correspondientes se realizó mediante lisis alcalina y su tamaño se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa. El tamaño teórico del plásmido resultante de la recombinación de pAdTrack-CMV-catalasa y pAdEasy-1 (pAdV-catalasa-GFP) era de 39,16 kb, mientras que el tamaño del plásmido resultante de la

recombinación entre pAdTrack-CMV y pAdEasy-1 (pAdV-GFP) era de 35,73 kb. Los resultados de la electroforesis de los plásmidos adenovirales recombinantes (Figura 14), mostraron que ambos plásmidos pAdV-catalasa-GFP (Figura 14, carril 2) y pAdV-GFP (Figura 14, carril 3) presentaron un tamaño mayor a 10 kb, pero también mostraron ser de un tamaño mayor a pAdEasy-1 (Figura 14, carril 1) que tiene una secuencia de 33,47 kb, lo cual es sugerente de la incorporación de las secuencias del plásmido transportador en pAdEasy-1.



**Figura 14. Fotografía de electroforesis de agarosa de los plásmidos adenovirales resultantes de la recombinación homóloga.** Se cargaron 3  $\mu$ L de cada plásmido en cada carril, en un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: pAdEasy-1, carril 2: pAdV-catalasa-GFP, carril 3: pAdV-GFP, carril 4: estándar de peso molecular (5 $\mu$ L). La electroforesis se realizó a 80 voltios durante 90 minutos de corrida, para la tinción se utilizó gel red<sup>®</sup> y se reveló con luz Ultravioleta 312nm.

Para confirmar si la recombinación homóloga fue efectiva, se realizó la digestión confirmatoria con la enzima de restricción *Pac* I, en donde se puede tener 2 posibilidades de fragmentación del plásmido recombinante. La primera posibilidad es la generación de un fragmento de 3 kb, lo que indica que la recombinación ocurrió entre los brazos de homología (Figura 15.A). La segunda posibilidad es que la digestión con *Pac*I se genere un fragmento de 4,5 kb, lo que indica que la recombinación ocurrió entre el brazo de homología derecho y el origen de replicación (Figura 15.B)

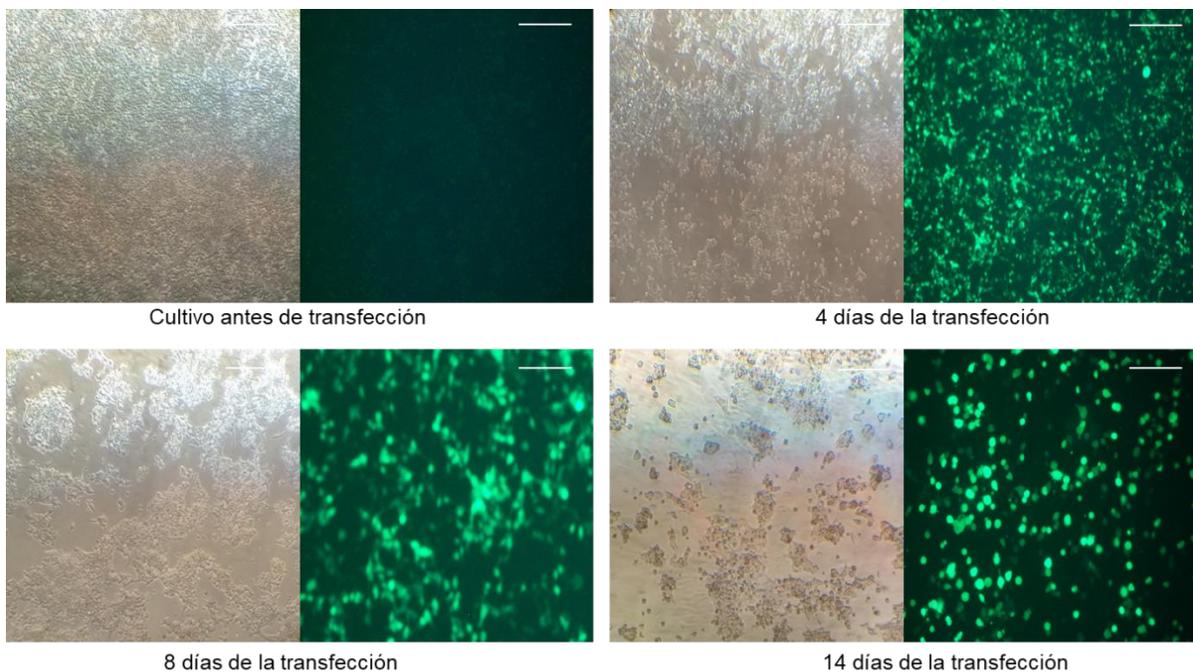


**Figura 15. Alternativas de recombinación homóloga entre pAdEasy-1 y el plásmido transportador en células *E. coli* AD-BJ5183.** (A) Si la recombinación ocurre en los brazos de homología, los sitios de restricción *Pac I* quedan a una distancia de 3 kb entre ellos, (B) en cambio si la recombinación ocurre en el brazo de homología derecho y el Ori, los sitios de restricción para *Pac I* quedan a una distancia de 4,5 kb entre ellos.

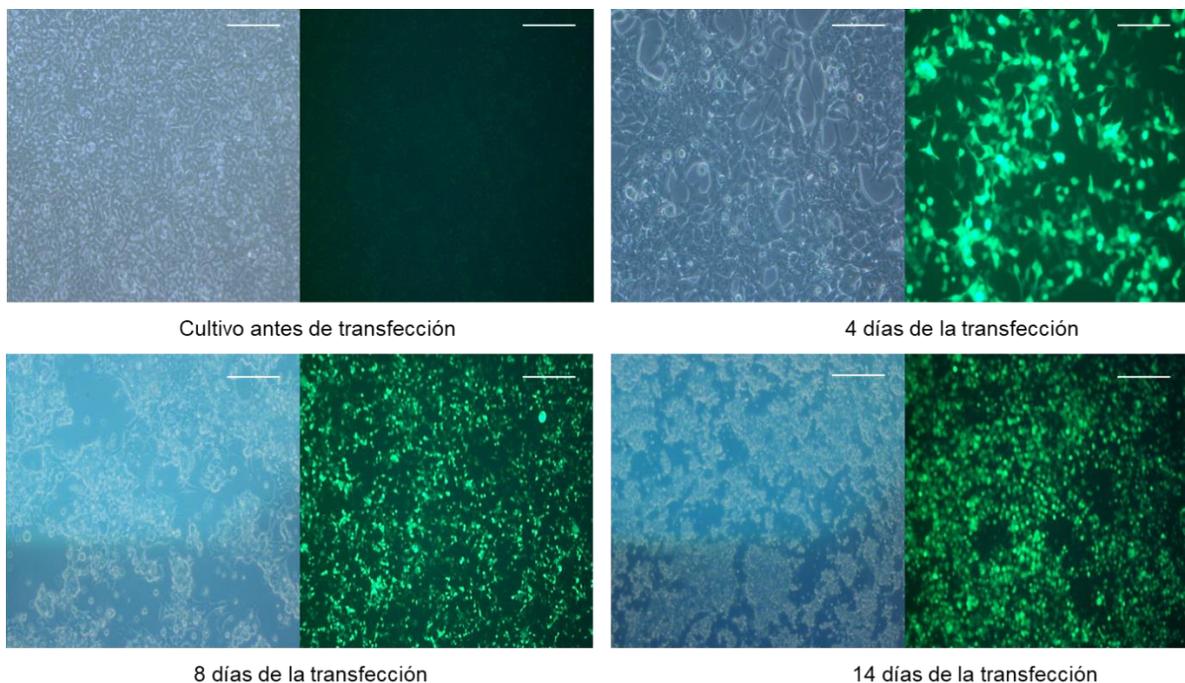
Para comprobar la estructura de los plásmidos recombinantes pAdV-catalasa-GFP y pAdV-GFP, éstos se digirieron con *Pac I*. Los resultados de la digestión confirmaron que la recombinación homóloga fue efectiva, liberándose dos fragmentos de 34,6 y 4,5 kb para el plásmido recombinante pAdV-catalasa-GFP (Figura 16, número 3), indicando que la recombinación de este plásmido ocurrió entre el brazo derecho de homología y Ori. Para el plásmido pAdV-GFP la digestión con *Pac I* generaron dos fragmentos de 32,7 kb y 3 kb, (Figura 16, número 4) indicando que la recombinación ocurrió entre los brazos de homología. Como control se observó que el plásmido pAdEasy-1, no sujeto a la recombinación homóloga, generó un solo fragmento de 33 kb posterior a la digestión con *Pac I*.



