



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

**TRANSMISIÓN OPIACEA Y ALCOHOLISMO: SILENCIAMIENTO DE LA
EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR MU-OPIOIDE MEDIANTE
RNA DE INTERFERENCIA**

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

ANÍBAL IGNACIO ARAYA MARTÍNEZ

Santiago de Chile

2017

FINANCIAMIENTO

Este proyecto de investigación se pudo llevar a cabo gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 11130241.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Estos resultados fueron presentados en el XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Noviembre 26-29, 2016, Castro, Chile.

Para mis seres queridos, por su inmenso apoyo...

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres, Elizabeth y Rafael, por su inmenso apoyo y comprensión, ante todo, y por darme la oportunidad de seguir mis sueños y permitirme realizar y continuar con mi carrera.

Por supuesto que quisiera agradecer a mis compañeros de la universidad, en particular a mi amiga Naty, con quien pasamos juntos durante todo este periodo, a pesar de los altos y bajos, siempre estuvimos ahí, y sin duda ha sido una de las personas más importantes de mi vida, quien siempre me ha apoyado y ayudado a seguir adelante.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio, con quienes pude pasar un año maravillosos de aprender y a la vez entretenerme. En especial quisiera agradecer a la Cata, quien me enseñó tantas cosas, tantas técnicas de laboratorio y por su puesto *lifehacks*: agradezco haberla conocido, y si duda fue un placer coincidir en la vida.

También quisiera agradecer al profesor Mario quien me dio la oportunidad de hacer esta memoria y gracias a esto pude aprender tantas técnicas de laboratorio que, en definitiva, fue una de las razones que me ayudaron a decidir seguir este camino, que me llena y apasiona. De igual forma me gustaría agradecer a la profesora Quintanilla, quien también me permitió realizar esta memoria y a seguir mi camino y posteriormente mi formación profesional. También quisiera agradecer al profesor Guillermo, por su ayuda y comprensión durante este periodo.

Finalmente quisiera agradecer a todos mis seres queridos, a todos los que no menciono, pero sin duda les agradezco por su apoyo, comprensión y permitirme ser como soy.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Summary	vii
1. Introducción	
1.1. Alcoholismo y su impacto en la sociedad.....	1
1.2. La recaída como el principal problema del alcoholismo	3
1.3. Vía cerebral de la recompensa y efectos adictivos del alcohol.....	4
1.4. Características del receptor μ -opioide.....	6
1.5. Receptores opioides, alcoholismo y recaída en el consumo de alcohol	7
1.6. RNA de interferencia (siRNA) como herramienta farmacológica.....	9
2. Hipótesis	12
3. Objetivo general	12
3.1. Objetivos específicos.....	12
4. Materiales	13
5. Métodos	
5.1. Transformación de bacterias	15
5.2. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina	15
5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	16
5.4. Clonación del receptor μ -opioide de rata en el plásmido pHIV-GFP	17
5.4.1. Digestión de los plásmidos	17
5.4.2. Reacción de ligación.....	18
5.4.3. Análisis rápido de colonias.....	20
5.4.4. Confirmación de la estructura de pHIV-OPMRr-GFP	20
5.4.5. Generación de archivo de respaldo de pHIV-OPMRr-GFP	21
5.5. Cultivo de células HEK-293T	21
5.6. Transfección de células HEK-293T con ADN plasmidial.....	22
5.7. Obtención de los lisados celulares.....	23
5.8. Cuantificación de proteínas	23
5.9. Análisis de Western blot	24

5.10.	Generación de vectores lentivirales	26
5.11.	Generación de líneas celulares codificantes de los shRNAs.....	28
6.	Resultados	
6.1.	Clonación del cDNA del receptor μ -opioide en el vector pHIV-GFP.....	30
6.2.	Análisis de la expresión de OPMRr en células HEK-293T	42
6.3.	Silenciamiento de la expresión <i>in vitro</i> de OPMRr por shRNAs anti-OPMRr.....	45
6.4.	Generación de líneas celulares con expresión estable de los shRNAs	52
7.	Discusión	
7.1.	Generación del plásmido que expresa el receptor μ -opioide de rata en eucariontes	56
7.2.	Expresión del gen del receptor μ -opioide de rata en células HEK-293T.....	57
7.3.	Determinación de la inhibición de OPMRr mediante shRNAs	59
7.4.	Proyecciones: Generación de vectores lentivirales y de las líneas celulares que expresen establemente los shRNAs	63
8.	Conclusiones.....	65
9.	Referencias.....	66

Índice de Figuras

Figura 1. Promedio de litros de alcohol puro consumido en el año 2010 en distintas zonas del mundo.....	2
Figura 2. Distribución y ubicación de la vía de la recompensa en el cerebro	4
Figura 3. Mecanismo regulatorio de las interneuronas GABAérgicas en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesocorticolímbico.....	5
Figura 4. Esquema del receptor μ -opioide y su mecanismo de activación	7
Figura 5. Mecanismo de formación y acción de los siRNA.....	11
Figura 6. Esquema gráfico del vector lentiviral pHIV-GFP	30
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP purificados mediante lisis alcalina	31
Figura 8. Esquema de clonación para obtener pHIV-OPMRr-GFP.....	32
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP digeridos con las enzimas HpaI y XbaI.....	33
Figura 10. Análisis rápido de colonias de bacterias transformadas con la ligación para obtener pHIV-OPMRr-GFP	35
Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa de los plásmidos de los candidatos 9, 30, 34 y 37 purificados mediante lisis alcalina	36
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los candidatos 9 y 37 versus pHIV-GFP digeridos con la enzima AgeI	37
Figura 13. Esquema teórico del patrón de restricción al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con las enzimas AgeI y NheI	38
Figura 14. Electroforesis en geles de agarosa de la digestión de los plásmidos candidato 9 y pHIV-GFP con las enzimas AgeI y NheI.....	39
Figura 15. Esquema teórico del patrón de restricción al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con las enzimas AgeI, NheI y EcoRV	40
Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa de la digestión de los plásmidos candidato 9 y pHIV-GFP con las enzimas AgeI, NheI y EcoRV	41
Figura 17. Microfotografías de fluorescencia de células transfectadas con cantidades crecientes de pHIV-GFP y pHIV-OPMRR-GFP	43
Figura 18. Análisis de Western blot de lisado de células HEK-293T transfectadas con pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP.....	45
Figura 19. Esquema gráfico del vector lentiviral pGFP-C-shLenti	46

Figura 20. Microfografías de fluorescencia de células HEK-293T co-transfectadas con los pshRNAs y pHIV-OPMRr-GFP.....	48
Figura 21. Análisis de Western blot de lisado de células HEK-293T co-transfectadas con cuatro relaciones de pshRNAs:pHIV-OPMRr-GFP	50
Figura 22. Porcentajes de inhibición de la expresión de OPMRr inducida por los shRNAs	51
Figura 23. Esquema teórico de la selección de células HEK-293T que expresan establemente shRNA	53
Figura 24. Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293T que expresan establemente los distintos shRNAs	55
Figura 25. Predicción planar (2D) <i>in silico</i> del plegamiento del RNA mensajero de OPMRr y sitios de reconocimiento de las 4 secuencias de shRNA	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de los 5 shRNAs y su sitio de reconocimiento en pHIV-OPMRr-GFP	47
Tabla 2. Cuantificación de los vectores lentivirales	54

Abreviaturas

AVISA	Años de Vida Saludable
°C	grados Celsius
CRH	corticotropin release hormone
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GFP	proteína reportera fluorescente verde
<i>LB</i>	<i>medio de cultivo Luria Bertani</i>
Min	minutos
μ -opioide	mu-opioide
NAc	Núcleo accumbens
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPMR(r)	receptor μ -opioide (de rata)
pHIV-GFP	plásmido del vector lentiviral HIV que expresa GFP
pHIV-OPMRr-GFP	plásmido que permite la expresión del gen del OPMRr en células en cultivo
PFC	Corteza Pre-Frontal
pshRNA	plásmido de expresión de las shRNA
pTransporte-OPMRr	plásmido de transporte del gen OPMRr
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
shRNA	horquillas pequeñas de RNA
TAE	Tampón de Tris, Acetato y EDTA
VTA	Área Tegmental Ventral
WB	Western Blot

RESUMEN

El alcoholismo es un problema mundial de salud pública, por lo que es importante comprender sus bases neuro-farmacológicas para identificar nuevos blancos terapéuticos. Uno de los problemas del alcoholismo es la recaída, que corresponde a la pérdida de control sobre el consumo de alcohol cuando el paciente vuelve a beber después de un período de abstinencia. Estudios en modelos animales de alcoholismo han asociado un mayor valor placentero del alcohol al momento de la recaída. Este incremento del valor hedonístico del alcohol podría estar asociado a un mayor nivel del receptor (μ) μ -opioide (OPMR) en el circuito cerebral de recompensa. Para determinar el rol del OPMR en la recaída al consumo de alcohol, en este trabajo se presentan estudios destinados a evaluar la capacidad inhibitoria de distintas secuencias de RNAs de interferencia tipo horquilla (shRNAs) dirigidas a disminuir la expresión de OPMR *in vitro*, para ser utilizadas posteriormente en futuros estudios en modelos *in vivo*.

Para ello se clonó el gen del receptor μ -opioide de rata (OPMRr) en el plásmido de expresión pHIV-GFP, generando pHIV-OPMRr-GFP. Se transfectaron células HEK-293T, que naturalmente no expresan OPMRr, con pHIV-OPMRr-GFP y se verificó la expresión de OPMRr mediante Western blot. Para lograr el silenciamiento de la expresión OPMRr se co-transfectó pHIV-OPMRr-GFP con cuatro secuencias distintas (A, B, C y D) de shRNAs dirigidos al RNA mensajero del OPMRr. Las secuencias A y D otorgaron el mayor grado de silenciamiento, inhibiendo en un 73% y 75% respectivamente la expresión de OPMRr. Se generaron lentivirus codificantes de los shRNAs más potentes en reducir su expresión para posteriores ensayos *in vivo*.

En conclusión, mediante el uso de técnicas de biología molecular se clonó y expresó el gen del OPMRr en células en cultivo. Además, se identificaron 2 secuencias de shRNAs capaces de silenciar en más de un 70% la expresión del cDNA codificante para OPMRr y se generaron sus correspondientes lentivirus.

SUMMARY

Alcoholism is a worldwide public health problem. Therefore, it is important to understand its neuropharmacological bases to identify new therapeutic targets. One of the main problems of alcoholism is relapse, which is the loss of control over ethanol consumption when the patients start to drink again after a period of abstinence. Studies carried out on animal models of alcoholism have established an enhanced pleasurable value of ethanol consumption at the time of relapse. This alcohol enhanced hedonistic value could be associated to an increase in the μ -opioid receptor (OPMR) levels on the brain reward circuit. To determine the role of OPMR on ethanol consumption relapse, the ability of different short hairpin RNAs (shRNAs) to decrease OPMR expression *in vitro* was assessed. The best shRNAs are intended to be used in future *in vivo* studies.

First, the rat μ -opioid receptor (OPMRr) gene was cloned into the expression plasmid pHIV-GFP, generating the pHIV-OPMRr-GFP plasmid. HEK-293T cells, which naturally do not express OPMRr, were transfected with pHIV-OPMRr-GFP and the OPMRr expression was determined by Western blot. To assess the silencing of the OPMRr *in vitro*, the pHIV-OPMRr-GFP plasmid was co-transfected with 4 shRNAs sequences (A, B, C y D) designed against the OPMRr messenger RNA. shRNAs A and D exhibit the highest silencing ability, inhibiting OPMRr expression by 73% and 75% respectively. For future *in vivo* assays, lentiviral vectors codifying for these shRNAs were generated.

In conclusion, using molecular biology techniques it was possible to clone and express the gene of the OPMRr in HEK-293T cells. Two shRNAs sequences that inhibit the OPMRr cDNA expression over a 70% were identified and lentiviral vectors that codify for these shRNAs were generated.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcoholismo y su impacto en la sociedad

El alcoholismo es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el *consumo crónico y continuado de alcohol que se caracteriza por un deterioro del control sobre el nivel de consumo, episodios frecuentes de intoxicación y obsesión por el alcohol y su consumo a pesar de sus consecuencias adversas* (OMS, 1994). El alcoholismo es un problema de interés mundial, debido a los problemas físicos, psicológicos y sociales que conlleva, tanto para la misma persona, como para quienes lo rodean. El consumo frecuente de alcohol es un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, cirrosis hepática, como también dependencia, traumatismos debidos a violencia y accidentes de tránsito (OMS, 2014; Margozzini y Sapag, 2015)

Según la OMS, América es la segunda región que más consume alcohol en el mundo después de Europa, consumiendo un promedio de 8,4 litros de alcohol puro al año por persona (Ver Figura 1). Chile es el país de Latino América con el mayor consumo promedio de alcohol llegando a los 9,6 litros de alcohol puro al año (OMS, 2014).

El alcoholismo significa una carga importante para la salud pública del país, debido a los múltiples problemas que conlleva. En Chile, se estima que una de cada diez muertes se encuentran relacionadas al consumo de alcohol (Castillo-Carniglia y cols., 2013).

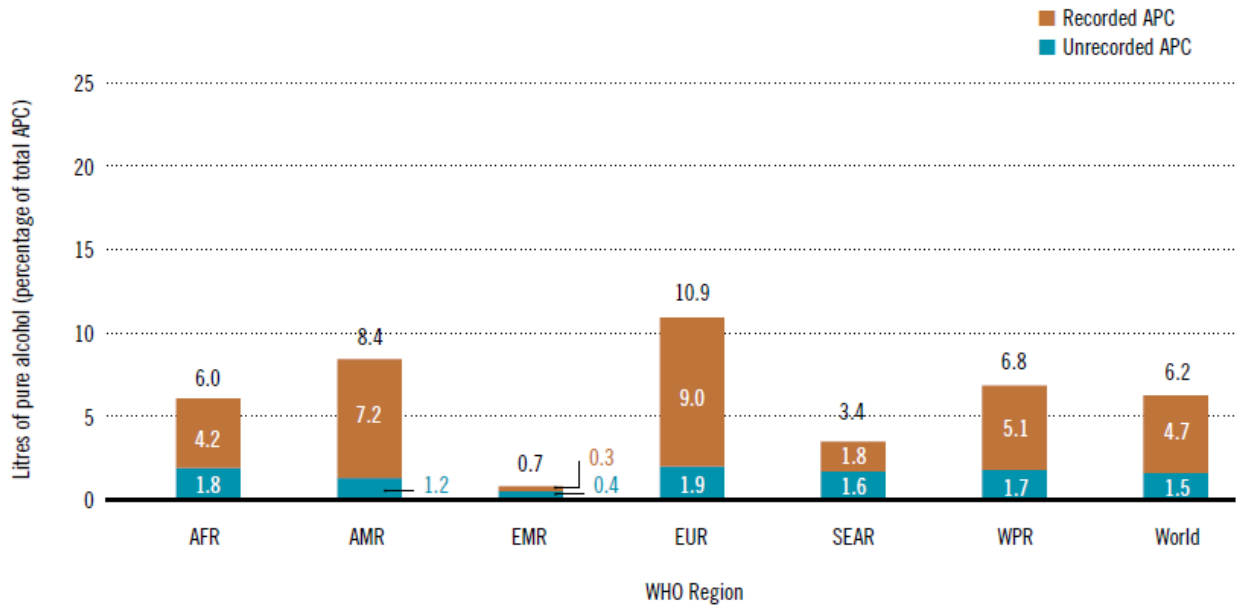


Figura 1. Promedio de litros de alcohol puro consumido en el año 2010 en distintas zonas del mundo. AFR=África, AMR=América, EMR=Mediterráneo Oriental, EUR=Europa, SEAR=Sudeste Asiático, WPR=Pacífico Oeste, World=Mundial. (OMS, 2014)

Nuestro país presentaba en el año 2012, junto a otros países de distintas zonas del mundo el puntaje más alto de años de vida perdidos atribuidos al consumo de alcohol (OMS, 2014). Estudios realizados por Castillo-Carniglia y cols., (2013), mostraron que en el año 2009 en Chile, 8.753 muertes se atribuyeron al consumo de alcohol, lo que correspondía al 9,8% del total de muertes de ese año en el país. El consumo de alcohol es el principal factor de riesgo para la salud de nuestro país, está relacionado con el 12,4% de los años de vida saludables (AVISA) perdidos por muerte o discapacidad, el doble de los AVISA producidos por obesidad (6,3%) o hipertensión (5,6%) (SENDA, 2016). El alcoholismo es un problema muy frecuente, que se desarrolla desde etapas tempranas de la vida, aproximadamente desde el inicio de la adolescencia, donde comienza el consumo, con un aumento muy veloz en la cantidad y frecuencia de este consumo, hasta el inicio de la adultez (CONACE, 2011).

1.2. La recaída como el principal problema del alcoholismo.

Uno de los principales problemas en el tratamiento del alcoholismo es la recaída en el consumo, ya que solo el 30% de las personas con esta patología se mantienen abstemias luego de un año después de suspender su consumo (Dawson y cols., 2005). Esta recaída en el consumo de alcohol está asociada fuertemente a la aparición del *Síndrome de Privación*, que son una serie síntomas negativos asociados a la suspensión del consumo de alcohol después de un periodo prolongado de ingesta. Estos síntomas consideran una necesidad apremiante de consumir alcohol, temblores, angustia y convulsiones, entre otros. Estos síntomas se transforman en una potente razón para volver a beber y poder aliviar estos síntomas negativos. Asimismo, se reporta un aumento de los efectos placenteros del alcohol en el paciente alcohólico al volver a consumir alcohol después de un período de abstinencia, lo que resulta generalmente, en una escalada de consumo que llega a niveles aún mayores a los observados en el período previo a la abstinencia. Se propone que varios de los síntomas asociados al Síndrome de Privación están relacionados con alteraciones en el flujo de neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central (SNC), como glutamato, dopamina y/o serotonina (Nevo y Hamon, 1995), principalmente en la vía de la recompensa, área cerebral fundamental en la génesis de la adicción a un número importante de drogas de abuso.

1.3. Vía cerebral de la recompensa y efectos adictivos del alcohol

La vía de la recompensa es un circuito cerebral que se ubica en la región mesocorticolímbica. Este sistema está relacionado con el refuerzo positivo a estímulos y acciones asociadas a funciones básicas de la conducta como la alimentación y la actividad sexual. El sistema de la recompensa está constituido por neuronas dopaminérgicas, cuyos somas están ubicados en el área tegmental ventral (VTA). Los axones de estas neuronas se proyectan principalmente al núcleo accumbens (NAc) y a la corteza prefrontal (PFC) (Figura 2). La activación de la vía de la recompensa resulta en un aumento de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc y en la PFC. La mayor parte de las drogas con potencial adictivo, como cocaína, anfetaminas, nicotina, morfina, heroína y alcohol, presentan como factor común su capacidad de activar el sistema mesocorticolímbico y producir mediante distintos mecanismos de acción farmacológicos un aumento de los niveles de dopamina en el NAc (Di Chiara e Imperato, 1988; Sanchez-Catalan y cols., 2014).

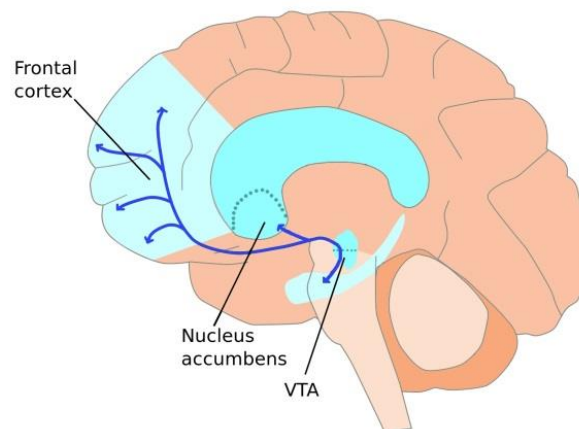


Figura 2. Distribución y ubicación de la vía de la recompensa en el cerebro (Sistema Mesocorticolímbico). Las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (VTA) se proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (PFC).

En el VTA existen interneuronas GABAérgicas que a través de la liberación de GABA inhiben a las neuronas dopaminérgicas de esta área, que en sus terminales dendríticos presentan receptores para este neurotransmisor inhibitorio (Figura 3). Las interneuronas GABAérgicas poseen a su vez en su superficie receptores opioides, que son un tipo de receptores acoplados a proteína G del tipo inhibitorio (Gi). La activación de los receptores opioides, tanto por ligandos endógenos (endorfinas) como por sustancias exógenas (morfina, heroína, posiblemente alcohol), inhibe la liberación de GABA por las neuronas GABAérgicas, lo que resulta en una desinhibición de las neuronas dopaminérgicas y en un aumento de la liberación de DA en el Núcleo Accumbens (NAc), generando un gran refuerzo positivo (Heilig y cols., 2012).

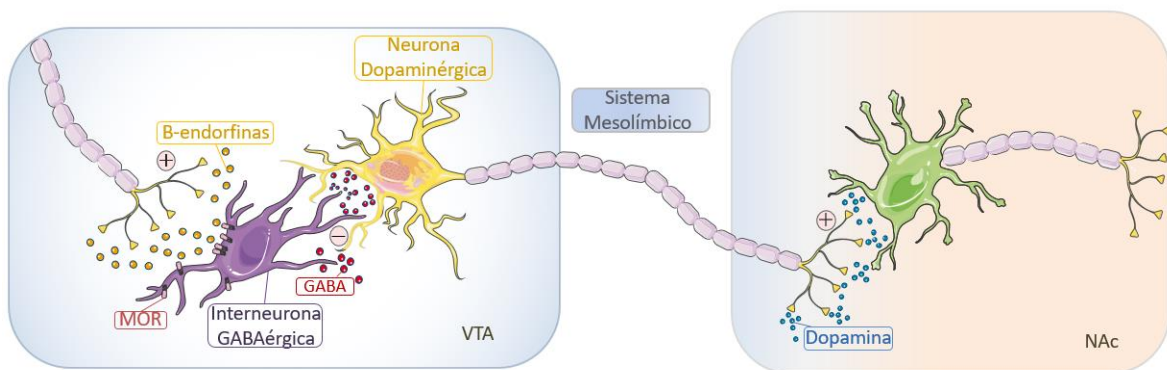


Figura 3. Mecanismo regulatorio de las interneuronas GABAérgicas en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesocorticolímbico (via de la recompensa). La activación de los receptores opioides de las interneuronas GABAérgicas genera una inhibición de la liberación de GABA, lo que produce un aumento en la liberación de dopamina en el NAc (Modificado de Heilig y cols., 2012).

1.4. Características del receptor μ -opioide

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR). Hasta el momento se han identificado tres tipos de receptores opioides [μ (μ), κ (κ), δ (δ)], que se diferencian en su estructura aminoacídica y en su afinidad por los distintos agonistas y antagonistas opioides. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso entérico, periférico y central. Se han diseñado péptidos opioides sintéticos que poseen selectividades distintas por los receptores μ , δ o κ , y han sido usados para determinar las propiedades farmacológicas de los distintos tipos de receptores opioides (Feng y cols., 2012). El receptor μ -opioide (OPMR) está constituido por 398 aminoácidos (Zastawny y cols., 1994) que forman 7 dominios transmembrana, tres *loops* intracelulares y tres *loops* extracelulares, en donde el primer *loop* extracelular corresponde al sitio de unión a ligando (Figura 4). Los *loops* intracelulares 1 y 3, el extremo carboxílico y el quinto dominio transmembrana están relacionados a su vía de señalización y median la interacción entre el receptor y la proteína G_i . Al unirse el ligando a su sitio activo se produce un cambio conformacional el que activa a la proteína G_i , compuesta por tres sub unidades: α , β y γ . La activación de la proteína G_i resulta en la disociación de la sub-unidad α de la sub-unidad heterodimérica $\beta\gamma$. La liberación de la sub-unidad α inhibe la actividad de la adenilato ciclasa. Por otro lado, la sub unidad $\beta\gamma$ inhibe la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que disminuye la entrada de calcio a la célula y la liberación de neurotransmisores y también favorece la activación de los canales de potasio, lo que genera hiperpolarización de la célula, haciéndola menos reactiva a la transmisión de los impulsos nerviosos y disminuyendo la excitabilidad neuronal (Sobczak y col., 2014, Galligan y cols., 2014).

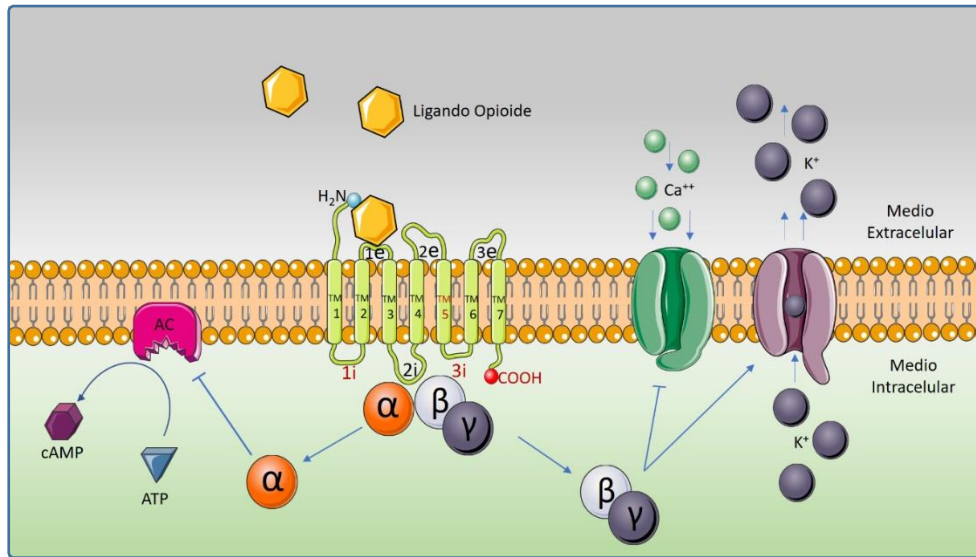


Figura 4. Esquema del receptor μ -opioide y su mecanismo de activación. Se muestra la estructura del receptor μ -opioide, partiendo por su extremo amino terminal extracelular, los 7 dominios transmembrana (TM 1 al 7), los tres loops intracelulares (1i, 2i y 3i), los tres dominios extracelulares (1e, 2e y 3e) y el extremo carboxílico terminal intracelular. En rojo se destacan 1i, 3i, TM5 y extremo carboxílico terminal, que corresponden a los sitios de interacción con la proteína heterotrimerica Gi. La proteína Gi inactiva se representa por sus monómeros α β y γ unidos. La activación del receptor μ -opioide por el ligando activa la proteína Gi, induciendo la disociación de la sub-unidad α de las sub-unidades $\beta\gamma$. La subunidad α se une a la adenilato ciclasa (AC) e inhibe su actividad, mientras que el complejo $\beta\gamma$ induce la apertura del canal de potasio y el cierre del canal de calcio dependiente de voltaje. (Modificado de Sobczak y col., 2014., Galligan y cols., 2014).

1.5. Receptores opioides, alcoholismo y recaída en el consumo de alcohol

En relación a los mecanismos por los cuales el alcohol podría estimular a los receptores opioides se han investigado dos teorías principales. Uno de los mecanismos propuestos, dice relación con la capacidad del alcohol de estimular en el hipotálamo la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH, en inglés), la que a su vez aumenta la liberación de β -endorfinas desde distintas áreas cerebrales. El aumento de los niveles de β -endorfinas activa los receptores opioides μ y δ presentes en las interneuronas GABAérgicas del VTA, lo que genera un aumento de la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens, generando refuerzo positivo y dependencia (Gianoulakis, 2001).

Otro de los mecanismos propuestos, sugiere que el responsable de la acción farmacológica del alcohol sería un metabolito denominado salsolinol (Israel y cols., 2015). El salsolinol se genera como producto de la condensación de la dopamina con el acetaldehído, principal metabolito de la oxidación enzimática del alcohol en el cerebro por acción de la catalasa (Karahanian y cols., 2011; Deehan y cols., 2013). Se ha demostrado que este metabolito tiene efectos adictivos muy potentes, y que su mecanismo de acción estaría relacionado con los receptores opioides μ (OPMR), ya que estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el uso de antagonistas opioides como la naltrexona, pueden inhibir los efectos reforzantes del salsolinol (Correa y cols., 2012; Quintanilla y cols., 2016; Melis y cols., 2013). Un estudio reciente de nuestro laboratorio realizado en células en cultivo que expresaban artificialmente el OPMR (Berrios-Cárcamo y cols., 2017), mostró por primera vez que el salsolinol es capaz de activar el OPMR a través de la vía de transducción asociada a la adenilato ciclasa, resultando en una disminución de los niveles de AMP cíclico. En este mismo estudio se encontró que el antagonista opioide, naltrexona es capaz de inhibir la activación del OPMR por el salsolinol.

Se ha postulado que el Efecto de Privación, factor fundamental que gatilla la recaída en el consumo de alcohol en alcohólicos bajo tratamiento de desintoxicación, estaría relacionado con cambios en la densidad de OPMR en las interneuronas GABAérgicas del VTA. Existe evidencia de un aumento en la densidad de OPMR en las neuronas GABAérgicas del VTA en condiciones de abstinencia (Djouma y cols., 2002). Se ha propuesto, que la estimulación constante del sistema opioide en individuos alcohólicos, es un factor que promueve la internalización y/o desensibilización de los OPMR. Sin embargo, durante la abstinencia este efecto se revertiría, generándose un fenómeno de *up-regulation* de la transmisión opiácea, caracterizado por un aumento de la expresión de OPMR y una permanencia temporal de este efecto (Djouma y cols., 2002). Como consecuencia de los síntomas negativos del Síndrome de Abstinencia, es muy usual que los alcohólicos regresen al consumo de alcohol

para aliviar estos síntomas. Sin embargo, y como consecuencia de esta *up-regulation* opioide, al momento de volver a beber se generaría un refuerzo positivo aun mayor que al consumirlo habitualmente, lo que sería responsable de la escalada en el consumo y de la perpetuación del hábito alcohólico.