La transfección de las células HEK-293 se realizó usando polietilenimina como agente de transfección y usando 3 µg de pAdV-Catalasa-GFP o pAdV-GFP para 2 x 10<sup>6</sup> células HEK-293 cultivadas en un matraz de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Luego de 13-15 días posteriores a la transfección se observaron cambios en la morfología de las células (Figura 17), las cuales pasaron de tener forma estrellada a un aspecto más redondo. Posteriormente estas células se comenzaron a despegar de la placa (efecto citopático), lo cual indica que el proceso de infección viral se ha realizado efectivamente. Luego de que más del 50% de las células presentaron efecto citopático se procedió a retirar las células del matraz y lisarlas mediante ciclos de congelamiento y descongelamiento (ver métodos 5.9.2). Resultados similares se obtuvieron al transfectar las células HEK-293 con el plásmido pAdV-GFP (Ver Figura 18)



**Figura 17. Microfotografías de campo luminoso y fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdV-GFP-Catalasa.** *En las imágenes se puede observar el avance del efecto citopático que presentan estas células a medida que avanzan los días posteriores a la transfección. La barra blanca representa 100 µm*



**Figura 18. Microfotografías de campo luminoso y fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con pAdV-GFP.** *Se determinó el efecto citopático bajo luz visible y la fluorescencia de células HEK-293 a distintos tiempos después de la transfección con pAdV-GFP. La barra blanca representa 100  $\mu$ m*

El siguiente paso del proceso de amplificación de los vectores adenovirales consideró la infección de una botella de 25 cm<sup>2</sup> que contenía células HEK-293 a un 70-80% de confluencia con lisado de las células transfectadas. Luego de 4-5 días desde la infección, más de un 50% de las células presentaron efecto citopático. Por ello se procedió a recolectar las células para posterior lisis mediante ciclos de congelamiento y descongelamiento y re-suspensión en 5 mL de PBS. En un segundo paso de amplificación viral, se agregaron 3 mL del lisado anterior a una botella de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo células HEK-293 a un 70-80% de confluencia, encontrándose que 5-6 días después de la infección, la mayoría de las células presentaron efecto citopático. Las células se recolectaron, se suspendieron en 10 mL de medio de cultivo y se lisaron mediante ciclos de congelamiento y descongelamiento. La tercera amplificación consideró la infección con 600  $\mu$ L del lisado anterior de 3 botellas de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo células HEK-293 a confluencia, observándose luego de 6-7 días efecto citopático en la mayoría de las células. Se recolectaron las células, se suspendieron en 25 mL de PBS y se lisaron ciclos de congelamiento y descongelamiento.

## 6.5. Determinación de la funcionalidad de los vectores adenovirales en células HEK-293.

Antes de proceder con la amplificación en gran escala de los vectores adenovirales, se estudió la capacidad de los vectores de expresar catalasa mediante la infección de células HEK-293 con lisados celulares provenientes de la tercera amplificación.

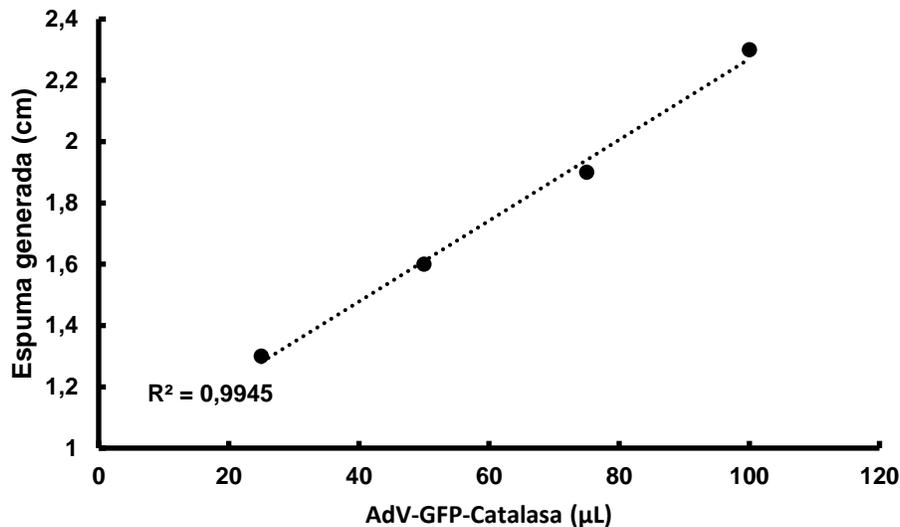
### 6.5.1. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método de la espuma.

Para realizar este estudio, se utilizaron  $1 \times 10^6$  células HEK-293 previamente infectadas con diferentes cantidades de lisado celular conteniendo los adenovirus AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP. Cuarenta y ocho horas después de la infección las células se recolectaron, se lisaron usando Tritón X-100 y se usaron para medir la actividad de catalasa mediante el método de la espuma. Los resultados mostraron (Figura 19) que los lisados de células HEK-293 que se infectaron con 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$  de lisado conteniendo AdV-GFP-Catalasa catalasa generaron 1,3; 1,6; 1,9 y 2,3 cm de espuma respectivamente (Figura 19, número 2, 3, 4, 5). En cambio, los lisados celulares infectados con el lisado conteniendo AdV-GFP no generaron espuma, al igual que células HEK-293 sin infectar. Además, se determinó la correlación entre la espuma generada con la cantidad de lisado agregado a los cultivos de células HEK-293 (Figura 20). Se encontró una proporcionalidad directa entre la cantidad de espuma generada y la cantidad de lisado viral agregada a las células con un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) de 0,9945.



**Figura 19. Determinación de la expresión de catalasa mediante el método de espuma en lisados de células HEK-293 infectadas con AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.**

*Fotografía realizada a los 5 minutos después de agregar peróxido de hidrógeno 30%. Tubo 1: lisado células HEK-293 sin infectar. Tubo 2; 3; 4; 5 lisado células HEK-293 infectadas con 25; 50 ;75 ;100  $\mu\text{L}$  respectivamente de lisado AdV-GFP-Catalasa. Tubo 6; 7; 8; 9 : lisado células HEK-293 infectadas con 25; 50; 75; 100  $\mu\text{L}$  respectivamente de lisado AdV-GFP.*

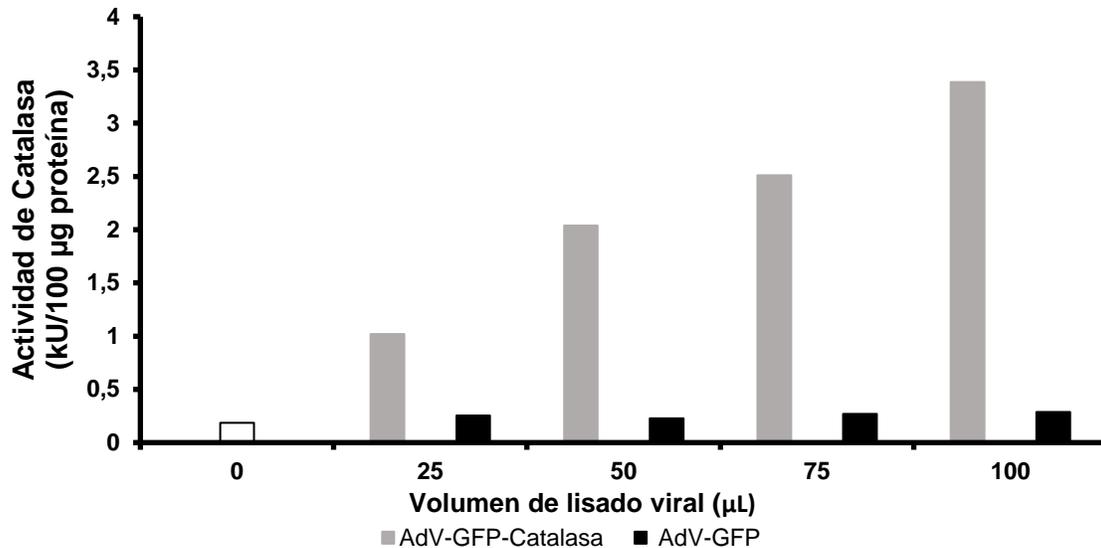


**Figura 20. Correlación entre la espuma generada y la cantidad de AdV-GFP-Catalasa transfectado en células HEK-293.** *La correlación lineal se ajusta correctamente al modelo, indica que a medida que aumenta la cantidad de AdV-GFP-Catalasa aumenta proporcionalmente la cantidad de espuma generada.*

### 6.5.2. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método colorimétrico.

Para realizar este método, se usó una alícuota de las células infectadas con lisados virales de AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP suspendidas en PBS. La suspensión de células se sometió a sonicación para obtener un lisado celular y posteriormente cuantificó las proteínas totales presentes. Los ensayos se realizaron usando 100 µg de proteínas totales de acuerdo a lo indicado en la sección métodos 5.7.

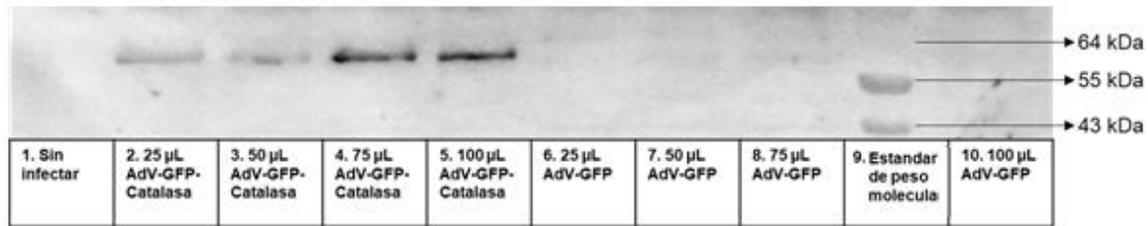
Los resultados mostraron que los lisados provenientes de células infectadas con 25, 50, 75 y 100 µL de lisado de AdV-GFP-Catalasa se detectó una actividad de catalasa de 1,02; 2,04; 2,51 y 3,385 kU/100 µg proteínas respectivamente (Figura 21). En cambio, para los lisados celulares HEK-293 infectadas con 25, 50, 75 y 100 µL de lisado virus AdV-GFP se detectó una actividad de catalasa de 0,256; 0,229; 0,27 y 0,289 kU/100 µg proteína respectivamente, mientras que el lisado celular sin infectar presentó una actividad de catalasa 0,187 kU/100 µg.