La participación de OPMR en el(los) mecanismo(s) asociado(s) al Efecto de Privación ha sido propuesta por varios investigadores, pero no hay evidencia directa de que estén involucrados en este fenómeno. Sin embargo, en un estudio reciente de nuestro laboratorio (Urra, 2016), se estudió los niveles de OPMR en distintas zonas del sistema mesocorticolímbico de ratas bebedoras UChB que fueron sometidas a un consumo crónico de alcohol de dos meses y luego a una privación del consumo de dos semanas. Los resultados de este estudio mostraron que el consumo crónico más privación, situación similar a la que genera el Síndrome de Privación, resultó en un aumento significativo de 62% en la densidad de OPMR en el VTA, no encontrándose cambios significativos en otras áreas como el NAc y la PFC.

1.6. RNA de interferencia (siRNA) como herramienta farmacológica.

Una alternativa a las drogas de síntesis en el estudio funcional de los receptores farmacológicos son las herramientas génicas, las cuales permiten alterar o inhibir específicamente la expresión de un receptor farmacológico específico en regiones discretas del cerebro. Entre estas herramientas génicas podemos mencionar el uso de RNAs de antisentido, RNAs de interferencia y la nueva tecnología de edición génica CRISP.

Los RNAs pequeños de interferencia o siRNA (short interfering RNA) son un mecanismo natural del organismo para regular la expresión génica. Estos elementos genéticos funcionan como un mecanismo de defensa contra virus y también para mantener la integridad del genoma. El mecanismo del RNA de interferencia se inicia cuando la célula

detecta en el citoplasma un RNA de doble hebra, los que generalmente son la forma en que se empaqueta el material genético de algún virus o de secuencias artificiales de RNA conocidas como horquillas cortas de RNA (en inglés, short hairpin RNA o shRNA). Estos RNAs de doble hebra son cortados por una enzima llamada Dicer, formando RNAs pequeños no mayores a 21-23 pares de bases denominados siRNAs. Estos siRNAs son cargados en un complejo llamado RNA-induced Silencing Complex (RISC), que separa la doble hebra de RNA y conserva la hebra codificante. El complejo RNA-RISC escanea los RNA mensajeros para encontrar secuencias complementarias al RNA cargado, los que al ser detectados son hidrolizados y destruidos impidiendo su traducción a proteína (Obbard y cols., 2008; Ahmed y cols., 2011). La incorporación de shRNA artificiales permite dirigir este mecanismo hacia el mRNA de proteínas específicas para inhibir su función; siendo esta característica de una gran utilidad en farmacología para el descubrimiento de mecanismos de acción y la identificación de blancos moleculares.

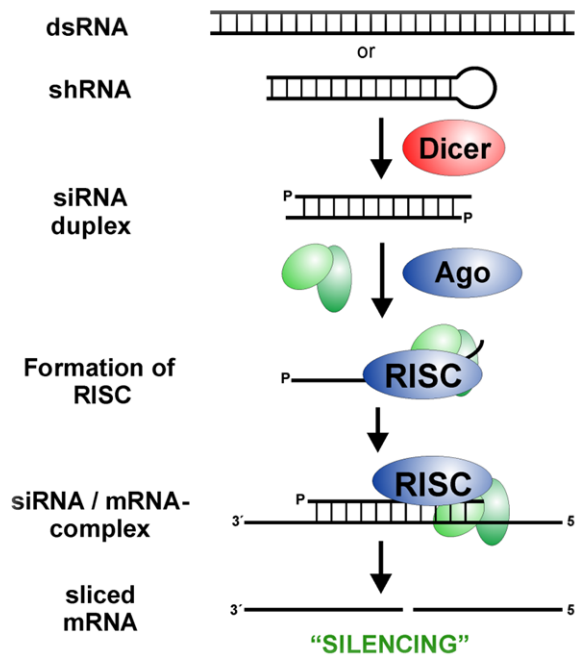


Figura 5: Mecanismo de formación y acción de los siRNA. A partir del RNA doble hebra (*dsRNA*), o una horquilla corta de RNA sintético, la proteína *Dicer* genera secuencias de RNA de doble hebra de 21 a 23 pares de bases. Una de las hebras (codificante) es ensamblada en el complejo *RISC*, el cual puede detectar RNAs mensajero complementarios, proceder a su hidrólisis y de esta forma silenciar la expresión de la proteína correspondiente (Logan, 2009).

Considerando: i) los antecedentes presentados y ii) los objetivos experimentales del proyecto FONDECYT 11130241 que dicen relación con el estudio del efecto de silenciar los receptores μ -opioide del VTA en el desarrollo del Efecto de Privación al Alcohol en un modelo de ratas bebedoras de alcohol; en esta Tesis de Pregrado se plantea el desarrollo de estudios *in vitro* enfocados en desarrollar un shRNA que sea efectivo para silenciar la expresión del receptor μ -opioide.

2. HIPÓTESIS

La expresión del receptor Mu (μ) opioide de rata en células HEK-293T en cultivo puede ser inhibida mediante RNAs de interferencia.

3. OBJETIVO GENERAL

Silenciar la expresión del receptor μ opioide en células HEK-293T en cultivo mediante RNAs de interferencia.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Clonar el gen del receptor μ -opioide de rata en el plásmido de expresión pHIV-GFP y determinar su expresión en células en cultivo.
- 2.- Determinar mediante Western blot, la capacidad de cuatro shRNAs de inhibir la expresión *in vitro* del receptor μ -opioide de rata.
- 3.- Generar vectores lentivirales codificantes del shRNA que inhiban de mejor manera la expresión del gen del receptor μ -opioide de rata.
- 4.- Generar líneas celulares que expresen establemente el/los shRNAs que logren la mejor inhibición del receptor μ -opioide.

4. MATERIALES

4.1. Material biológico

Bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Laboratorio de Microbiología de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile); células HEK293-T (CRL-1573, ATCC, EEUU).

4.2. Plásmidos

pHIV-GFP: otorgado por Bryan Welm y Zena Werb (Addgene plasmid # 21373).

pTransporter-OPMRr: adquirido a R&D Systems (VersaClone cDNA #RDC0419).

TL703585A, **TL703585B**, **TL703585C**, **TL703585D** y **TR30021(Scr)**: plásmidos correspondientes a los cinco **shRNAs** (Origene, EEUU).

4.3. Enzimas

De Thermo Scientific (EEUU): **XbaI** #ER0685, **T4 DNA ligase**, #EL0014; De Fermentas (EEUU): **HpaI** #ER1031, **NheI** #ER0971; De New England Biolabs (EEUU): **AgeI** #R0552S; De Promega (EEUU): **EcoRV** #R635A.

4.5. Materiales generales

De Sigma (EEUU): agar bacteriológico, cloranfenicol. De MOBIO Laboratories (EEUU): medio Luria Bertani (LB). De Gibco (EEUU): medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); suero fetal bovino; tripsina 0.25%-EDTA (1X); penicilina estreptomicina. De Thermo Scientific (EEUU): mix de inhibidor de proteasas Halt, estándar de peso molecular de proteínas PageRuler Prestained Protein Ladder, estándar de peso molecular O'GeneRuler 1kb DNA Ladder. Membrana de nitrocelulosa 0,45 μ m (Whatman, EEUU), polietilenimina (Polyscience, EEUU); leche descremada (Nestlé, Chile), rojo Ponceau-S (Winkler, Chile), ampicilina (Santa Cruz Biotech, EEUU); GelRed (Biotium, EEUU).

4.6. Tampones

- Tampón PBS 10X: KCl 0.027M, KH₂PO₄ 0,018 M, NaCl 1,37 M, Na₂HPO₄ 0,1 M.
- Tampón RIPA 1X: NaCl 150mM, Triton x 100 1% [v/v], Deoxicolato de sodio 0,5% [p/v], SDS 0,1% [p/v], TRIS pH8 50mM.
- Tampón Laemmli 4X: 8% SDS, 20% 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,08% azul de bromofenol, 0,250 M Tris HCl pH = 6,8.
- Tampón TAE 50X: Tris 242,3g/L, Ácido acético glacial 5.7% v/v, EDTA 18,6 g/L pH 8,4.
- Tampón de Carga 6X para geles de agarosa: SDS 0,5% [p/v], Glicerol 39% [v/v], EDTA 0,01M, azul de bromofenol 0,25% [p/v], Xylene cyanol 0,25% [p/v].

4.8. Anticuerpos

- Anti-OPMRr (anticuerpo monoclonal de ratón #677014, R&DSYSTEMS, EEUU).
- Anti-β-actina (anticuerpo monoclonal de ratón #G043, Applied Biological Materials Inc., Canadá)
- Anticuerpo secundario de cabra anti-raton acoplado a HRP (#sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, EEUU).

5. MÉTODOS

5.1. Transformación de bacterias

Para la amplificación de los plásmidos, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α quimio-competentes. En un ambiente estéril, se agregaron aproximadamente 0,1 μ g de plásmido a 100 μ L de bacterias quimio-competentes. Una vez adicionado el plásmido, se incubó en hielo durante 30 min. Pasado ese tiempo se aplicó un shock térmico de 42°C durante 2 minutos y se incubaron en hielo por unos minutos. Se tomaron tubos de cultivo estériles y se agregó 900 μ L de medio LB y luego se agregaron las células transformadas. La mezcla se incubó a 37°C con agitación orbital (300 rpm) durante 1,5 horas. Pasado ese periodo de tiempo se sembraron entre 200 a 300 μ L de la mezcla en una placa de LB-Agar con antibiótico de acuerdo a la resistencia del plásmido. Las placas se incubaron invertidas a 37°C durante toda la noche.

5.2. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina

Colonias aisladas se cultivaron en 4 mL de medio LB más antibióticos con agitación orbital a 300 rpm y a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 1,5 mL de este cultivo y se centrifugaron a 5000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se desechó el sobrenadante y se agregaron otros 1,5 mL de cultivo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μ L de Tampón de Resuspensión (Solución I) (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH8 25mM, EDTA pH8 10 mM, RNAasa A 100 μ g/ml) y se agitó en vórtex hasta la resuspensión completa de las bacterias. Luego se agregaron 200 μ L del Tampón de Lisis (Solución II) (NaOH 0,2N, SDS 1% [p/v]) y se mezcló bien por inversión hasta obtener una solución viscosa homogénea. Posteriormente se agregó 200 μ L del Tampón de Precipitación (Solución III) (acetato de

potasio 3 M, ácido acético glacial 11,5% [v/v]), y se mezcló por inversión. Luego se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se traspasó el sobrenadante a un nuevo set de tubos y se agregaron 500 µL de isopropanol y se mezcló bien mediante inversión. Luego se centrifugó los tubos a 15.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% y se agitó con vórtex, para luego centrifugarlo a 15.000 x g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío durante 20-30 minutos. Pasado ese periodo de tiempo y procurando que no quedara etanol remanente, se disolvió el precipitado en 50-70 µL de agua nanopura y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para analizar la integridad y peso molecular del DNA plasmidial, se prepararon geles de agarosa a una concentración de 0,8% [p/v] en Tampón TAE 1X. La disolución de la agarosa se logró mediante el calentamiento de la solución en un horno de microondas a máxima potencia. La solución de agarosa caliente se colocó en el molde para geles y se colocó una peineta plástica para formar los bolsillos de carga. El sistema se enfrió a temperatura ambiente durante 40 min hasta la total gelificación de la agarosa. El sistema se sumergió en Tampón TAE 1X en una cámara de electroforesis (MGU-402T, CBS Scientific Co., EE.UU.). Luego se prepararon las muestras para la carga mezclando la solución de DNA con 2,5 partes de Tampón de Carga 6X. La mezcla obtenida se cargó en los bolsillos del gel usando una micropipeta. En los ensayos también se incluyó 5 µL de un estándar de peso molecular (O'GeneRuler 1kb DNA). La electroforesis se realizó a 100 V durante 40 minutos. Luego, el gel se retiró de la cámara y se incubó en una solución del colorante GelRed en TAE, protegido de la luz durante 10 minutos. Para visualizar el DNA, se colocó

el gel sobre un transiluminador ultravioleta (Vilber Lourmat), que emitió luz UV de una longitud de onda de 312 nm y las imágenes se registraron mediante una cámara fotográfica digital (Canon PowerShot G16) equipada con un filtro (Filtro #590 52nm IR-UV PECA Products Inc.).

5.4. Clonación del receptor μ -opioide de rata en el plásmido pHIV-GFP

5.4.1. Digestión de los plásmidos

Para generar un plásmido que permitiese la expresión en células eucariontes del receptor μ -opioide de rata (OPMRr), se sub-clonó mediante el uso de enzimas de restricción el gen de OPMRr que se encontraba en el plásmido pTransporte-OPMRr en el plásmido de expresión pHIV-GFP. Los sitios de digestión seleccionados para la clonación fueron determinados utilizando el programa Serial Cloner (SerialBasics), que en pHIV-GFP correspondieron a los sitios 3.817 para HpaI y 3.826 para XbaI, dando como resultados dos fragmentos de 9 pb y 7.680 pb, a este último fragmento se denominó Vector. En el caso del pTransporte-OPMRr los sitios de corte seleccionados fueron 409 para HpaI y 1.664 para XbaI dando como resultado dos fragmentos de 2.689 pb y 1.255 pb, este último es el fragmento que contiene el gen de OPMRr y se denominó como Inserto. Los plásmidos se sometieron a doble digestión según el siguiente protocolo:

	1X	2,2X
XbaI	0,8 μ L	1,76 μ L
HpaI	0,8 μ L	1,76 μ L
Tamón Tango	10 μ L	22 μ L
Plásmido	(10) μ L	----
H ₂ O nanopura	78,4 μ L	172,48 μ L
Total	90 μ L (100 μ L)	198 μ L

Se preparó un volumen suficiente de mezcla de reacción que contenía ambas enzimas para realizar la doble digestión de ambos plásmidos por separado. Se procuró mantener todos los reactivos en hielo, en particular las enzimas, evitando su descongelamiento prolongado. Se agregaron los reactivos en el siguiente orden: agua nanopura, tampón Tango, se homogenizó bien y posteriormente, se agregaron las enzimas de restricción. Luego se tomaron 90 µL de la mezcla de reacción y se colocaron en cada uno de dos microtubos nuevos. Luego se agregaron 10 µL de una solución de los plásmidos pHIV-GFP y pTransporte-OPMRr respectivamente. Se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente las enzimas se inactivaron mediante incubación a 65°C durante un minuto y posteriormente los resultados de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa 0,8% [p/v]. La concentración aproximada de los fragmentos se obtuvo mediante la comparación de la intensidad de las bandas del estándar de peso molecular.

5.4.2. Reacción de ligación

Una vez estimada la concentración aproximada del vector y del inserto, se encontró que el vector estaba a una concentración de aproximadamente 70 µg/µL, mientras que el inserto se obtuvo a una concentración de aproximadamente 25 µg/µL.

La ligación se realizó en tres proporciones vector:inserto distintas, 1:1, 1:5 y 1:10 según la siguiente fórmula:

$$\text{ng de Inserto} = \frac{\text{ng de Vector} \times \text{Kb Inserto}}{\text{Kb Vector}} \times \text{relación}$$

1:1 ng de Inserto = $\frac{50 \text{ ng} \times 1,25 \text{ Kb}}{7,68 \text{ Kb}} \times 1 = 8,13 \text{ ng}$ de inserto que se encuentran en 0,3µL de stock de inserto.

1:5 ng de Inserto = $\frac{50 \text{ ng} \times 1,25 \text{ Kb}}{7,68 \text{ Kb}} \times 5 = 40,65 \text{ ng}$ de inserto que se encuentran en 1,6 μL de stock de inserto.

1:10 ng de Inserto = $\frac{50 \text{ ng} \times 1,25 \text{ Kb}}{7,68 \text{ Kb}} \times 10 = 81,3 \text{ ng}$ de inserto que se encuentran en 3,2 μL de stock de inserto.

Los 50 ng de Vector se encuentran en aproximadamente 0,7 μL de stock de vector.

La reacción de ligación se realizó de acuerdo a la siguiente formulación:

	1 : 1	1 : 5	1 : 10
Vector pHIV-GFP	0,7 μL	0,7 μL	0,7 μL
Inserto pOPMRr	0,3 μL	1,6 μL	3,2 μL
Ligasa	1 μL	1 μL	1 μL
Tampón ligasa	2 μL	2 μL	2 μL
H ₂ O nanopura	16 μL	14,7 μL	13,1 μL
Total	20 μL	20 μL	20 μL

Los elementos de la reacción de ligación se adicionaron en el siguiente orden: agua, tampón ligasa, inserto, vector, y ligasa (5 weiss U/ μL). La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 22°C y posteriormente la ligasa se inactivó mediante incubación a 70°C durante 5 minutos.

A continuación, se transformaron bacterias con estas 3 ligaciones, para posteriormente realizar un análisis rápido de estas colonias.

5.4.3. Análisis rápido de colonias

Para encontrar el clon deseado se realizó un análisis rápido de colonias que consistió en la ruptura química de las bacterias y en el análisis de la migración del plásmido de acuerdo a su tamaño. Para ello se seleccionaron aproximadamente 40 colonias de bacterias transformadas con las correspondientes ligaciones y se cultivaron en 2 mL de medio de cultivo con ampicilina durante toda la noche. Al día siguiente se tomó 100 μ L de cada colonia y se colocaron en microtubos de 0,6 mL, se agregaron 50 μ L de una solución 1:1 fenol:cloroformo y 10 μ L de tampón de carga, se agitaron vigorosamente por 20 segundos y se centrifugaron a 15.000 x g durante 5 minutos. Posteriormente se tomaron 30 μ L de fase acuosa y se cargaron en un gel de agarosa al 0,8%, el cual se corrió durante 45 minutos a 100 V con el plásmido del pHIV-GFP como estándar de peso. Los plásmidos que migraban más abajo del pHIV-GFP se consideraron como de peso molecular inferior y por lo tanto no candidatos, en cambio cualquier plásmido que presentara un tamaño mayor a pHIV-GFP se consideró como un posible candidato del plásmido pHIV-OPMRr-GFP.

5.4.4. Confirmación de la estructura de pHIV-OPMRr-GFP

Una vez determinados los candidatos, se procedió a hacer digestiones con enzimas de restricción que permitieran confirmar la estructura correcta correspondiente al clon esperado que era pHIV-OPMRr-GFP. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción Agel, NheI y EcoRV. La digestión con Agel corta al plásmido en solo un sitio, por lo que lineariza la estructura de los plásmidos pHIV-GFP como pHIV-OPMRr-GFP. La siguiente digestión con la enzima NheI, corta solo en el inserto (OPMRr), por lo que el control pHIV-GFP debería continuar linearizado y el clon candidato presentar dos fragmentos de 7.799 y 1.136

pb. En una digestión subsecuente, los plásmidos se digirieron con EcoRV, la cual corta en dos sitios del vector y uno dentro del inserto lo que generaría un patrón de corte muy característico en el caso del candidato.

5.4.5. Generación de archivo de respaldo de pHIV-OPMRr-GFP

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes de acuerdo a lo señalado en el punto 5.1 con el plásmido pHIV-OPMRr-GFP y se amplificó una de las colonias aisladas, incubándolas en 3 mL de medio LB con ampicilina en tubos de cultivo estériles con agitación orbital de 300 rpm a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, en microtubos de 1,5 mL se agregaron volúmenes necesarios de glicerol estéril e inculo para lograr una concentración de glicerol de 20% [v/v]. Los microtubos con la solución inculo-glicerol 20% se congelaron mediante inmersión en etanol absoluto a una temperatura de -80°C. Una vez congelados se mantuvieron guardados a -80°C como respaldo.

5.5. Cultivo de células HEK-293T

El cultivo de las células HEK-293T se realizó en el laboratorio del Dr. Mario Herrera-Marschitz, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Se tomó un stock de células HEK-293T mantenidas a -80°C y se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% (medio de cultivo completo). Una vez que las células alcanzaron 80% de confluencia se procedió a su traspaso para un nuevo ciclo de cultivo. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se agregó 1 mL de tripsina-EDTA a una placa de cultivo de 10 cm de diámetro y se incubó a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se agregó 4 mL de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y mediante pipeteo

se desprendieron completamente las células de la placa. Las células se contaron en una cámara Neubauer y se traspasaron en cantidad adecuada a una nueva placa de cultivo conteniendo aproximadamente 11 mL de medio de cultivo completo.

5.6. Transfección de células HEK-293T con ADN plasmidial

Para la transfección de las células HEK-293T, los plásmidos se purificaron en un estado libre de endotoxinas mediante el uso del Kit E.Z.N.A. Endo-Free Plasmid DNA Midi Kit (OMEGA Bio-tek, EE.UU.) según las instrucciones del proveedor y los plásmidos se cuantificaron mediante absorbancia a 260/280 nm en un lector de microplacas. El procedimiento se llevó a cabo en la campana de bioseguridad con flujo laminar. En primer término el día anterior a la transfección, se sembraron 1.000.000 de células en cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos conteniendo 2 mL de medio de cultivo completo. El día de la transfección se cambió el medio de cultivo completo de las células por 1 mL de medio de cultivo sin suero. Para cada pocillo, en un microtubo se mezclaron 12 μ L de polietilenimina (7,5 mM; 0,6 μ g/ μ L) y 88 μ L de una solución isotónica de NaCl 150 mM y en otro microtubo se mezclaron 2 μ g de DNA con NaCl 150 mM a un volumen de 100 μ L. Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y luego ambas mezclas se reunieron en un solo microtubo para incubarlas 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla resultante de 200 μ L PEI/plásmido/NaCl se agregó gota a gota, utilizando una micropipeta, en espiral sobre toda la superficie de cada pocillo y sin agitar se incubó a 37°C durante 6 horas en una atmósfera de 5% CO₂. Pasado ese tiempo se suplementó el medio de cultivo con 1 ml de medio de cultivo con suero fetal bovino al 20% y se incubó a 37°C durante 48 horas en una atmósfera de 5% CO₂.

5.7. Obtención de los lisados celulares

Luego de 48 horas desde la transfección, se retiró el medio de cultivo, se agregó 1 mL de PBS y las células se desprendieron mediante pipeteo. La suspensión de células se traspasó a microtubos de 1,5 mL y se centrifugaron a 1.500 x g durante 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante, se agregó 1 mL de PBS y las células se re-suspendieron para luego centrifugarlas a 1.500 x g durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 300 µL de tampón RIPA más 3 µL de un mix de inhibidores de proteasas Halt™, se homogenizó el *pellet* manualmente y luego se aplicaron 2 ciclos de 5 pulsos de sonicación. Durante todo ese proceso se mantuvieron en hielo los microtubos. A continuación, el lisado se centrifugó a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C y se almacenó en 3 alícuotas de 100 µL para su uso posterior.

5.8. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando un sistema comercial de cuantificación basado en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} por acción de los grupos funcionales de las proteínas y posteriormente a la formación de un complejo coloreado entre los iones Cu^{+} y el ácido bicincocínico. La absorbancia del complejo a 562 nm es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra. El sistema comercial incluía una ampolla de 1 mL de estándar de albumina de suero bovino (BSA) de 2.000 µg/mL en NaCl 0,9% a partir de la cual se hizo una curva de calibración mediante diluciones seriadas del estándar en tampón de lisis RIPA. Los nueve puntos de la curva tenían las siguientes concentraciones de BSA (µg/mL): 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250, 125, 25 y 0. Para la reacción colorimétrica se preparó una Solución de Trabajo mezclando 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B. Para estimar la concentración de las muestras se midió la señal de las muestras concentradas y

en diluciones de 1/5 y 1/10. Las mediciones se llevaron a cabo en microplacas no estériles de 96 pocillos a las cuales se les adicionó 25 μ L de cada punto de la curva de calibración y de muestra por duplicado. Una vez cargada la microplaca con las muestras y la curva, se agregó 200 μ L de Solución de Trabajo a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia a 562 nm se determinó en un lector de microplacas. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva de calibración para estimar la concentración de las muestras.

5.9. Análisis de *Western blot*

Para determinar la expresión del gen del receptor μ -opioide de rata se utilizó la técnica de *Western blot*. En esta técnica las proteínas son primeramente separadas de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida. Los geles se hicieron siguiendo el siguiente protocolo:

Gel Resolutivo (10%)	Fórmula para 2 geles
H ₂ O dd	7,86 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8	5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	6,7 mL
SDS 10%	200 μ L
Persulfato de Amonio 8,3%	240 μ L
TEMED	10 μ L
Total	20 mL

Gel Concentrador (5%)	2 geles
H ₂ O dd	5,125 mL
Tris HCl 1M pH 6,8	0,95 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1,25 mL
SDS 10%	75 µL
Persulfato de Amonio 8,3%	90 µL
TEMED	15 µL
Total	7,5 mL

Los geles se cargaron con 5 a 30 µg de proteínas totales. Las muestras de proteína se prepararon mezclando 3 partes de lisado con 1 parte de tampón Laemmli 4X y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Como estándar de peso molecular se cargaron 6 µL de PageRuler Prestained Protein Ladder. La electroforesis se realizó en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell BIO-RAD conteniendo Tampón de Corrida (Tris HCl 25mM pH=8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1%) a 70 V durante la migración en el gel concentrador y a 100 V durante la migración en el gel resolutivo.

Una vez resueltas las proteínas de acuerdo a su peso molecular, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó formando un “sándwich” formado por el gel en contacto con la membrana de nitrocelulosa (PROTRAN 0,45 µm, Whatman) y estos cubiertos por dos láminas de papel filtro, una a cada lado y estos cubiertos por dos esponjas de fibra, una por cada lado. La transferencia se llevó a cabo durante 90 minutos a 100 V en tampón de transferencia (Tris HCl 25 mM pH=8,3, glicina 190 mM, metanol 20% [v/v]). Posteriormente se verificó la correcta transferencia de las proteínas mediante tinción con una solución de rojo Ponceau-S (Ponceau S 0.1% [p/v], ácido acético 5% [v/v]). La tinción con rojo Ponceau-S se retiró mediante 2 lavados con agua destilada y 1 con TBST (Tris base 0,02M, NaCl 0,2M, pH=7,6, Tween20 0,1% [v/v]). El

bloqueo de los sitios inespecíficos de unión en la membrana se realizó mediante su incubación en una solución de leche descremada al 5% [p/v] en TBST durante 1 hora. Luego del bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBST durante toda la noche y con agitación suave a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti OPMR (1:5000) y anti beta actina (1:5000). Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 4 veces con TBST durante 15 minutos cada lavado. Luego la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. El anticuerpo secundario usado fue goat anti-mouse IgG-HRP (1:14.000). Luego se realizaron 5 lavados con TBST de 15 minutos cada uno con agitación leve y posteriormente la reacción inmunológica se reveló mediante un sustrato quimioluminiscente. La señal lumiscente se detectó y registró en un equipo de fotodocumentación. El procesamiento de las imágenes y la integración de las bandas inmunoreactivas se realizó con el software Image-J. El análisis densitométrico de las señales se llevó a cabo luego de estandarizar con respecto al control de carga β -actina. Para ello se dividió la intensidad de la señal correspondiente a OPMRr por la señal correspondiente a β -actina.

5.10. Generación de vectores lentivirales

Para la generación de los vectores lentivirales se transfectaron células HEK-293 T con los siguientes plásmidos: pVSV-G que codifica para las proteínas de envoltura de los vectores lentivirales, p Δ 8,9 que codifica para proteínas estructurales de los lentivirus y el plásmido vector que contiene el gen de interés. Para ello los plásmidos se purificaron mediante el *Kit* E.Z.N.A. Endo-Free Plasmid DNA Midi Kit y se mezclaron en un tubo en una proporción 1:2:3 respectivamente, para un total de 12 μ g de plásmido por placa y se agregó NaCl 150 mM suficiente para 500 μ L. En otro microtubo estéril se mezclaron 144 μ L de PEI 7,5 mM

con 356 μL de NaCl 150 mM y ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se juntaron en un solo microtubo y se incubó la mezcla de 1 mL de PEI-plásmidos durante 10 minutos a temperatura ambiente. La transfección se llevó a cabo en placas de cultivo celular estériles de 10 cm a 90 % de confluencia. Para ello, se cambió el medio de cultivo de las células por 5 mL de medio DMEM sin suero fetal bovino y sin antibiótico y se agregó la mezcla PEI-plásmidos con micropipeta, gota a gota procurando cubrir toda la placa. Posteriormente se incubó durante 6 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 , para luego agregar 9 mL de medio DMEM completo suplementado al 10% con SFB. Luego la placa se incubó durante 48 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 . Pasado ese tiempo, se traspasó el medio de cultivo a un tubo de polipropileno de 50 mL, se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se filtró a través de un filtro 0,45 μm de tamaño de poro a un nuevo tubo de polipropileno con el objetivo de eliminar todo rastro de partículas celulares. A continuación, se le agregó polietilenglicol-4000 40% estéril hasta una concentración final de 5 % [p/v] y NaCl (5M) hasta una concentración final de 150 mM. El tubo se incubó con agitación leve a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 4.000 x g durante 20 minutos a 4°C, se retiró el tubo con cuidado de no agitar el *pellet* formado y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante se resuspendió en 80 μL de PBS 1X estéril para luego hacer alícuotas de 10 μL en microtubos de 0,2 mL y se almacenaron a -80°C. La cuantificación de los lentivirus se llevó a cabo mediante la infección de ~200.000 células HEK-293T con diluciones seriadas de virus (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} μL y un control sin virus). Después de 48 horas, las células se retiraron de la placa usando tripsina, se contaron las células del control sin infectar y el resto se fijaron en tampón PBS con formaldehído al 1% y la fluorescencia de GFP se analizó mediante citometría de flujo. Para efectos de la cuantificación se seleccionó la dilución que generó no más de un 20% de fluorescencia verde, lo que se relaciona a la infección de una partícula viral por célula. Posteriormente se analizaron los datos según la siguiente fórmula:

$$\text{Titulo} \left(\frac{TU}{mL} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ células del día 1} * \frac{\% \text{ GFP positivas}}{100}}{\text{Volumen del superndante en mL}}$$

La concentración o título viral se expresó en términos de unidades de transducción por mL (TU/mL).