**Figura 21. Actividad de catalasa en células HEK-293 infectadas con diferentes volúmenes de lisado celular conteniendo AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP.** La actividad de catalasa se expresa en términos de kilo unidades (kU) por 100 µg de proteínas totales. Una kU equivale a la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 mmol de peróxido de hidrógeno cada 1 minuto de reacción. Color blanco es el control sin infectar. Color gris son lisados infectados con AdV-GFP-Catalasa. Color negro lisados infectados con AdV-GFP.

### 6.5.3. Western Blot de lisados de células HEK-293 infectadas con los vectores AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.

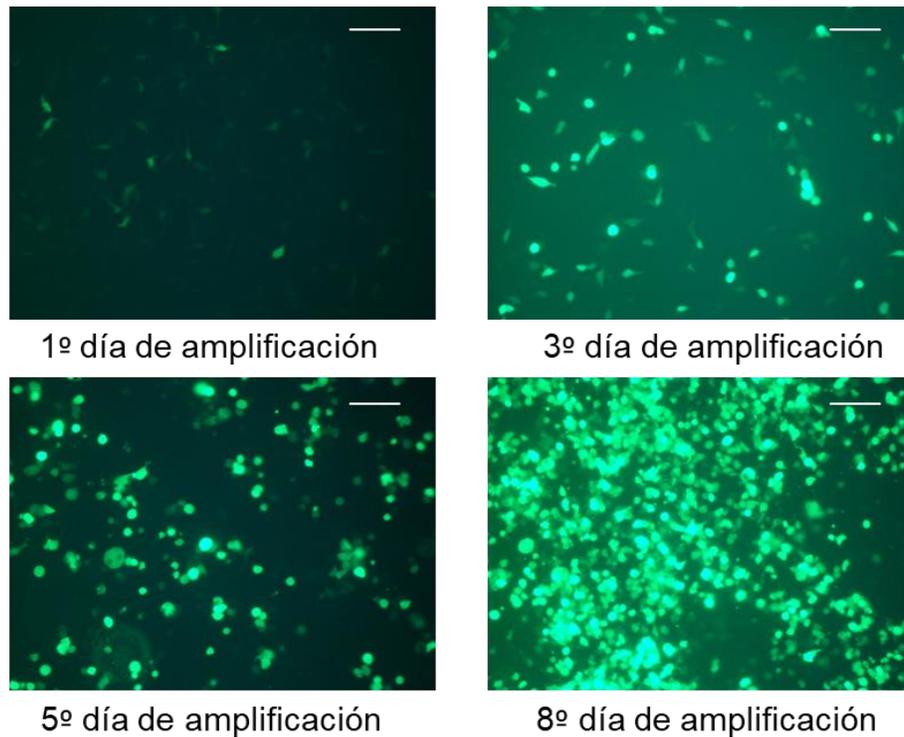
Usando los mismos lisados con los que se determinó la actividad de catalasa mediante el método colorimétrico, se determinó los niveles de catalasa mediante western blot. Los resultados mostraron que solo los lisados de las células HEK-293 infectadas con el virus AdV-GFP-Catalasa se detectó la proteína catalasa (64 kDa), mientras las células no infectadas o infectadas con el virus control AdV-GFP no se detectó esta enzima (Figura 22). Además se observó que a medida que aumentó la cantidad de lisado conteniendo AdV-GFP-Catalasa en la infección de las células HEK-293 se observó mayores niveles proteicos de catalasa.



**Figura 22. Análisis de Western Blot para la expresión de catalasa en células HEK-293 infectadas con los virus AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.** En cada carril se cargaron 20 µg de proteínas, para detectar la expresión de catalasa se utilizó un anticuerpo primario anti-catalasa (F-17), secundario anti-goat IgG-HRP. El revelado de las bandas se realizó usando luminol.

### 6.6. Amplificación final de vectores adenovirales.

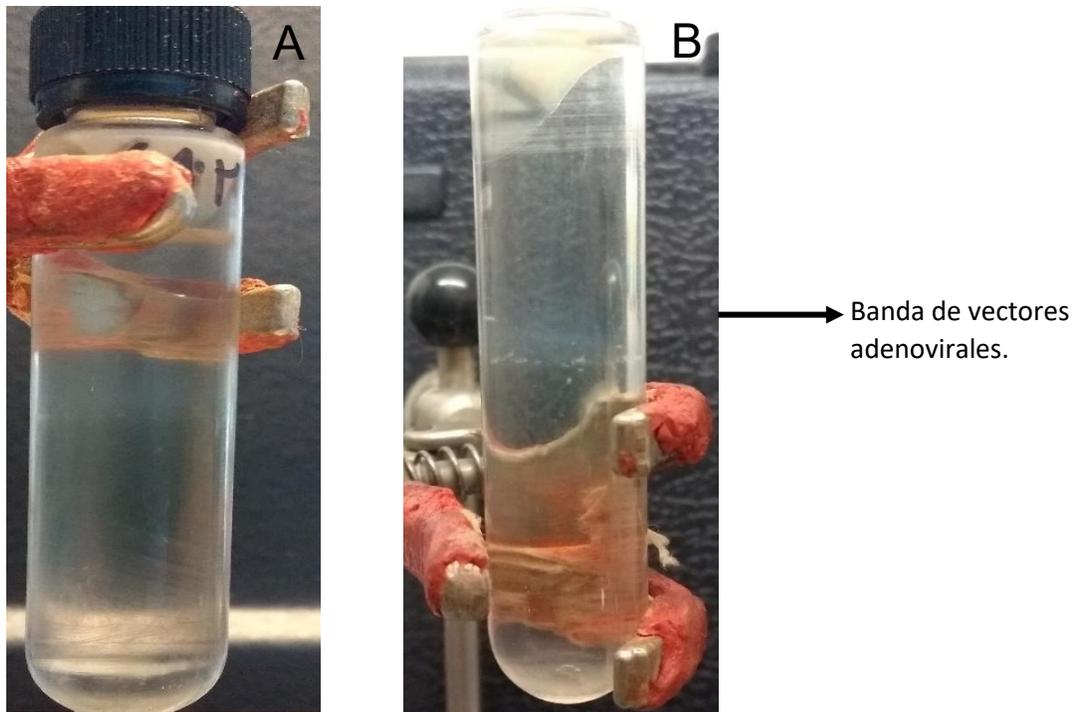
Luego de confirmar que el virus AdV-GFP-Catalasa, expresa correctamente la catalasa y que el virus control AdV-GFP no expresa esta proteína, se procedió a la amplificación final de los vectores adenovirales. Esta consistió en infectar cada una de 50 botellas de 75 cm<sup>2</sup> con células HEK-293 a confluencia con 300 µL de lisado de la tercera amplificación. Luego de 9-10 días se observó en la mayoría de las células el efecto citopático que caracteriza a la amplificación del adenovirus. En la Figura 23 se muestra la relación entre el efecto citopático y la fluorescencia que emiten las células HEK-293 durante la amplificación del virus AdV-GFP-Catalasa. A medida que avanzaban los días pos-infección aumentaban las células que presentaban efecto citopático (morfología redondeada) y junto con ello el número de células que emitían fluorescencia. Luego de la amplificación final, las células de las 50 botellas se suspendieron en 8 mL de PBS, se lisaron mediante ciclos de congelamiento y descongelamiento y se almacenaron a -80°C para la posterior purificación de los vectores adenovirales mediante gradiente de cloruro de cesio.



**Figura 23. Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293 infectadas con lisado viral de AdV-GFP-Catalasa durante el proceso de amplificación final.** *La cantidad de células que emitían fluorescencia aumentó a medida que transcurrieron los días posteriores a la infección, además se visualizó que las células comenzaban a cambiar su forma estrellada a forma redonda (efecto citopático). La barra blanca representa 100  $\mu\text{m}$ .*

### 6.7. Purificación de los vectores adenovirales.

La purificación de los vectores se realizó mediante doble gradiente de cloruro de cesio (ver métodos 5.9.3). Los resultados mostraron que la purificación resultó en un bajo rendimiento de vectores adenovirales, ya que se observó una banda tenue en la región de la gradiente donde migran los vectores adenovirales (Figura 24). Las bandas adenovirales se recuperaron y se determinó el título adenoviral mediante absorbancia a 260 nm (ver métodos 5.10). Los resultados mostraron que título del virus AdV-GFP-Catalasa fue de  $4,8 \times 10^{10}$  partículas virales/mL, mientras que para el adenovirus AdV-GFP fue de  $4,7 \times 10^{10}$  partículas virales/mL.