5.11. Generación de líneas celulares codificantes de los shRNAs

Para generar líneas celulares que expresen establemente los shRNAs se realizaron infecciones de células HEK-293T con los virus codificantes de cada shRNA y que además otorgaban resistencia a puromicina. La selección se realizó cultivando las células en medio con puromicina al que las células no infectadas no tienen resistencia. Inicialmente se sembraron 100.000 células HEK-293T en 6 pocillos de 2 cm de diámetro. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por 750 μ L de medio completo con polibreno (8 μ g/mL). En 6 microtubos de 1,5 mL se agregaron 750 μ L de medio con polibreno, se agregaron las siguientes cantidades de stock viral: 0 μ L, 1 μ L, 2,5 μ L, 5 μ L, 10 μ L y 25 μ L y se homogenizó bien con micropipeta. Posteriormente, se agregaron cada una de las diluciones virales a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 24 horas en una atmósfera de 5% CO₂. Al día siguiente se les cambió el medio por 1,5 mL de medio completo sin polibreno y se incubaron en las mismas condiciones anteriores durante 48 horas. Transcurrido ese periodo de tiempo se cambió el medio por 1,5 mL medio de cultivo completo con puromicina (3 μ g/mL) y se incubó en las mismas condiciones anteriores durante 72 horas. Pasados 3 días, se cambió el medio por otros 1,5 mL de medio de cultivo con puromicina (3 μ g/mL) y se incubó durante 72 horas en las mismas condiciones. Luego de esas 72 horas se cambió el medio por 1,5 mL de medio completo con puromicina (4 μ g/mL) y se incubó en las mismas condiciones durante 72 horas. Pasado ese tiempo, se cambió medio por medio completo con puromicina

(4 µg/mL) y se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Al día siguiente se seleccionó la menor infección viral que presentara células viables, se retiró el medio y se agregó 200 µL de tripsina y se incubó a 37°C durante 3 minutos en una atmósfera de 5% CO₂. Luego se agregó 800 µL de medio completo con puromicina 3 µg/mL. En 4 placas de 35 mm de diámetro con 1,5 mL de medio con puromicina 3 µg/mL se sembraron 50, 25, 10 o 1 µL de la suspensión celular en cada uno de 5 pocillos y se incubaron en las condiciones ya señaladas durante 4 días hasta observar crecimiento celular. Posteriormente se seleccionó el cultivo generado a partir de la mayor dilución para su expansión.

6. RESULTADOS

6.1. Clonación del cDNA del receptor μ -opioide en el vector pHIV-GFP

Para lograr expresar el gen de OPMRr en células en cultivo, inicialmente se tuvo que generar un plásmido que contuviese el cDNA de OPMRr y que permitiese su expresión en células eucariontes, para ello se clonó el gen del OPMRr en el plásmido del pHIV-GFP.

El plásmido pHIV-GFP es un lentiviral de expresión en eucariontes, en el que la expresión del transgén está controlada por un promotor EF1 α . A continuación del transgén y separado por un Internal Ribosome Entry Site (IRES) se encuentra el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP). También posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina para su amplificación en procariontes (Figura 6).

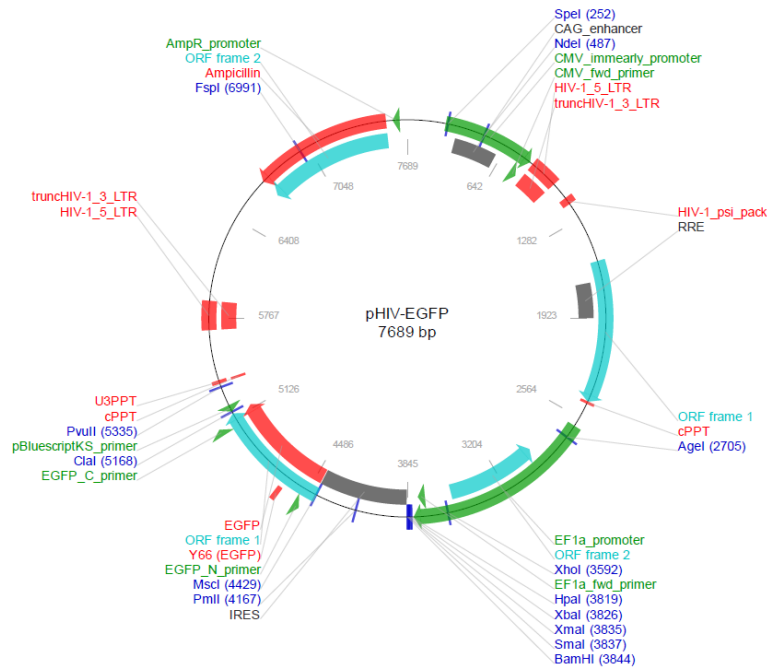


Figura 6. Esquema gráfico del vector lentiviral pHIV-GFP. El promotor EF1 α permite la transcripción de los genes insertos en el sitio de multiclonamiento que posee sitios de corte para 5 enzimas de restricción, un sitio interno de reconocimiento del ribosoma (IRES, en inglés), el gen de la proteína EGFP y el gen que le otorga resistencia a ampicilina.

Inicialmente se amplificaron ambos plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP mediante la transformación de bacterias según lo indicado en 5.1, posterior cultivo y purificación del plásmido mediante lisis alcalina según lo indicado en 5.2. En la Figura 7 se observa que ambos plásmidos se purificaron correctamente, encontrándose que la migración de pHIV-GFP fue menor a la de pTransporte-OPMRr debido a la diferencia de tamaño de ambos plásmidos (7.689 pb Y 3.944 pb, respectivamente).

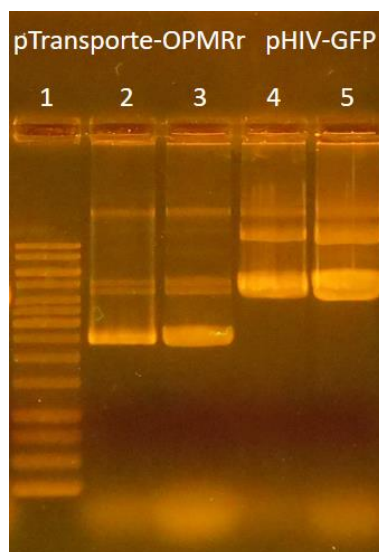


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP purificados mediante lisis alcalina. *El carril 1 contiene 6 μ L de estándar de peso molecular O'GeneRuler. Los carriles 2 y 3 contienen 2 μ L y 4 μ L de stock de pTransporte-OPMRr y los carriles 4 y 5 contienen 2 μ L y 4 μ L de stock de pHIV-GFP. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 0,8% a 100 V durante una hora. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV.*

Una vez confirmada la purificación de los plásmidos, se procedió a digerirlos con enzimas de restricción que permitieran liberar el cDNA de OPMRr desde pTransporte-OPMRr y clonarlo en el vector lentiviral pHIV-GFP. Los sitios de corte y las enzimas de restricción necesarias se determinaron utilizando el programa Serial Cloner. El resultado de este análisis (Figura 8), mostró que el corte de pHIV-GFP con HpaI en el sitio 3.817 y con XbaI

en la posición 3.826 permitía abrir el vector pHIV-GFP para insertar en esta posición el cDNA de OPMRr liberado desde pTransporte-OPMRr mediante cortes con las enzimas HpaI (posición 409) y XbaI (posición 1.664)

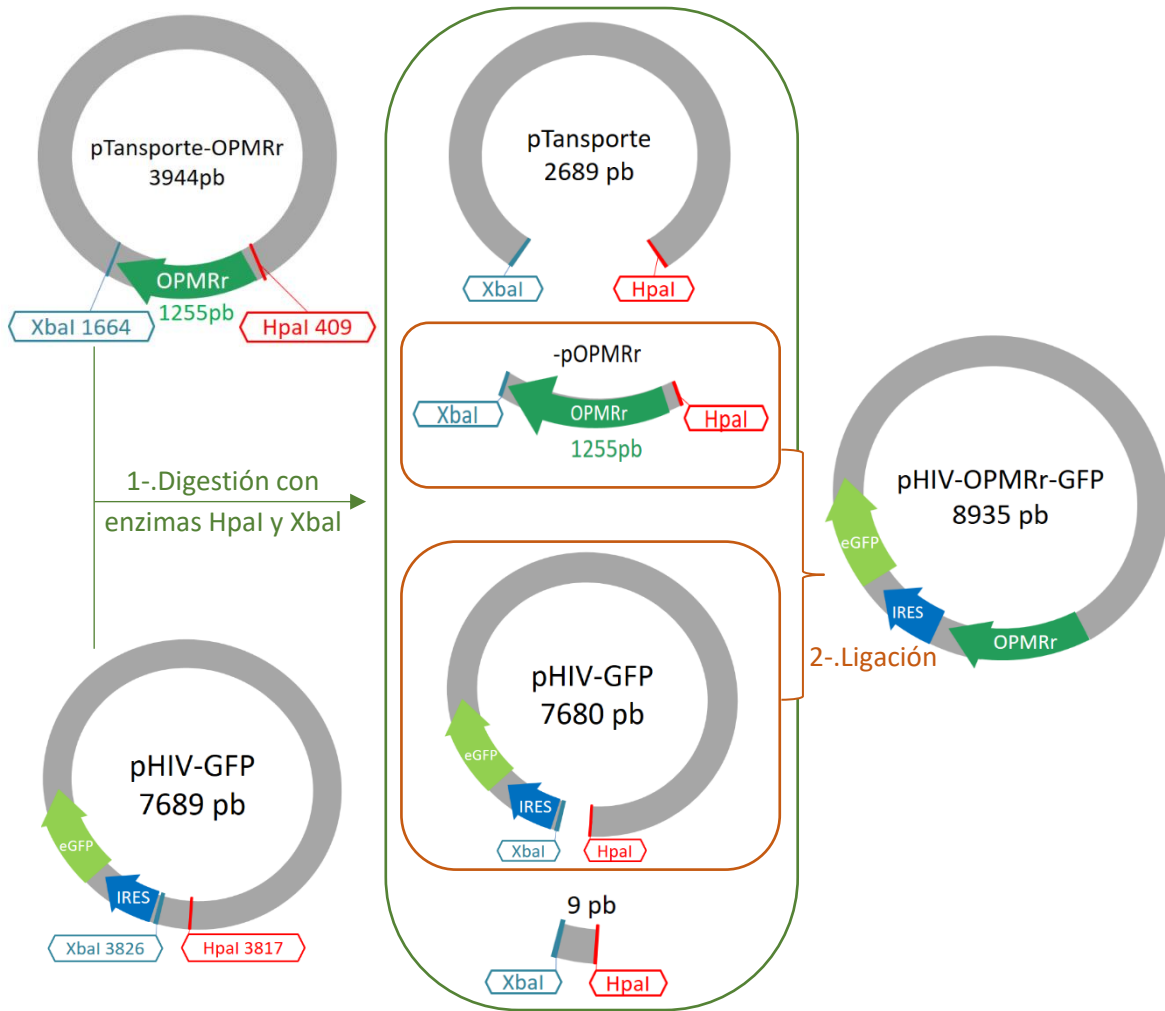


Figura 8. Esquema de clonación para obtener pHIV-OPMRr-GFP. Para cada plásmido se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción HpaI y XbaI. 1-. Indica la doble digestión con HpaI y XbaI de ambos plásmidos y los fragmentos resultantes de dicha digestión. 2-. Indica la ligación teórica del fragmento vector (7.680 pb) y el fragmento inserto (1.255 pb).

La Figura 9 muestra los resultados de la doble digestión de los plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP con las enzimas XbaI y HpaI. La digestión de pTransporte-OPMRr

resultó en la generación de dos fragmentos (carriles 1, 2 y 3), de 2.689 pb y de 1.255 pb, este último es el fragmento que contiene el gen OPMRr, también llamado inserto. En el caso de pHIV-GFP, la digestión con las enzimas debía generar dos fragmentos de 7.680 pb (vector) y de 9 pb (ver Figura 8). En la electroforesis (carriles 5, 6 y 7, Figura 9) se observa sólo la banda de 7.680 pb ya que la banda de 9 pb es demasiado pequeña para ser observada en este tipo de geles. La concentración relativa del inserto y del vector se determinó mediante una comparación visual frente al estándar de peso molecular en el cual la masa absoluta de cada banda es conocida y declarada por el fabricante. En el caso del inserto (banda de 1.255 pb, carril 1*), se estimó de masa equivalente a la banda del estándar de peso molecular de 2.500 pb, la cual contiene 25 µg. Para el vector (banda de 7.680 pb, carril 5*), se estimó de masa equivalente a la banda del estándar de peso molecular de 6.000pb, la cual contiene 70 µg de DNA.

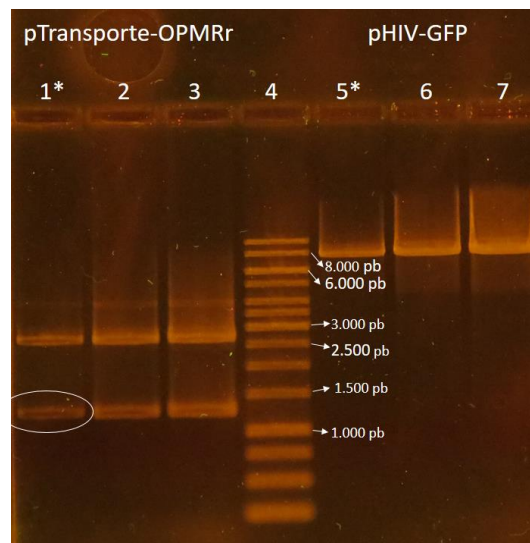


Figura 9. Digestión de los plásmidos pTransporte-OPMRr y pHIV-GFP con HpaI y XbaI.

Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la carga de 1, 2 y 4 µL de la digestión con HpaI y XbaI del plásmido pTransporte-OPMRr. El carril 4 corresponde a la carga de 5 µL del estándar de peso molecular O'GeneRuler. Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a la carga de 1, 2 y 4 µL de la doble digestión con HpaI y XbaI del plásmido pHIV-GFP. La electroforesis del gel se realizó a 100 V durante 1 hora.