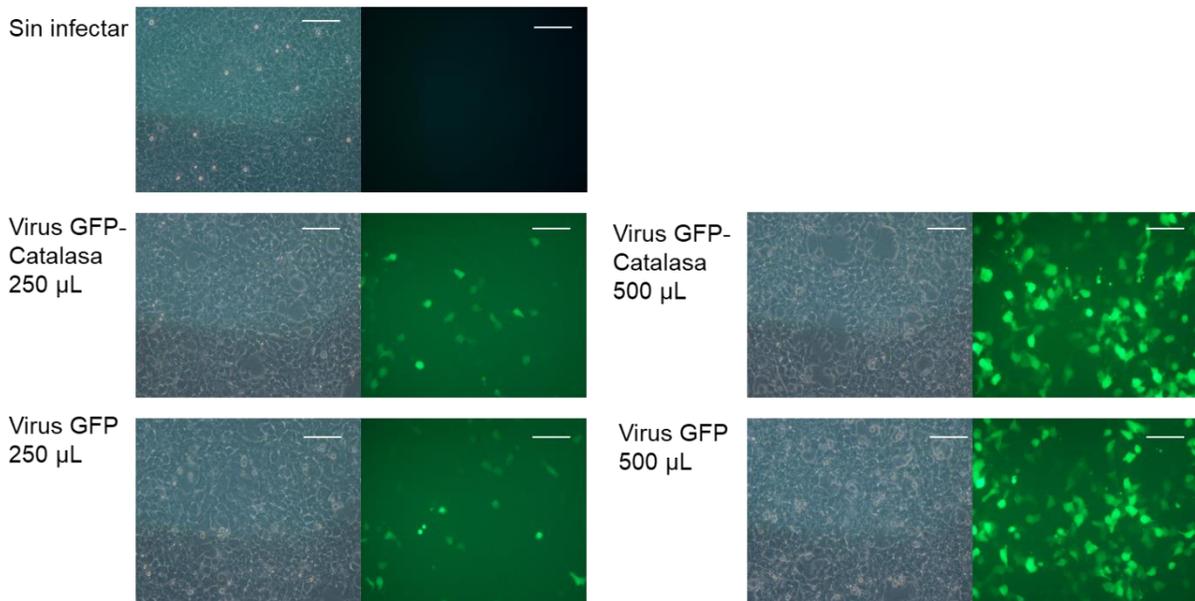
**Figura 24. Purificación de vectores adenovirales mediante ultracentrifugación por doble gradiente de cloruro de cesio.** (A) Purificación resultante para virus AdV-GFP, (B) Purificación resultante para AdV-GFP-Catalasa. En ambas fotografías se tomaron una vez terminada la segunda ultracentrifugación.

### **6.8. Determinación de la funcionalidad de los vectores adenovirales en células H4-II-E-C3.**

Para determinar si los vectores adenovirales son capaces de sobre-expresar la actividad de catalasa en un contexto hepático, se utilizó las células H4-II-E-C3 de hepatoma de rata. Además, estas células no poseen la capacidad de amplificar el vector adenoviral. Para realizar este procedimiento se infectó las células H4-II-E-C3 con lisados virales provenientes de la tercera amplificación.

Los resultados de los estudios de microscopía de fluorescencia mostraron que en todos los cultivos infectados con virus se observó fluorescencia verde. En cambio los cultivos sin infectar no presentaron fluorescencia. En la Figura 25 se observó que ambos vectores adenovirales (AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP) presentaron similares eficiencias de infección, ya que al adicionar 250  $\mu$ L de virus, para ambos vectores se observó un 35% de

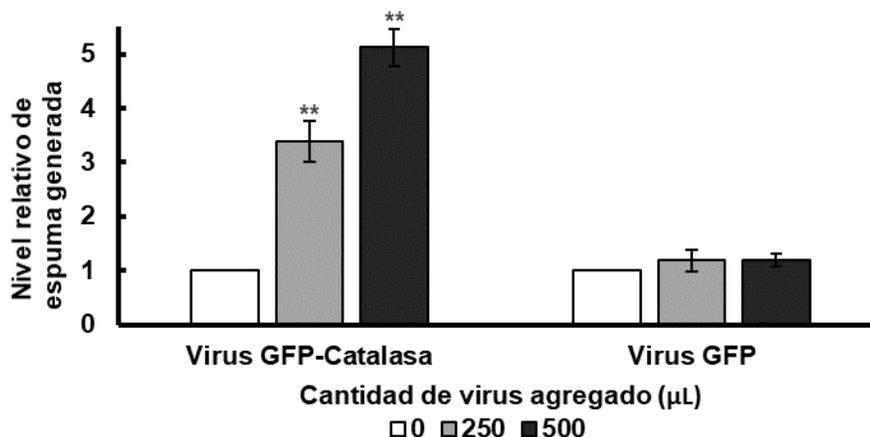
células fluorescentes, mientras que al aumentar la cantidad de virus a 500  $\mu\text{L}$  se obtuvo un porcentaje de células fluorescentes de 70 % para ambos vectores.



**Figura 25. Microfotografías de fluorescencia de células H4-II-E-C3 infectadas con Virus GFP-Catalasa y Virus GFP.** El porcentaje de fluorescencia se determinó mediante el análisis de la cantidad de células que emiten fluorescencia comparada con la cantidad de células presentes en un cuadrante. La barra blanca representa 100  $\mu\text{m}$ .

### 6.8.1 Análisis de la expresión de catalasa en células H4-II-E-C3 infectadas con los vectores adenovirales mediante método de la espuma.

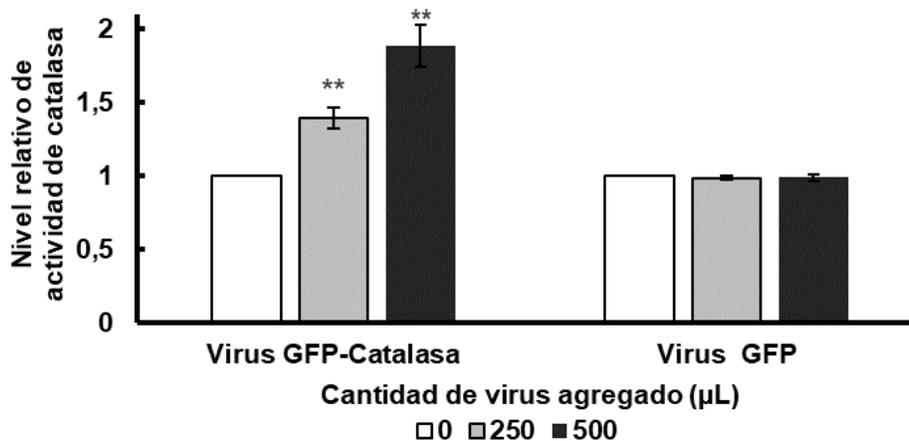
Para realizar este método, se utilizaron  $1 \times 10^6$  células H4-II-E-C3 previamente infectadas con diferentes cantidades de lisado celular conteniendo los adenovirus AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP. Cuarenta y ocho horas después de la infección las células se recolectaron y se usaron para medir la actividad de catalasa mediante el método de la espuma. Los resultados mostraron que a medida que aumentamos la cantidad de virus GFP-Catalasa, aumentó significativamente el nivel relativo de espuma generada en ambas cantidades de virus agregado a las células (250 y 500  $\mu\text{L}$ ), en cambio para el nivel relativo de espuma generada para el virus GFP no registró una diferencia significativa en comparación con el control sin infectar (Figura 26).



**Figura 26** Determinación del nivel relativo de espuma generada de acuerdo con la cantidad de lisado viral agregado sea AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP (μl). El porcentaje relativo se calculó en base a la actividad de células H4-II-C3 sin infectar, 250 μL virus GFP-Catalasa: 3,39; 500 μL virus GFP-Catalasa: 5,125; 250 μL virus GFP: 1,19; 500 μL virus GFP-Catalasa: 1,19 (n=4, \*\* = p<0,001 prueba t respecto a control sin infectar).

### 6.8.2. Análisis de la expresión de catalasa en células infectadas con los vectores adenovirales mediante método colorimétrico.

Para realizar este método, se usó una alícuota de las células infectadas con lisados virales de AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP suspendidas en PBS. Los ensayos se realizaron usando 100 μg de proteínas totales de acuerdo a lo indicado en la sección métodos 5.7. Los resultados del método colorimétrico mostraron un aumento significativo del nivel relativo de actividad de catalasa tanto para 250 y 500 μL de virus GFP-Catalasa, en cambio para el virus GFP no se generó una diferencia significativa en el nivel relativo de la actividad de catalasa en comparación con los lisados celulares H4-II-E-C3 que no se infectaron (Figura 27).



**Figura 27. Nivel relativo de actividad de catalasa en lisados celulares de células H4-II-C3 infectados con diferentes cantidades de lisado viral AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP (µL).** El porcentaje relativo se calculó en base a la actividad de células H4-II-C3 sin infectar, 250 µL virus GFP-Catalasa: 1,4; 500 µL virus GFP-Catalasa: 1,886; 250 µL virus GFP: 0,99; 500 µL virus GFP: 0,987 (n=4, \*\* = p<0,01 prueba t respecto a control sin infectar).