La ligación entre el vector y el inserto se realizó en proporciones molares de 1:1, 1:5 y 1:10, según lo indicado en el punto 5.2. De las reacciones de ligación se utilizaron aproximadamente 10 μ L para transformar bacterias *E. coli* DH5 α competentes, las que fueron sembradas en placas de LB/agar suplementado con ampicilina. De las colonias obtenidas, se seleccionaron 42 de ellas para realizar un análisis rápido de colonias según lo indicado en el punto 5.4.3.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis rápido de las 42 colonias seleccionadas. En las fotografías se observa para cada colonia la presencia de los tres tipos de ácidos nucleicos presentes en la bacteria. En la parte superior se observa una banda de poca migración (elevado peso molecular) que corresponde al DNA genómico bacteriano. En la zona de migración intermedia es posible observar las señales correspondientes a los plásmidos portados por las bacterias. Finalmente, en la zona de mayor migración (bajo peso molecular) se observa las señales de los distintos tipos de RNA bacteriano. Para determinar si alguna de las colonias seleccionadas correspondía al clon buscado (pHIV-OPMRr-GFP, 8.935 pb). Se comparó la migración de cada plásmido en relación a la migración del plásmido pHIV-GFP. Cualquier plásmido que presentara en la zona intermedia una migración menor a pHIV-GFP podía ser un candidato del clon buscado, ya que el peso de pHIV-OPMR-GFP es mayor a pHIV-GFP (8.935 vs 7.689 pb). Los resultados mostraron que las colonias 9 (Figura 10B), 30, 34 y 37 (Figura 10D) presentaron plásmidos con un tamaño aparente superior a pHIV-GFP, lo que los hizo candidatos a contener el clon buscado.

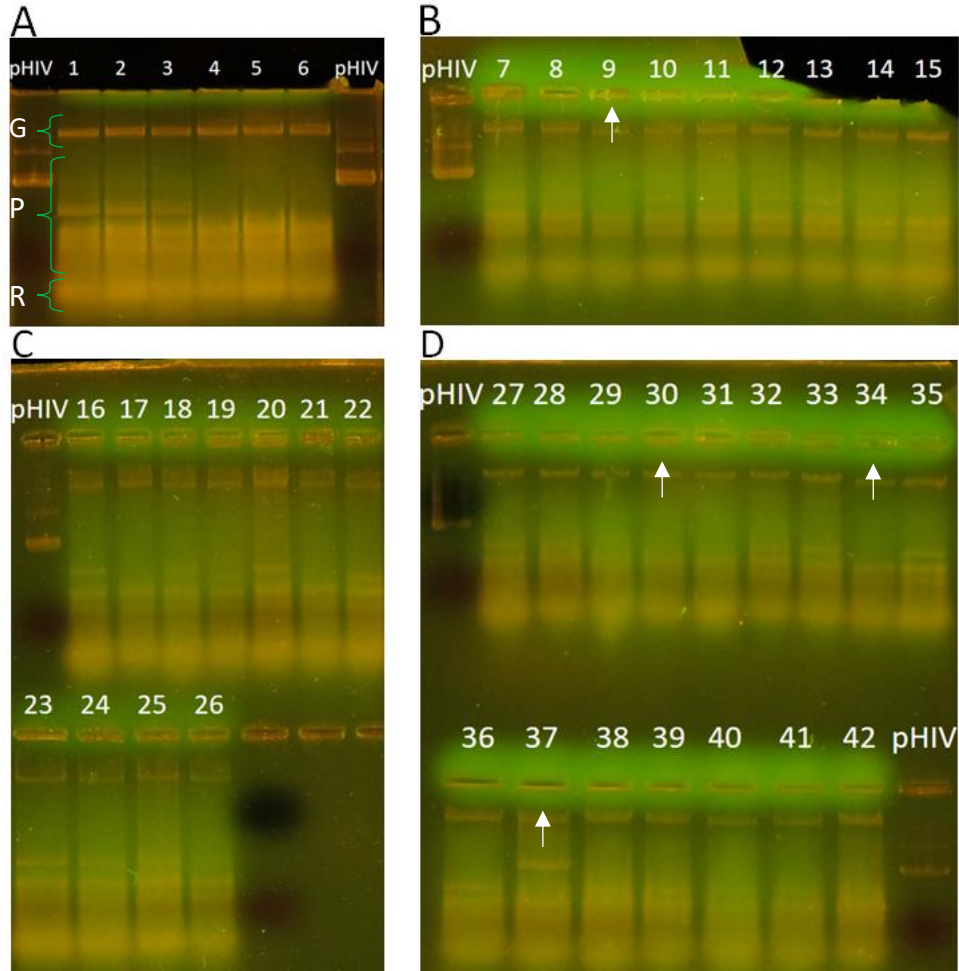


Figura 10. Análisis rápido de colonias transformadas con la ligación para obtener pHIV-OPMRr-GFP. Se observan geles de agarosa al 0,8% cargados con la lisis rápida de las 42 colonias seleccionadas como potenciales portadores de pHIV-OPMRr-GFP comparadas con el vector vacío pHIV-GFP. Se cargaron 25 μ L de la fase acuosa de cada lisis rápida y 1 μ L de stock de pHIV-GFP. La electroforesis se realizó a 100 V durante 45 minutos. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV. Las flechas blancas indican los clones potenciales de contener pHIV-OPMRr-GFP. En la figura A se indica, con llave verde, las 3 zonas de bandas de DNA genómico bacteriano arriba (G), plásmidos portados por la bacteria en zona media (P) y abajo distintos tipos de RNA bacteriano (R).

Las bacterias conteniendo los clones candidatos 9, 30, 34 y 37 fueron cultivadas y los plásmidos correspondientes purificados mediante la técnica de lisis alcalina para una mejor visualización del tamaño molecular aparente. En la Figura 11 se pueden observar los resultados de esta comparación. El análisis de los clones 9 y 37 (Figura 11A) mostraron que sólo el clon 9 presentaba un tamaño mayor a pHIV-GFP (carril 4), mientras que para el clon 37 los resultados no fueron conclusivos ya que su tamaño se apreció muy similar a pHIV-GFP (Figura 11A). El análisis de los clones 30 y 34 (Figura 11B) mostró que ninguno de estos clones tenía un tamaño mayor a pHIV-GFP. Por esta razón el trabajo se continuó con los clones 9 y 37, mientras que los clones 30 y 34 fueron descartados.

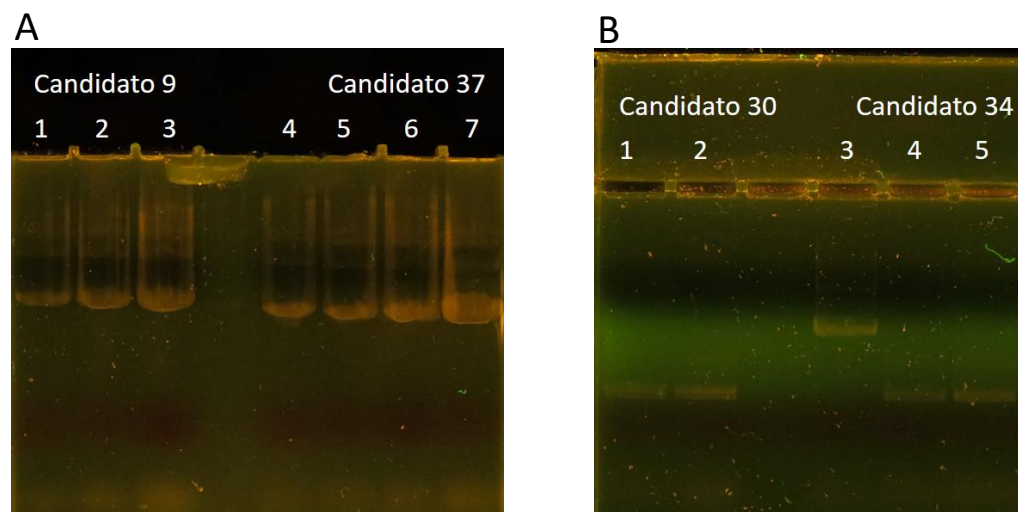


Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa de los plásmidos candidatos 9, 30, 34 y 37 purificados mediante lisis alcalina. Se observa geles de agarosa 0,8% con la electroforesis de las lisis alcalinas de los clones candidatos 9, 37, 30 y 34. **11A)** Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la carga de 1, 2 y 4 μL del clon candidato 9. El carril 4 corresponde a la carga de 1 μL de stock de pHIV-GFP. Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a la carga de 1, 2 y 4 μL del clon candidato 37. **11B)** Los carriles 1 y 2 corresponden a la carga de 1 y 2 μL del clon candidato 30. El carril 3 corresponde a la carga de 1 μL de stock de pHIV-GFP. Los carriles 4 y 5 corresponden a la carga 1 y 2 μL del clon candidato 34. La electroforesis se realizó a 100 V durante una hora. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV.

A continuación, los clones candidatos 9 y 37 fueron analizados en su estructura mediante análisis de restricción para determinar si correspondían al plásmido buscado pHIV-OPMRr-GFP. La primera enzima seleccionada fue Agel la cual teóricamente debería cortar en un sitio a pHIV-OPMRr-GFP, obteniéndose un fragmento de 8.935 pb el cual sería claramente distinguible del fragmento que generaría la digestión con Agel del vector pHIV-GFP (7.689 pb). En la Figura se puede apreciar que el fragmento obtenido de la digestión del clon 9 con Agel (carriles 1, 2) tiene un tamaño superior a la banda de 8.000 pb del estándar de peso molecular (carril 3), por lo que podría corresponder al clon buscado que debía generar un fragmento de 8.935 pb. Por el contrario, la digestión con Agel del clon candidato 37 (carriles 6 y 7) resultó en un fragmento de tamaño menor a 8.000 pb y similar al fragmento de 7.689 pb generado por la digestión de pHIV-GFP con Agel. Es probable que el clon 37 hubiera correspondido a una re-circularización del plásmido pHIV-GFP y no se siguió estudiando este clon.

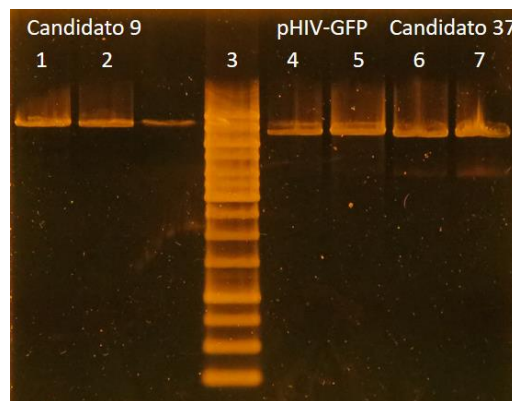


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión Agel de los clones 9 y 37 versus pHIV-GFP. Los carriles 1 y 2 corresponden a la carga de 1 y 0,5 μ L de la digestión del candidato 9 con Agel. El carril 3 corresponde a la carga de 5 μ L de estándar de peso molecular O'GeneRuler. Los carriles 4 y 5 corresponden a la carga de 1 y 0,5 μ L de la digestión del pHIV-GFP con Agel. Los carriles 6 y 7 corresponden a la carga de 1 y 0,5 μ L de la digestión del candidato 37 con Agel. La electroforesis se realizó a 100 V durante una hora. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV.

La segunda enzima seleccionada fue NheI, ya que esta corta exclusivamente en el inserto, por lo que el patrón de digestión de la secuencia AgeI/NheI del candidato correcto debería generar 2 bandas, una de 7.799 pb y otra de 1.136 pb (Figura 13), mientras que el vector pHIV-GFP no debería sufrir cortes adicionales con esta enzima manteniendo una sola banda de 7.689 pb (Figura 13).

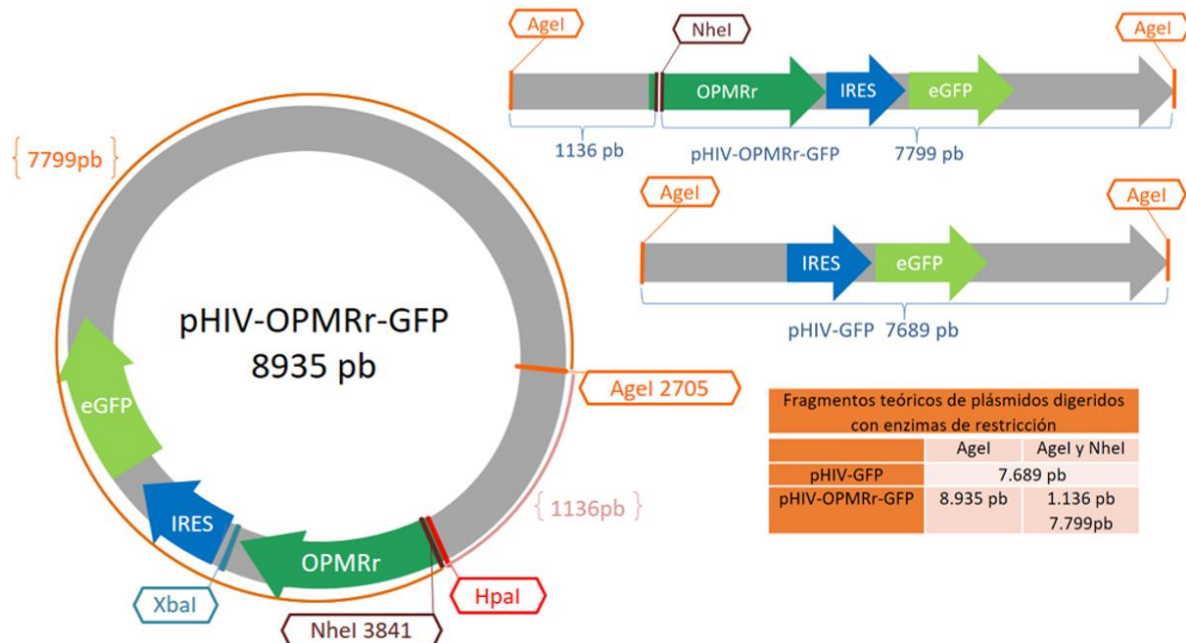


Figura 13. Esquema teórico del patrón de restricción al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con las enzimas AgeI y NheI. Se muestra la configuración circular del plásmido pHIV-OPMRr-GFP y las posiciones de corte de AgeI en el vector y NheI dentro del inserto. También se ilustra la configuración lineal y los tamaños de los fragmentos obtenidos al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con AgeI y NheI.

Los resultados de la digestión con AgeI y NheI del clon candidato 9 resultó en la generación de 2 bandas, una con tamaño entre 6.000 y 8.000 pb y la otra con un tamaño entre 1.000 y 1.500 pb (Figura 14, carriles 1 y 2). Estos fragmentos serían correspondientes a los esperados para la digestión de pHIV-OPMRr-GFP con AgeI y NheI que eran de 7.799 y

1.136 pb respectivamente (Figura 13). Por otra parte, la digestión de pHIV-GFP con *AgeI* y *NheI* (Figura 9, carriles 4 y 5) generó una banda entre 6.000 y 8.000 pb que fue correspondiente a la banda teórica de 7.689 pb esperada para este vector.

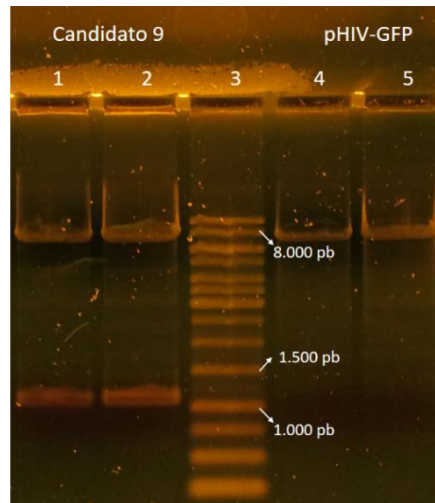


Figura 14. Electroforesis en geles de agarosa de la digestión de los plásmidos candidato 9 y pHIV-GFP con las enzimas *AgeI* y *NheI*. Los carriles 1 y 2 corresponden a la carga de 2 y 4 μL de la digestión del candidato 9 con *AgeI* y *NheI*. El carril 3 corresponde a la carga de 5 μL de estándar de peso molecular O'GeneRuler. Los carriles 4 y 5 corresponden a la carga de 2 y 4 μL de la digestión de pHIV-GFP con *AgeI* y *NheI*. La electroforesis se realizó a 100 V durante una hora. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV.

Para lograr una caracterización más detallada del clon candidato para pHIV-OPMRr-GFP (clon 9), se agregó la enzima *EcoRV* como un tercer elemento de confirmación. Esta enzima presenta tres sitios de corte en pHIV-OPMRr-GFP, dos en el vector (posiciones 6.653 y 6.732) y otro en el inserto OPMRr (posición 3.835). Como se muestra en la Figura 15, el patrón de digestión de pHIV-OPMRr-GFP con la secuencia *AgeI/NheI/EcoRV* resulta en la generación teórica de 5 fragmentos de 4.908, 2.812, 1.130, 79 y 6 pb respectivamente. Por

otra parte, el patrón de digestión de pHIV-GFP con la secuencia Agel/NheI/EcoRV resulta en la generación teórica de 3 fragmentos de 4.908, 2.702 y 79 pb respectivamente.

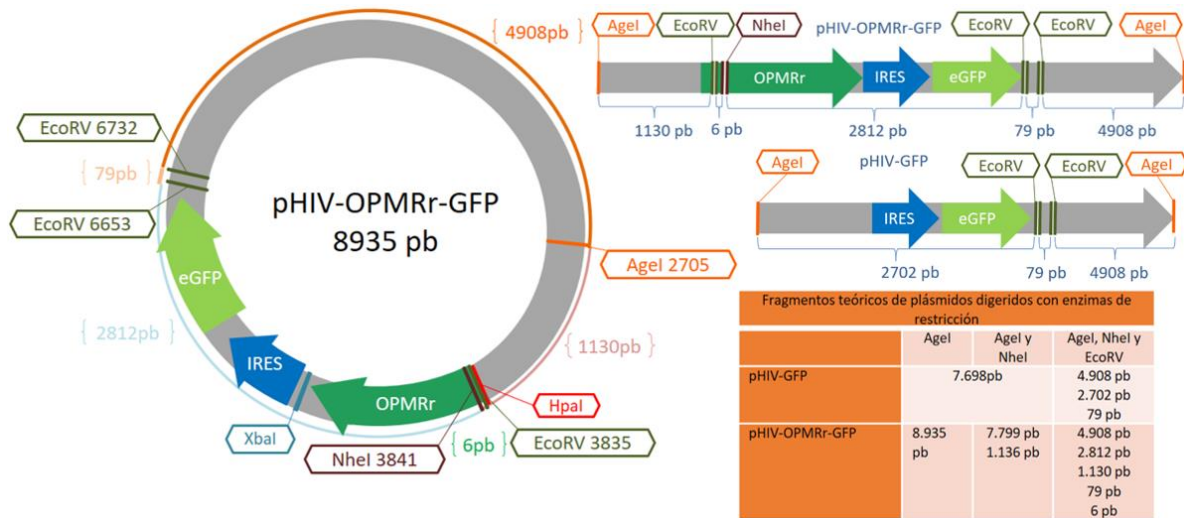


Figura 15. Esquema teórico del patrón de restricción al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con las enzimas Agel, NheI y EcoRV. Se muestra la configuración circular del plásmido pHIV-OPMRr-GFP y las posiciones de corte de Agel en el vector, de NheI dentro del inserto y los tres sitios de corte de EcoRV, dos en el vector y uno dentro del inserto. También se ilustra la configuración lineal y los tamaños de los fragmentos obtenidos al digerir pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP con Agel, NheI y EcoRV.

Los resultados de la digestión con Agel/NheI/EcoRV del clon candidato 9 resultó en la generación de 4 bandas, una con tamaño cercano a 5.000 pb, la segunda con un tamaño entre 2.500 y 3.000 pb, la tercera con un tamaño muy cercano a 1.000 pb y la cuarta con un tamaño menor a 250 pb (Figura 16, carriles 1 y 2). Estos fragmentos serían correspondientes a los esperados para la digestión de pHIV-OPMRr-GFP con Agel/NheI/EcoRV que eran de 4.908, 2.812, 1.130, 79 y 6 pb respectivamente (ver Figura 15). La ausencia de la banda de 6 pb se debe a que este tamaño de fragmentos se encuentra fuera del rango de sensibilidad de esta técnica. Por otra parte, la digestión de

pHIV-GFP con *AgeI*/*NheI*/*EcoRV* (Figura 16, carriles 4 y 5) generó 3 bandas, la primera con un tamaño cercano a 5.000 pb, la segunda con un tamaño entre 2.500 y 3.000 pb y la tercera con un tamaño menor a 250 pb. Estos fragmentos serían correspondientes a los esperados para la digestión de pHIV-GFP con *AgeI*/*NheI*/*EcoRV* que eran de 4.908, 2.702 y 79 pb respectivamente (ver Figura 15).

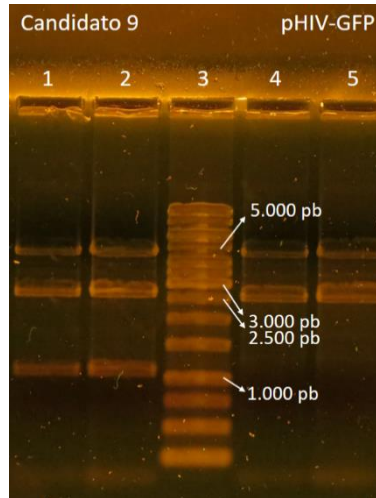


Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa de la digestión de los plásmidos candidato 9 y pHIV-GFP con las enzimas *AgeI*, *NheI* y *EcoRV*. Los carriles 1 y 2 corresponden a la carga de 2 y 4 μL de la digestión del clon candidato 9 con *AgeI*, *NheI* y *EcoRV*. El carril 3 corresponde a la carga de 5 μL de estándar de peso molecular O'GeneRuler. Los carriles 4 y 5 corresponden a la carga de 2 y 4 μL de la digestión de pHIV-GFP con *AgeI*, *NheI* y *EcoRV*. La electroforesis se realizó a 100 V durante una hora. La tinción se realizó incubando el gel en una solución de GelRed protegido de la luz durante 10 minutos y el revelado en un transiluminador UV.

En conclusión, los resultados de la caracterización de los clones candidatos indicaron que la estructura del plásmido proveniente de la colonia 9 era equivalente a la estructura teórica de pHIV-OPMRr-GFP, por lo tanto, el clon 9 pasó a llamarse pHIV-OPMRr-GFP. Se generó un respaldo de esta colonia tal como se describe en el punto 5.4.5.

6.2. Análisis de la expresión de OPMRr en células HEK-293T.

La expresión del cDNA de OPMRr presente en el plásmido pHIV-OPMRr-GFP se estudió mediante la transfección de células HEK-293T y su posterior análisis mediante la técnica de *Western blot*. Para ello, el plásmido pHIV-OPMRr-GFP fue amplificado en *E. coli* y purificado en un estado libre de endotoxinas, debido a que las endotoxinas bacterianas pueden generar efectos tóxicos en las células eucariontes. Luego, se transfectó células HEK-293T con distintas concentraciones de los plásmidos pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP como control, usando PEI como agente de transfección. Las transfecciones se realizaron según lo indicado en 5.6 y se realizaron usando cantidades crecientes (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg) de los plásmidos pHIV-OPMRr-GFP y pHIV-GFP para evaluar las condiciones óptimas de transfección. Los resultados mostraron que a medida que aumentaba la cantidad de plásmido transfectado también aumentaba la intensidad de la fluorescencia generada por el reportero GFP tanto para pHIV-GFP como para pHIV-OPMRr-GFP. En la Figura 17 se pueden observar microfotografías de células HEK-293T transfectadas con pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP que muestran que la intensidad de la fluorescencia es en general proporcional a la cantidad de plásmido utilizado. También se observó que la fluorescencia generada por la misma cantidad de plásmido fue mayor para pHIV-GFP. Este efecto puede deberse a un menor número de copias del plásmido pHIV-OPMRr-GFP en la misma masa comparada con pHIV-GFP y también por el efecto del tamaño del plásmido en la eficiencia de transfección, encontrándose que mientras mayor es el tamaño del plásmido menor es la eficiencia de transfección.

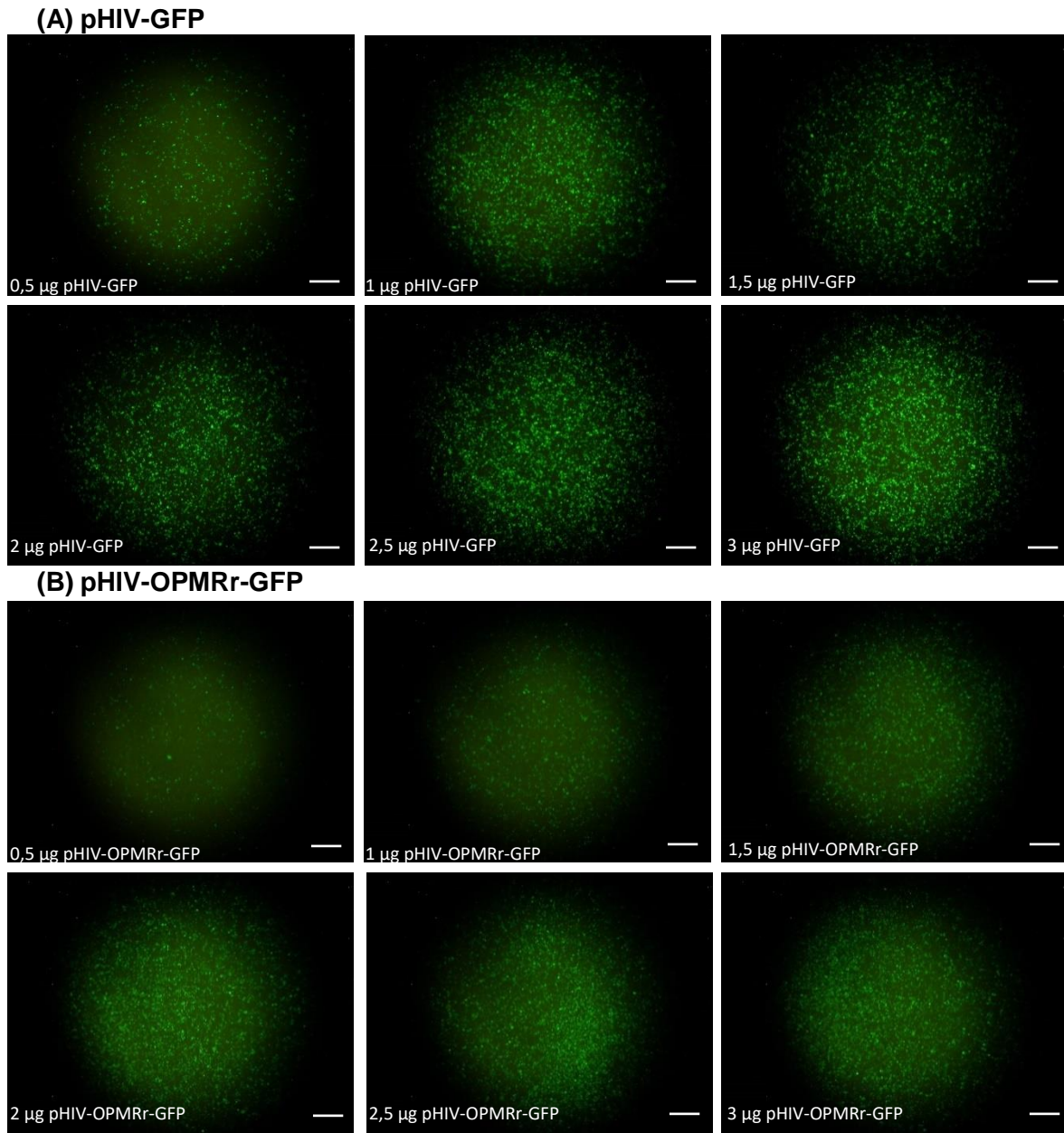


Figura 17. Microfotografías de fluorescencia de células transfectadas con cantidades crecientes de pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP. En el panel superior (A) se observan células HEK-293T después de 48 horas de transfección con 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg de pHIV-GFP. En el panel inferior (B) se observan las células HEK-293T después de 48 horas de transfección con 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg de pHIV-OPMRr-GFP. La barra blanca representa 1000 µm.

Las células transfectadas fueron lisadas según el procedimiento indicado en el punto 5.7, usando PBS como vehículo en vez de RIPA, y aplicando ultrasonido para su ruptura. El contenido de proteínas totales del lisado clarificado se determinó mediante el kit BCA según lo indicado en 5.8. A continuación las proteínas (20 μg) se resolvieron de acuerdo a su peso molecular en un gel de poliacrilamida, luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión, se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti OPMRr y luego con un anticuerpo secundario anti mouse acoplado a HRP. El revelado se realizó agregando un sustrato para la HRP quimio luminiscente.

Los resultados del *Western blot* (Figura 18) muestran que efectivamente el plásmido pHIV-OPMRr-GFP expresa el gen de OPMRr ya que sólo se detectó una banda inmunorreactiva en los cultivos transfectados con pHIV-OPMRr-GFP y no en los cultivos transfectados con pHIV-GFP. Se puede observar también que existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de plásmido utilizado en la transfección y la intensidad de la banda correspondiente a OPMRr. También se puede observar que para las transfecciones con 2; 2,5 y 3 μg de pHIV-OPMRr-GFP no se observa un aumento proporcional de la señal en relación a la cantidad de plásmido utilizado en la transfección. También se encontró que una carga de 20 μg de proteínas totales era suficiente para detectar OPMRr usando el anticuerpo monoclonal a una dilución de 1:5000. Considerando la intensidad de la señal, se decidió que en las siguientes transfecciones se usarían 2 μg de plásmido por placa.

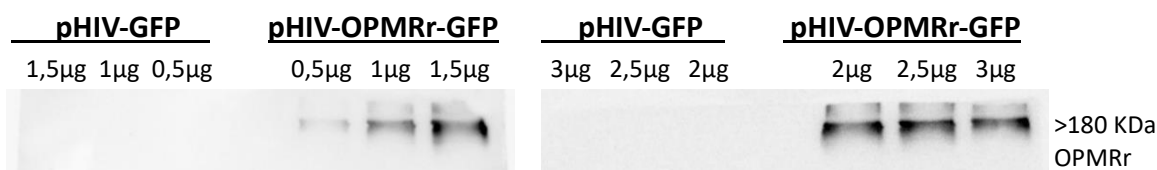


Figura 18. Análisis de *Western blot* de lisado de células HEK-293T transfectadas con pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP. En cada carril se cargaron 20 µg de proteínas totales. En el panel A se muestran los resultados para los lisados de células transfectadas con 0,5; 1 y 1,5 µg de pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP respectivamente. En el panel B se muestran los resultados para los lisados de células transfectadas con 2; 2,5 y 3 µg de pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP respectivamente. El anticuerpo primario anti OPMRr se utilizó a una dilución de 1:5000 y el anticuerpo secundario de cabra anti ratón se utilizó a una dilución de 1:14.0000.