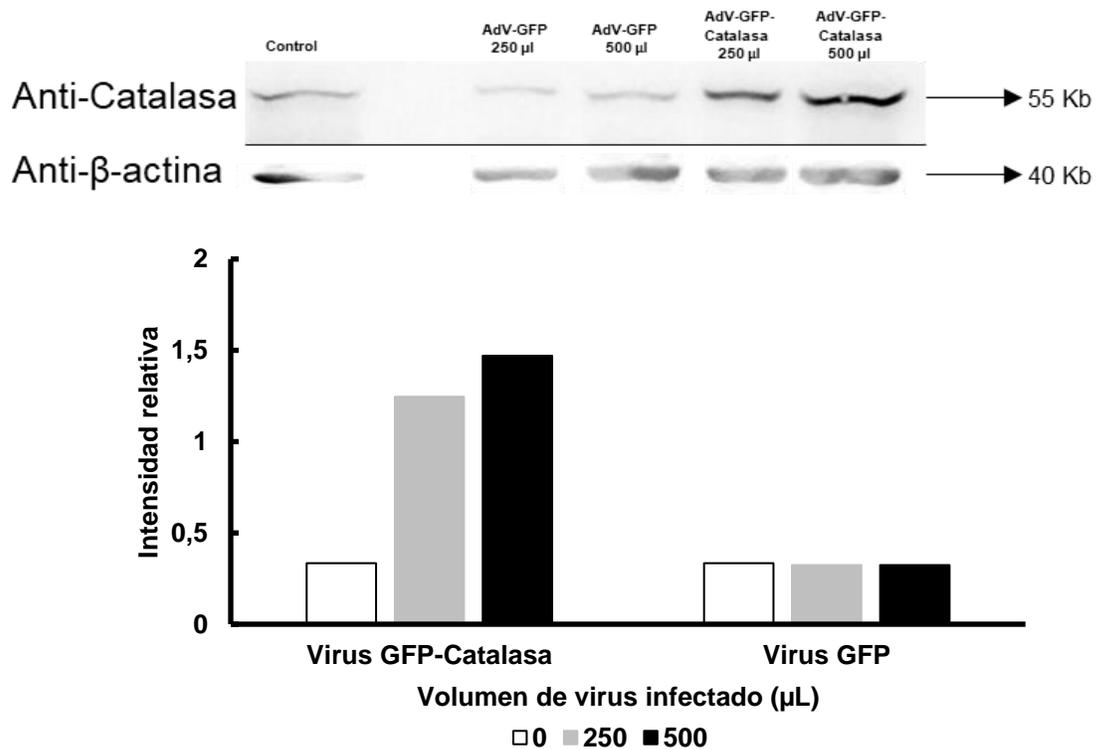
### 6.8.3. Western Blot de lisados de células H4-II-E-C3 infectadas con los vectores AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP.

Usando los mismos lisados con los que se determinó la actividad de catalasa mediante el método colorimétrico, se determinó los niveles de catalasa mediante Western Blot.

Los resultados entregados en la figura 28, se observó un mayor nivel de proteína catalasa en las células H4-II-E-C3 que se infectaron con el adenovirus GFP-Catalasa. También, se observó un mayor nivel de la enzima a medida que se aumentó la cantidad de virus GFP-Catalasa usado en la infección. En cambio, en las células que se trataron con el virus GFP no se observó diferencias en los niveles de catalasa en comparación al control sin infectar.

Además, se cuantificó la intensidad de las muestras obtenidas en Western Blot. Para ello se cuantificó el área bajo la curva de las señales obtenidas tanto para cuando se utilizó el anticuerpo anti-catalasa como anti-β-actina. La intensidad relativa de las señales se cuantificó dividiendo la intensidad obtenida en las muestras tratadas con anti-catalasa por la intensidad obtenida en las muestras tratadas con anti-β-actina (Métodos 5.14, ImageJ). Para 250 µL de AdV-GFP-Catalasa se obtuvo una intensidad relativa de 1,24. Para 500 µL

de AdV-GFP-Catalasa se obtuvo una intensidad relativa de 1,47. En cambio para 250 y 500  $\mu\text{L}$  de AdV-GFP se obtuvo 0,33 de intensidad relativa. Este valor fue similar a las muestras sin infectar que corresponde 0,35 de intensidad relativa (Figura 28).



**Figura 28. Análisis de Western Blot para la expresión de catalasa en lisados celulares H4-II-E-C3 infectados con diferentes cantidades de lisado viral AdV-GFP-Catalasa o AdV-GFP ( $\mu\text{L}$ ) y grafico de intensidad relativa de señales de Western Blot.** *En cada carril se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteínas. Para detectar la expresión de catalasa se utilizó un anticuerpo primario anti-catalasa (Santa Cruz Biotechnology, sc-34285), un secundario anti-goat IgG-HRP. El revelado de las bandas se realizó usando luminol. Posterior stripping de la membrana de nitrocelulosa, se utilizó el anticuerpo primario anti- $\beta$ -actina (Applied Biological Materials Inc No G043), un secundario anti-IgG-HRP. La intensidad relativa (catalasa/beta actina) de las señales fue cuantificada por el programa ImageJ, en el cual se obtuvo el área bajo la curva de cada señal presente en la membrana, luego se cuantificó el nivel relativo presente en cada muestra tratada con diferentes cantidades de virus.*

## 7. DISCUSIÓN.

Experimentos realizados en animales han mostrado que la administración de fenofibrato resulta en una disminución del consumo voluntario de alcohol, así como también en una disminución de los efectos placenteros del etanol, medidos a través de experimentos de preferencia de lugar condicionado, y un aumento de los síntomas de abstinencia a alcohol (Blednov y cols., 2015; 2016). Por otra parte, experimentos realizados en ratas bebedoras de alcohol de la línea UChB, han mostrado que la administración oral de fenofibrato resulta en un aumento de 3 veces la actividad hepática de la catalasa, un aumento de 10 veces en la acetaldemia lograda después de una dosis de etanol y una reducción de 90% en la ingesta voluntaria de alcohol por los animales (Karahanian y cols., 2014). Sin embargo, no está claro si los efectos observados sobre el consumo de alcohol por fenofibrato son resultado de un aumento de los niveles de acetaldehído periféricos y su consecuente efecto aversivo o a cambios a nivel del sistema nervioso central en los circuitos cerebrales relacionados con la adicción a drogas (Rivera-Meza y cols., 2017)

Estudios sobre los efectos del consumo crónico de etanol a nivel del sistema nervioso central muestran un aumento progresivo de la expresión de genes pro-inflamatorios como NF-KappaB e inducción de citoquinas pro-inflamatorias como TNFalfa, MCP-1 y IL-1B (Zou y cols., 2010). El alcohol y otras drogas de abuso actúan como sustancias pro-inflamatorias y frente a un consumo prolongado de ellas, la inflamación inducida se mantiene y junto con ello se ha observado que la sensibilidad del sistema nervioso central a los efectos de la droga se hace mayor. Datos experimentales han mostrado que la neuroinflamación inducida por el alcohol permanece activa durante períodos prolongados incluso después de la interrupción del consumo de alcohol, lo que sugiere un mecanismo de autoperpetuación de la neuroinflamación que se puede asociar al riesgo de recaída en pacientes abstinentes (Israel y cols., 2018). Se ha reportado además que los agonistas PPAR $\alpha$  como fenofibrato y ácido pirinixico a nivel del sistema nervioso central inhiben los cambios asociados a la neuroinflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS). La administración de estos agonistas PPAR $\alpha$  atenúan la activación posterior de macrófagos, el reclutamiento de leucocitos y la lesión neuronal (Wang y cols., 2011).

El objetivo original de este trabajo de tesis fue disociar entre los efectos periféricos y centrales asociados a la reducción del consumo de alcohol que resulta de la administración de fenofibrato a animales de experimentación. Una de las alternativas para estudiar los efectos centrales sería la administración intracerebral directa del fenofibrato. En este

sentido, hay varios reportes en la literatura en los cuales se han administrado directamente fármacos en el cerebro para estudiar sus efectos centrales. Por ejemplo, Panchal y cols., (2005) estudiaron los efectos de la administración intracerebral de 18-metoxicoronaridina en la atenuación de los signos de abstinencia a la morfina. En otros estudios se inyectó por vía intracerebral salsolinol, un producto de la condensación entre dopamina y acetaldehído con acciones reforzantes, observándose que salsolinol aumentó la preferencia de lugar condicionado por salsolinol y aumentó la actividad locomotora de los animales (Quintanilla y cols., 2014). La limitación principal de la administración directa de fenofibrato al cerebro es debida a su metabolización, ya que este fármaco requiere de ser transformado en el hígado a ácido fenofibrato, el cual es la molécula activa. Claramente en el cerebro los sistemas metabólicos presentan menor actividad en comparación al hígado.

La otra alternativa sería restringir la acción de fenofibrato solo al territorio periférico. Esto no es posible debido a la distribución del fármaco, el cual posee un volumen de distribución aproximado de 30 L (DrugBank, página web) Por ello que el fármaco tiene una buena distribución en el agua corporal, alcanzando la mayoría de los territorios corporales incluyendo el cerebro. Sin embargo, es posible replicar parcialmente los efectos de fenofibrato en la periferia, específicamente aumentando selectivamente los niveles de catalasa en el hígado mediante la administración endovenosa de vectores adenovirales codificantes para esta enzima. Cuando se administran vectores adenovirales por vía endovenosa, estos presentan un elevado tropismo hepático debido al tamaño de los poros en los vasos sanguíneos de este órgano que son del tamaño suficiente para que penetren los vectores adenovirales (aproximadamente 60 nm). En cambio, en otros tejidos, el tamaño de poro de los capilares sanguíneos es menor al tamaño de los vectores adenovirales, impidiendo su entrada. Pese a esto se ha determinado que en un grado mucho menor los vectores adenovirales pueden infectar otros tejidos como el bazo, pulmón y riñón (Rivera-Meza y cols., 2010).

Los principales resultados de esta tesis se relacionaron con la generación y caracterización de vectores adenovirales codificantes de catalasa. Mediante la recombinación homóloga de plásmidos en bacterias con alta actividad recombinasa se obtuvieron plásmidos adenovirales codificantes de catalasa que al ser transfectados en células empaquetadores HEK-293 permitió la generación exitosa de los adenovirus recombinantes. La funcionalidad de los adenovirus virus se confirmó en células HEK-293 y en células hepáticas de rata (H4-

II-E-C3), encontrándose que en ambas líneas celulares los vectores adenovirales aumentaron los niveles y actividad de catalasa de una forma dosis dependiente.

A continuación, se discutirán los principales resultados de este trabajo de tesis, en el cual se profundizará en los aspectos relacionados con la generación, amplificación, purificación de los vectores adenovirales generados y las pruebas realizadas en células de hepatoma de rata.

### **7.1. Análisis de funcionalidad de los plásmidos transportadores.**

Para comenzar esta investigación lo primero que se realizó fue comprobar la funcionalidad del ADNc de catalasa clonado en el plásmido pAd-Track-CMV. Para ello, se transfectaron células HEK-293 con los plásmidos pAdTrack-CMV-Catalasa y pAdTrack-CMV como control. En primer lugar, se analizó la expresión del reportero GFP presente en ambos plásmidos (Figura 7), la cual fue indicativa de la eficiencia de transfección. Los resultados mostraron que para una misma cantidad de plásmido transfectados, los cultivos tratados con el plásmido control pAdTrack-CMV siempre presentaron un mayor porcentaje de células fluorescentes que aquellos transfectados con el plásmido pAdTrack-CMV-catalasa. Estas diferencias pueden deberse a al tamaño de los plásmidos, debido a que pAdTrack-CMV-catalasa que contiene el ADNc de catalasa (10.973 pb) es más grande que pAdTrack-CMV (9.237 pb). En este sentido, en estudios relacionados con la eficiencia de transfección según tamaño del plásmido (Shau y cols., 2006), se demostró que a medida que aumentaban el tamaño del plásmido a transfectar disminuía la eficiencia de transfección. También podría afectar el nivel de expresión del reportero la presencia de dos casetes de expresión en pAdTrack-CMV-catalasa (uno para GFP y otro para catalasa, Figura 6), mientras que en pAdTrack-CMV solo es funcional el casete de expresión para GFP. La presencia de dos casetes de expresión funcionando simultáneamente podría resultar en una competencia por la maquinaria intracelular de transcripción incidiendo en una menor expresión proteica.

El análisis de la expresión de catalasa se realizó mediante los métodos de la espuma y método colorimétrico. El método de la espuma mostró que los cultivos transfectados con pAdTrack-CMV-catalasa generaban aproximadamente 20 veces más espuma que los cultivos transfectados con pAdTrack-CMV. En estudios complementarios se procedió a medir la actividad de catalasa mediante el método colorimétrico en donde se observó que

los cultivos transfectados con pAdTrack-CMV-catalasa presentaron 3,5 veces más actividad de catalasa que los cultivos transfectados con pAdTrack-CMV. Esta diferencia en la actividad relativa de catalasa de los cultivos transfectados con pAdTrack-CMV-catalasa versus los tratados con pAdTrack-CMV se pueden debe a diferencias entre ambas técnicas experimentales. En el método de la espuma se agregan directamente 100  $\mu$ L de una suspensión de células que contienen 4 o 5 veces más proteínas totales en comparación a los 100  $\mu$ g de proteínas usadas en el método colorimétrico. Además, las células HEK-293 no presentan actividad catalasa, por lo que la actividad basal del grupo control es fija e independiente de la carga de proteínas.

Estos resultados confirmaron la funcionalidad del ADNc de catalasa codificado en el transportador pAdTrack-CMV-catalasa. Luego, se procedió a la recombinación homóloga entre los plásmidos transportadores y el plásmido pAEasy-1, para generar los plásmidos adenovirales recombinantes, los que posteriormente fueron usados para generar las partículas virales.

## **7.2. Recombinación homóloga de los plásmidos transportadores con el plásmido adenoviral AdEasy-1.**

Para la generación de plásmidos adenovirales se han utilizado principalmente dos métodos. El primero de estos métodos implica la clonación directa del gen de interés en el genoma adenoviral. Sin embargo, y debido a que el genoma del adenovirus es muy grande (36 kB) y contiene pocos sitios de restricción útiles, este método presenta muchas dificultades técnicas para poder llevarlo a cabo. El segundo método, el cual se utilizó en esta tesis, implicó clonar el gen de interés en un plásmido transportador y luego transferirlo al genoma adenoviral mediante recombinación homóloga en bacterias con alta capacidad recombinasa (Vogelstein y cols., 1998). La recombinación homóloga es un tipo de recombinación en la que las secuencias de nucleótidos flanqueadas por secuencias homólogas entre dos construcciones distintas, son intercambiadas entre ellas. En el caso de las células *E. coli* AD-BJ5183 utilizadas en este estudio, este proceso es mediado por la proteína recombinasa bacteriana recBC.

Para obtener los plásmidos adenovirales, se transformaron células *E. coli* AD-BJ5183, con los transportadores pAdTrack-CMV-catalasa o pAdTrack-CMV previamente digeridos con *Pme* I. Estas transformaciones se ajustaron a un volumen de 1 mL y se sembraron en placas

de LB/agar/Km en volúmenes de 100, 300 y 600  $\mu\text{L}$ . De acuerdo a las instrucciones del fabricante de las células *E. coli* AD-BJ5183 debía esperarse que la cantidad de clones obtenidos en la placa sembrada con 600  $\mu\text{L}$  fuera 3 y 6 veces mayor en relación a las placas sembradas con 300 y 100  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Sin embargo, en el caso de la recombinación con pAdTrack-CMV-catalasa solo se encontró una colonia en la placa sembrada con 600  $\mu\text{L}$  de transformación, no encontrándose colonias cuando se sembraron 100 y 300  $\mu\text{L}$ . Según el fabricante, se podían obtener bajos rendimientos de clones recombinantes cuando ocurría una mala digestión y/o purificación del plásmido transportador, como también un exceso de plásmido. En cambio, al usar pAdV-GFP se obtuvo la proporción indicada por el fabricante, ya que en la placa que se sembraron 100 $\mu\text{L}$  de transformación se obtuvieron 6 colonias, para 300  $\mu\text{L}$  se obtuvieron 18 colonias y finalmente para 600  $\mu\text{L}$  se obtuvieron 36 colonias. Esto quiere decir que a medida que aumentamos la cantidad de bacterias recombinantes, aumentó el número de colonias en 3 y 6 veces respectivamente.

Para confirmar la identidad de los plásmidos recombinantes, el fabricante recomendaba su digestión con *Pac* I, generándose una banda de 3 o 4,5 kb en caso de obtener plásmidos recombinantes correctos (Ver métodos 5.9.1). La digestión con *Pac* I de los plásmidos recombinantes obtenidos resultó en la generación de una banda de 3 kb para pAdV-GFP y una banda de 4,5 kb para pAdV-GFP-Catalasa (Ver resultados 6.3). Estas diferencias de estructura no generan ningún cambio en cuanto a la capacidad de los plásmidos recombinantes para generar vectores adenovirales funcionales.

### **7.3. Generación, amplificación y purificación de los vectores adenovirales.**

Para la generación de vectores adenovirales se utilizaron células empaquetadoras de virus HEK-293. Esta línea celular se obtuvo a partir de células embrionarias de riñón humano y que se inmortalizaron mediante la incorporación a su genoma del ADN del adenovirus tipo 5 (Graham y cols., 1977). Las células HEK-293 actúan como células empaquetadoras de adenovirus ya que aportan las proteínas generadas por el gen E1 adenoviral, el cual está ausente en los plásmidos adenovirales derivados de pAdEasy-1 (Murakami y cols., 2002). El gen E1 codifica proteínas necesarias para la replicación del virus. La razón de este aporte en trans de las proteínas E1 por parte de las células HEK-293 es para evitar la creación de adenovirus de tipo salvaje (competente) (Zhu y cols., 2004), los cuales son patógenos

humanos y pueden causar infecciones oculares, respiratorias e intestinales. Sin embargo, existe una baja posibilidad de que se generen adenovirus competentes durante su generación y amplificación en células HEK-293, siendo este riesgo mayor a medida que avanzan las rondas de amplificación. Debido a estos problemas de seguridad (Kovesdi y cols., 2010), en 2001 la FDA estableció que la preparación de productos terapéuticos que contengan adenovirus deben contener menos de 1 RCA (adenovirus competente para la replicación) por cada  $3 \times 10^{10}$  partículas virales (Lusky, 2005).

La primera etapa en la generación de los vectores adenovirales fue la transfección de las células HEK-293 con los plásmidos recombinantes purificados. Una señal de que la generación de los vectores adenovirales fue exitosa es la presencia del “efecto citopático” en las células transfectadas. Este efecto se caracteriza por alteraciones del crecimiento normal de las células con evidentes manifestaciones morfológicas, donde las células pierden su aspecto estrellado y comienzan a adquirir una morfología más redonda y menor adherencia a la placa de cultivo (Albrecht y cols., 1996). El efecto citopático se debería a cambios bioquímicos y moleculares en la célula causados por la replicación viral, en donde toda la maquinaria celular se enfoca en la producción de los vectores adenovirales, generando un desbalance en las condiciones metabólicas que conllevan a la detención del crecimiento celular y disminución de proteínas de adhesión .

Al analizar los resultados obtenidos en la generación de los vectores adenovirales, en el caso de las células transfectadas con pAdV-GFP el efecto citopático en más de un 50% de las células apareció alrededor de los 13 días desde la transfección, mientras que para las células transfectadas con pAdV-GFP-Catalasa este proceso tomó aproximadamente 15 días. Esta diferencia en la velocidad de generación del efecto citopático entre ambos adenovirus se replicó en los subsiguientes procesos de amplificación viral. Esto se puede deber a la diferencia en la estructura de los casetes de expresión entre AdV-GFP-Catalasa y AdV-GFP, que en el caso del adenovirus AdV-GFP-catalasa implica la expresión de la catalasa bajo un promotor fuerte como el CMV, lo que implicaría una mayor carga biosintética para la célula y que podría explicar el mayor de días necesarios para evidenciar el efecto citopático.

La purificación final de los adenovirus se realizó mediante una amplificación en gran escala, seguida de una ultracentrifugación en doble gradiente de cloruro de cesio. Sin embargo, los títulos adenovirales obtenidos ( $4,8 \times 10^{10}$  pv/mL) fueron 20 veces a los menores a los títulos óptimos ( $1 \times 10^{12}$  pv/mL) para su utilización en experimentos *in vivo* (Jogler y cols., 2006).

Este bajo rendimiento de los títulos adenovirales finales pudo deberse a fallas en los procesos intermedios de amplificación, que aunque no fueron confirmadas, si se registraron en algunas etapas retrasos en la aparición del efecto citopático. Para solucionar este inconveniente, es importante optimizar los procesos de generación y amplificación de los vectores virales, especialmente en el proceso inicial de transfección de las células HEK-293 con los plásmidos adenovirales recombinantes. También deben considerarse algunos puntos adicionales como optimizar los tiempos de infección para obtener un máximo rendimiento en cada etapa de amplificación viral.

#### **7.4. Actividad de vectores adenovirales en células HEK-293.**

Para confirmar la funcionalidad de los vectores adenovirales se realizaron pruebas *in vitro* de infección de células HEK-293 y determinación de la actividad catalasa mediante el método de la espuma y colorimétrico. También se midieron los niveles de catalasa mediante western blot.

Los resultados de estos experimentos confirmaron la funcionalidad de los vectores adenovirales. El método de la espuma mostró la existencia de una correlación lineal entre la cantidad de virus AdV-GFP-catalasa y la actividad catalasa ( $r= 0,9945$ , Figura R15), mientras que las células infectadas con AdV-GFP no generaron espuma al igual que el control sin infectar. El método colorimétrico mostró que la infección de células HEK-293 con AdV-GFP-catalasa resultó en un aumento de 8,4 veces en la actividad catalasa comparado con células infectadas con AdV-GFP. Sin embargo, en este último experimento se observó un leve e inesperado aumento de la actividad catalasa en las células control infectadas con AdV-GFP frente al control sin infectar, la cual podría deberse a la variabilidad del método que ha reportado presentar un coeficiente de variación de 4% (Hadwan, 2016). Esta explicación se sustentó por los resultados del análisis de western blot que mostró que sólo las células infectadas con AdV-GFP-Catalasa presentaban niveles de detectables de catalasa, la cual estaba completamente ausente en las células infectadas con el virus control AdV-GFP.

Un factor importante que debe ser considerado en la interpretación de los resultados de experimentos de infección adenoviral en células HEK-293, es la capacidad de esta línea celular de amplificar los vectores adenovirales. Esto puede generar alteraciones de las relaciones dosis-efecto si uno de los vectores presenta una tasa de replicación más rápida.

Es posible también que la toxicidad asociada a la amplificación adenoviral altere las respuestas celulares esperadas.

### **7.5. Funcionalidad de vectores adenovirales en células H4-II-E-C3.**

Para analizar la funcionalidad de los vectores adenovirales se utilizó la línea células H4-II-E-C3. Esta línea celular proviene de células de hepatocarcinoma de rata (*Rattus norvegicus*) y presenta morfología epitelial. Debido a su origen hepático, estas células expresan la mayoría de las enzimas presentes en este tejido (Martínez, 2002).

A diferencia de las células HEK-293, las células H4-II-E-C3 no tienen la capacidad de replicar los vectores adenovirales. Dado el origen hepático de las células H4-II-E-C3, éstas constituyen un modelo *in vitro* muy cercano al hígado que es el órgano blanco de los experimentos *in vivo* que se planean realizar con estos vectores adenovirales. Es importante considerar que las células H4-II-E-C3 también expresan de forma constitutiva la enzima catalasa, por lo que los niveles de expresión de la enzima observados en los experimentos con esta línea celular son una sumatoria de la expresión genómica y de la expresión exógena mediada por los vectores adenovirales.

Los experimentos de infección de las células H4-II-E-C3 con el vector AdV-GFP-Catalasa resultaron en un aumento significativo de la actividad catalasa en comparación a las células infectadas con el vector control AdV-GFP. La actividad catalasa generada por el virus control no fue significativamente distinta de los cultivos sin infectar. Estos resultados se confirmaron tanto por el método de la espuma como por el método colorimétrico. Los análisis de western blot mostraron que en los cultivos de células H4-II-E-C3 infectados con AdV-GFP-catalasa se verificó un aumento de los niveles de catalasa en comparación a las células infectadas con AdV-GFP. Además, los cultivos tratados con el virus control AdV-GFP no mostraron variaciones en los niveles de catalasa respecto de las células sin infectar.

Estos resultados confirman que el virus AdV-GFP-Catalasa generado en esta tesis posee la capacidad de expresar la enzima catalasa en células de origen hepático, lo que valida el uso de estos vectores en las pruebas *in vivo* propuestas para determinar los efectos en ratas de la sobreexpresión de catalasa en el hígado en el consumo de etanol. Adicionalmente, se encontró que el vector AdV-GFP no genera cambios en los niveles de catalasa, confirmando su aptitud para ser utilizado como vector control en futuros experimentos en animales.

## 8. CONCLUSIONES

El alcoholismo es uno de los grandes problemas en la sociedad actual, pese a ello aún no existen tratamientos farmacológicos efectivos para el tratamiento de esta enfermedad. En esta memoria de título se propuso disociar los efectos periféricos y centrales asociados al mecanismo de acción del fenofibrato, fármaco que ha demostrado conseguir reducir el consumo de alcohol en animales. Para imitar los efectos periféricos del fenofibrato se generaron vectores adenovirales codificantes para catalasa y un vector control codificante solamente para el reportero GFP. Pruebas *in vitro* en células de hepatoma de rata (H4-II-E-C3) mostraron que el vector AdV-GFP-Catalasa es funcional, ya que aumento la actividad y los niveles de expresión de catalasa. En cambio, el vector AdV-GFP no genero ningún cambio significativo en comparación con las células sin infectar, validando su uso como control. En base a estos resultados prometedores *in vitro* se espera en próximos experimentos obtener títulos virales elevados para realizar experimentos *in vivo* en ratas bebedoras de alcohol (UChB) y determinar el efecto de la sobre-expresión hepática de catalasa en el consumo de alcohol.

## 9. REFERENCIAS

- Albrecht T**, Fons M, Boldogh I (1996). Effects on Cells. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, Chapter 44.
- Aragon CM**, Spivak K, Amit Z (1989). Effects of 3-Amino-1,2,4-triazole on Ethanol-induced Open-Field Activity: Evidence for Brain Catalase Mediation of Ethanol's Effects. Alcohol Clin Exp Res 13: 104-108.
- Arnaiz S**, Travacio M, Llesuy S, Boveris A (1995). Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrato. Biochim Biophys Acta 1272: 175-180.
- Berger J**, Moller DE (2002). The mechanisms of action of PPARs. Annual Review of Medicine 53: 409-435.
- Blednov Y**, Benavidez J.M, Black M, Ferguson, L. B, Schoenhard G. L, Goate A. M, Harris, R (2015). A peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are linked with alcohol consumption in mice and withdrawal and dependence in humans. Alcoholism Clinical and Experimental Research 39: 136–145.
- Blednov Y**, Black M, Benavidez J.M, Stamatakis E, Harris R (2016). PPAR agonists: II. Fenofibrate and tesaglitazar alter behaviors related to voluntary alcohol consumption. Alcoholism Clinical and Experimental Research 40: 563–571.
- Braissant O**, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology 137: 354–366.
- Castillo-Carniglia A**, Kaufman J, Pino P (2013). Alcohol-attributable mortality and years of potential life lost in Chile. Alcohol and Alcoholism 48: 729–736.
- Cignarella A**, Bellosta S, Corsini A, Bolego C (2006). Hypolipidemic therapy for the metabolic syndrome. Pharmacological Research 53: 492-500.
- Clouet P**, Henninger C, Niot I, Boichot J, Bezard J (1990). Short term treatment by fenofibrate enhances oxidative activities towards long-chain fatty acids in the liver of lean Zucker rats. Biochemical Pharmacology 40: 2137-2143.
- Drugbank.ca**. (2018). Fenofibrate - DrugBank. [online] disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01039> [Revisado 15 Dec. 2018].
- Eriksson CJ** (1977). Acetaldehyde metabolism in vivo during ethanol oxidation. Advances in Experimental Medicine and Biology 85A:319-341.
- Graham F**, Smiley J, Russell W, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5J. Journal of General Virology 36:59-72.

**Handler JA**, Thurman RG (1988). Hepatic ethanol metabolism is mediated predominantly by catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the fasted state. *FEBS Letters* 238:139-141.

**Israel Y**, Herrera-Marschitz M, Ezquer M, Lespay-rebolledo C, Santapau Daniela, Quintanilla ME, Morales P, Ezquer F (2018). Intravenous administration of anti-inflammatory mesenchymal stem cell spheroids reduces chronic alcohol intake and abolishes binge-drinking. *Scientific Reports*: 4325 (2018)

**Iwase T**, Tajima A, Sugimoto S, Okuda K, Hironaka I, Kamata Y, Mizunoe Y (2013). A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Scientific Reports* 3:3081.

**Karahanian E**, Quintanilla ME, Fernadez K, Israel Y (2014). Fenofibrate A lipid-lowering drug reduce voluntary alcohol drinking in rats. *Alcohol* 48:665-670.

**Lucero A** (2016). Producción y purificación de vectores adenovirales y adenoasociados para terapia génica contra el alcoholismo

**Lusky M** (2005). Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Human Gene Therapy* 16:281–291.

**Mahmoud H** (2016). New method for assessment of serum catalase activity. *Indian Journal of Science and Technology* 9:1-5.

**Martínez SE** (2002). Distribución de las alcohol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en tejidos de rata. Tesis (Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular). Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias,. 185 p.

**Ministerio de Salud – MINSAL** (2010). Encuesta Nacional de Salud ENS Chile 2009–2010. Ministerio de Salud, Chile.

**Mittereder N**, March KL, Trapnell BC (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *Journal of virology* 70:7498-509.

**Mizoi Y**, Ijiri I, Tatsuno Y, Kijima T, Fujiwara S, Adachi J, Hishida S (1979). Relationship between facial flushing and blood acetaldehyde levels after alcohol intake. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 10:303-311.

**Murakami P**, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman MA (2002). Single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. *Human Gene Therapy* 13:909-920.

**Organización Mundial de la Salud – OMS** (2014). Informe Mundial de Situación sobre Alcohol y Salud, WHO Library Cataloguing in Publication Data.

**Organización Panamericana de la Salud – OPS** (2015). Situación regional del consumo de alcohol y la salud en las Américas. Washington, D.C.

**Panchal V**, Taraschenko O & M Maisonneuve I, D Glick S (2005). Attenuation of morphine withdrawal signs by intracerebral administration of 18-methoxycoronaridine. *European journal of pharmacology* 525:98-104.

**Quertemont E**, Escarabajal M, Witte P (2003). Role of catalase in ethanol-induced conditioned taste aversion: a study with 3-amino-1,2,4-triazole. *Drug and Alcohol Dependence* 70:77-83.

**Quintanilla ME**, Israel Y, Sapag A, Tampier L (2006). The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addiction Biology* 11: 310–323.

**Quintanilla ME**, Rivera-Meza M, Berrios-Carcamo P, Bustamante D, Buscaglia M, Morales P, Karahanian E, Herrera-Marschitz M, Israel Y (2014). Salsolinol, free of isosalsolinol, exerts ethanol-like motivational/sensitization effects leading to increases in ethanol intake. *Alcohol* 48:551-559.

**Rivera-Meza M**, Muñoz D, Jerez E, Quintanilla ME, Salinas-Luypaert C, Fernandez K, Karahanian E (2017). Fenofibrate administration reduces alcohol and saccharin intake in rats: possible effects at peripheral and central levels. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11:133.

**Rivera-Meza M** (2009), Protección contra el alcoholismo por el polimorfismo ARG47HIS de la deshidrogenasa alcohólica: Desarrollo de un modelo animal. (Tesis Doctoral, Universidad de Chile, Santiago, Chile).

**Rivera-Meza M**, Quintanilla ME, Tampier L, Mura CV, Sapag A, Israel Y (2010). Mechanism of protection against alcoholism by an alcohol dehydrogenase polymorphism: development of an animal model. *FASEB Journal* 24:266-74.

**Rodd ZA**, Bell RL, Zhang Y, Murphy JM, Goldstein A, Zaffaroni A, Li TK, McBride WJ (2005). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* 30:330-338.

**Schoonjans K**, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre A. M, Heyman R. A, Briggs M, Deeb S, Auwerx J (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *The EMBO Journal* 15:5336–5348.

**Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA)**-Ministerio de Salud (2016). El consumo de Alcohol en Chile: Situación epidemiológica, Chile.

**Shau M**, Tseng S, Yang T, Cherng J, Chin W (2006). Effect of molecular weight on the transfection efficiency of novel polyurethane as a biodegradable gene vector. *Journal of Biomedical Materials Research* 77A:736-746.

**Singh S**, Fritze G, Fang BL, Harada S, Paik YK, Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW (1989). Inheritance of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: genotyping in Chinese, Japanese and South Korean families reveals dominance of the mutant allele. *Human Genetics* 83:119-121.

**Tampier L**, Mardones J (1979). Catalase mediated oxidation of ethanol by rat brain homogenates. *IRCS Medical Science* 7:389.

**Virgolini MB**, Mattalloni MS, Giovanni LN, Molina JC, Cancela LM (2013). Participation of catalase in voluntary ethanol consumption in perinatally low-level lead-exposed rats. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 37:1632-1642.

**Vogelstein B**, He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu, J, Kinzler KW (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2509-251.

**Wang G**, Namura S (2011). Effects of chronic systemic treatment with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activators on neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide in adult mice. *Neuroscience Research* 70:230-237.

**Zhu J**, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, Greenberg R, Schaefer E, Indelicato SR (2004). Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Human Gene Therapy* 10:113-121.

**Zimatkin SM**, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez F.J, Deitrich RA (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 30:1500-1505.

**Zou J**, Crews F (2010). Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF- $\kappa$ B and proinflammatory cytokines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 34:777-789.

## 10. ANEXO

Durante el desarrollo de esta tesis, también participé en estudios relacionados con el efecto de ALDA-1, un activador de la ALDH2, en el consumo voluntario de etanol en ratas UChB. Específicamente estuve a cargo del registro del consumo de etanol y agua por los animales, de la preparación de la droga para su administración intraperitoneal, el análisis de los datos obtenidos incluyendo la confección de gráficos y análisis estadístico.

Se incluye en este anexo la portada del artículo en el que se publicaron los resultados de estos experimentos y en el que participé como autor.

“Activation of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 Reduces both the Acquisition and Maintenance of Ethanol Intake in Rats: A Dual Mechanism?”  
Neuropharmacology. 2018 Dec 4;146:175-183. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.001.



## Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and maintenance of ethanol intake in rats: A dual mechanism?



Mario Rivera-Meza<sup>a,\*</sup>, David Vásquez<sup>a</sup>, María Elena Quintanilla<sup>b</sup>, Diego Lagos<sup>a</sup>, Braulio Rojas<sup>a</sup>, Mario Herrera-Marschitz<sup>b</sup>, Yedy Israel<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacological and Toxicological Chemistry, Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, University of Chile, Santiago, Chile

<sup>b</sup> Program of Molecular and Clinical Pharmacology, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile

### HIGHLIGHTS

- ALDA-1 increased by 3-fold the brain ALDH2 activity in rats.
- ALDA-1 blocked the acquisition of ethanol intake.
- ALDA-1 reduced by 61–82% chronic ethanol intake.
- ALDA-1 did not modify voluntary saccharin consumption.
- ALDA-1 did not change the rate of ethanol elimination.

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Ethanol  
Acetaldehyde  
ALDH2  
ALDA-1  
UChB rats

### ABSTRACT

A number of pre-clinical studies have shown that brain-generated acetaldehyde, the first metabolite of ethanol, exerts reinforcing effects that promote the acquisition of ethanol intake, while chronic intake maintenance appears to be mediated by alcohol-induced brain neuroinflammation/oxidative stress. Recently, it was described that *N*-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2,6-dichlorobenzamide (ALDA-1) activates aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2), enzyme that catalyzes the oxidation of ethanol-derived acetaldehyde to acetate. The aim of this study was to determine the effects of ALDA-1 on both the acquisition and the maintenance of alcohol intake in alcohol-preferring UChB rats. For ethanol acquisition studies, naïve UChB rats were treated with five daily doses of ALDA-1 (12.5, 25 or 50 mg/kg, i.p.) from one day before the start of ethanol exposure. For chronic intake studies, UChB rats exposed for 98 days to a free access to 10% ethanol and water were treated daily with ALDA-1 (12.5, 25 or 50 mg/kg, i.p.) for five days. The administration of ALDA-1 reduced by 72–90% ( $p < 0.001$ ) the acquisition of ethanol consumption in naïve rats. At chronic ethanol consumption, ALDA-1 reduced ethanol intake by 61–82% ( $p < 0.001$ ). ALDA-1 administration increased by 3- and 2.3-fold the activity of ALDH2 in brain and liver, respectively. ALDA-1 did not affect saccharin consumption, nor it modified the rate of ethanol elimination. The study shows that the activation of ALDH2 by ALDA-1 is effective for inhibiting both the acquisition and the maintenance of chronic ethanol intake by alcohol-preferring rats. Thus, the activation of brain ALDH2 may constitute a novel approach in the treatment of alcohol use disorders.

### 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) estimates that there are 3.3 million deaths in the world annually (5.9% of global death) attributable to alcohol consumption (WHO, 2014). The primary aims of alcohol use

disorders (AUD) treatment have been to support the patient to achieve abstinence or, aiming at harm reduction, to reduce the frequency and quantity of alcohol intake. The current pharmacological treatment of AUD is based on the use of three drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA): disulfiram, acamprosate and naltrexone.

\* Corresponding author. Laboratory of Experimental Pharmacology, Department of Pharmacological and Toxicological Chemistry, University of Chile, Santos Dumont 964, Independencia, 8380494, Santiago, RM, Chile.

E-mail address: [mario.rivera@ciq.uchile.cl](mailto:mario.rivera@ciq.uchile.cl) (M. Rivera-Meza).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.001>

Received 11 June 2018; Received in revised form 28 November 2018; Accepted 2 December 2018

Available online 04 December 2018

0028-3908/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.