6.3. Silenciamiento de la expresión *in vitro* de OPMRr por shRNAs anti OPMRr.

Se adquirieron de la compañía OriGene (Rockville, EE.UU.) cuatro secuencias de RNA de interferencia tipo horquilla (shRNA) desarrollados para inhibir la expresión del receptor µ-opioide de rata. El fabricante indica que al menos 1 de los 4 shRNAs debería inhibir la expresión del gen de interés en al menos un 70%. Sin embargo, es el usuario quien debe determinar cuál(es) de los 4 shRNAs presentan el mejor silenciamiento. Los shRNAs utilizados en esta tesis, venían codificados en el vector lentiviral pGFP-C-shLenti (8,7Kb) que posee un promotor U6 de la polimerasa III que permite la transcripción del shRNA en células eucariontes, posee además un gen de resistencia a puomicina y la proteína fluorescente verde GFP bajo el control del promotor CMV. La resistencia en bacterias viene dada por un gen de resistencia a cloranfenicol (Figura 19). El casete de expresión del shRNA consiste en una secuencia de 29 pb específica para el gen de interés, un loop de 7pb, y otra secuencia de 29 pb complementaria. Una secuencia de terminación (TTTTTT)

se encuentra inmediatamente después de la secuencia complementaria y permite el término de la transcripción por la Pol III (Figura 19).

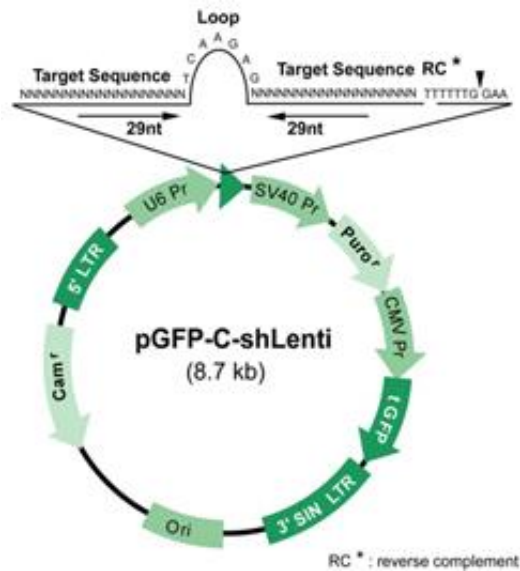


Figura 19. Esquema del vector lentiviral pGFP-C-shLenti. Se observan las distintas características del plásmido pGFP-C-shLenti. El promotor U6 que permite la transcripción de los shRNA (target sequence). La imagen muestra cómo se forman las horquillas de RNA luego de su transcripción. El plásmido también posee un gen de resistencia a puromicina y un promotor CMV dirige la transcripción de la proteína GFP.

En la Tabla 1 se pueden observar la secuencia y la posición de reconocimiento en el plásmido pHIV-OPMRr-GFP de cada uno de los shRNAs. Además se incluyó una secuencia “scramble” (“desordenada”) que codifica para un shRNA que no posee blanco conocido en el transcriptoma de rata, lo que permite ser utilizado como control de efectos inespecíficos.

Plásmido shRNA	Secuencia blanco (5' --> 3')	Posición en el pHIV-OPMRr-GFP
pshRNA-A	TTCGGAACCATCCTCTGCAAGATCGTGAT	4261- 4289
pshRNA-B	TGGCAACCAGTCCGATCCATGCGGTCTGA	3966 - 3994
pshRNA-C	TCAACCTTGCTCTGGCAGACGCCTTAGCG	4181 - 4209
pshRNA-D	ATGATCTTACGACTCAAGAGCGTTCGCAT	4621 - 4649
pshRNA-SCR	GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT	--

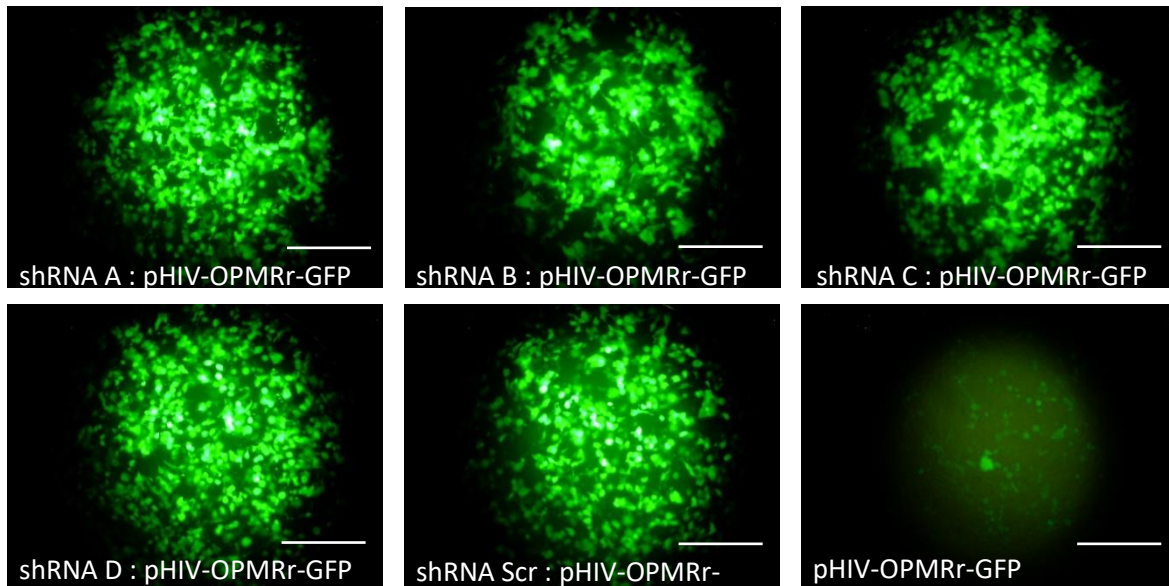
Tabla 1. Secuencias de los 5 shRNAs y su sitio de reconocimiento en pHIV-OPMRr-GFP. Se observan las 5 secuencias de los shRNAs (A, B, C, D y Scramble) adquiridos comercialmente y escritas en orientación 5' a 3'. También se indica el sitio de reconocimiento en pHIV-OPMRr-GFP.

Para evaluar la capacidad de las 4 secuencias de shRNAs de inhibir la expresión del gen de OPMRr primariamente en células en cultivo, se co-transfectaron células HEK-293T con una mezcla de uno de los plásmidos codificantes de los shRNAs junto con el plásmido pHIV-OPMRr-GFP en distintas proporciones en peso. Se realizaron co-transfecciones en las siguientes proporciones de pshRNA : pHIV-OPMRr-GFP expresadas en términos de μg de plásmido respectivamente: 1:1; 1,25:0,75; 1,5:0,5 y 1,75 : 0,25.

La eficiencia de transfección de las mezclas indicadas se evaluó mediante microscopía de fluorescencia del reportero GFP. En la Figura 20 se muestran microfotografías de las co-transfecciones de los 5 plásmidos codificantes de shRNA (incluyendo scramble) junto a pHIV-OPMRr-GFP en proporciones de 1:1 (Figura 20A) y de 1,5:0,5 (Figura 20B).

Los resultados mostraron que para todas las co-transfecciones se detectó positivamente la presencia de fluorescencia verde, lo que indicó una co-transfección exitosa y con una eficiencia de transfección cercana al 70%. Sin embargo, al transfectar el plásmido pHIV-OPMRr-GFP sin la presencia del plásmido shRNA se encontró que la eficiencia de transducción era muy baja y cercana al 20%. Esto se debería al hecho de que la cantidad de PEI está optimizada para una transfección conteniendo 2 μg de plásmido total.

Co-transfección 1ug:1ug de shRNA:pHIV-OPMRr-GFP



Co-transfección 1,5ug:0,5ug de shRNA:pHIV-OPMRr-GFP

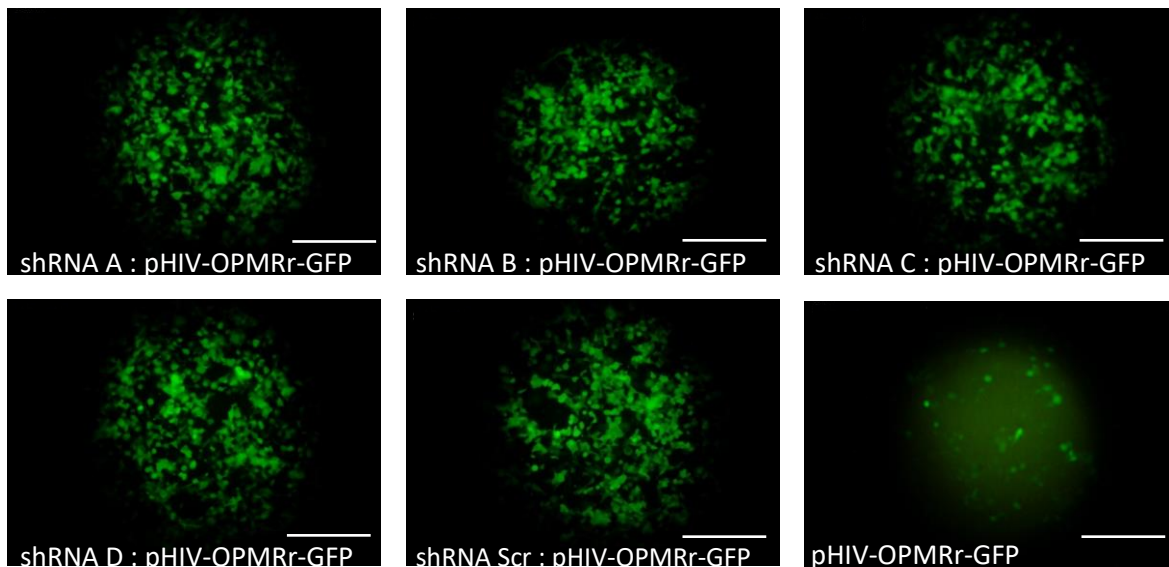


Figura 20. Microfografías de fluorescencia de células HEK-293T co-transfectadas con los pshRNAs y pHIV-OPMRr-GFP. En el panel superior se observan células HEK-293T después de 48 horas de la co-transfección con los plásmidos pshRNA A, B, C, D o Scramble : pHIV-OPMRr-GFP en proporción 1:1. También se muestra la transfección con 1 μ g de pHIV-OPMRr-GFP como control positivo. En el panel inferior se observan células HEK-293 T después de 48 horas de la co-transfección con los plásmidos pshRNA A, B, C, D o Scramble : pHIV-OPMRr-GFP en proporción 1,5:0,5. También se muestra la transfección con 0,5 μ g de pHIV-OPMRr-GFP como control positivo. La barra blanca representa 500 μ m.

La eficiencia de silenciamiento de los shRNAs A, B, C, D y el control scramble fue determinada mediante un análisis de Western blot de las células transfectadas. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal anti OPMRr y como control de carga de las proteínas se determinó la abundancia de β -actina usando un anticuerpo monoclonal para esta proteína.

Los resultados (Figura 21) mostraron que los shRNAs A y D fueron los más efectivos en silenciar la expresión de OPMR, encontrándose que el nivel de silenciamiento fue cercano al 70% respecto del control transfectado con el shRNA scramble, lo que fue visible especialmente en las proporciones 1:1 y 0,25:1,75. Los shRNAs B y C no presentaron una disminución evidente de la expresión de OPMRr respecto del control scramble en ninguna de las distintas proporciones estudiadas. De forma coincidente a los resultados obtenidos en el análisis de fluorescencia, los cultivos transfectados solamente con 1 y 0,5 μ g de pHIV-OPMRr-GFP presentaron bajos niveles de expresión de OPMRr. El análisis de los niveles del control de carga β -actina mostraron que la carga de proteínas para cada ensayo de Western blot fue homogénea, de lo cual se puede concluir que las diferencias en los niveles de expresión de OPMRr se deben a una reducción en su expresión génica y no a diferencias en la carga de proteínas totales.

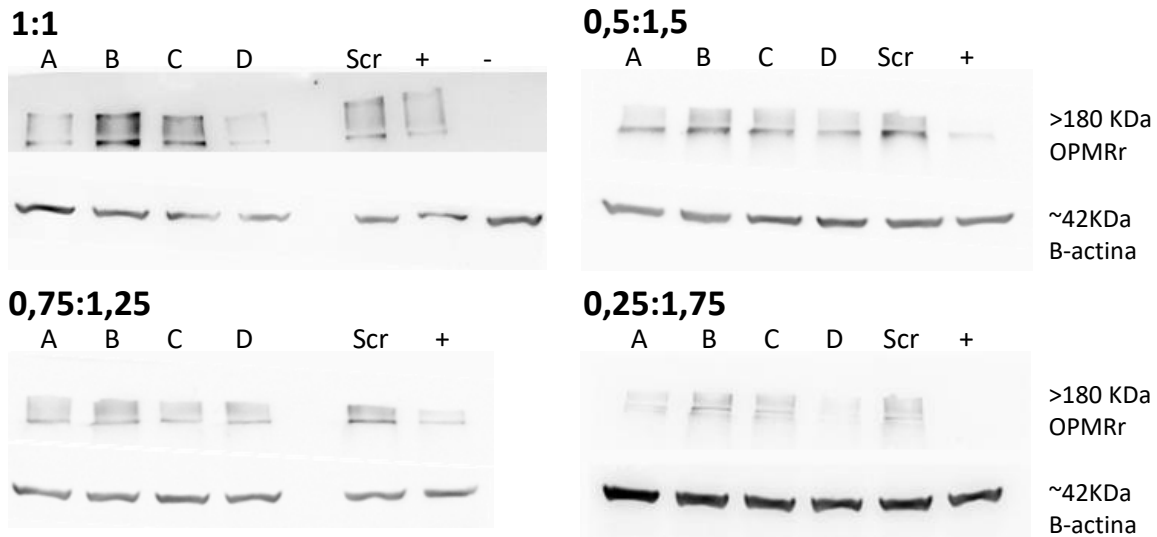


Figura 21. Análisis de Western blot de la expresión de OPMRr en lisado de células HEK-293T co-transfectadas con los plásmidos pshRNAs y pHIV-OPMRr-GFP. *En el panel superior izquierdo se muestran los resultados para los lisados de células co-transfectadas con una relación 1:1 μg de pHIV-OPMRr-GFP:pshRNA, donde A, B, C, D y Scramble (Scr) representan el pshRNA utilizado en conjunto con pHIV-OPMRr-GFP, (+) representa la transfección solamente con la cantidad de pHIV-OPMRr-GFP respectiva, (-) representa un control de células no transfectadas. En el panel inferior izquierdo se muestran los resultados para los lisados de células co-transfectadas con una relación 0,75:1.25 μg de pHIV-OPMRr-GFP: pshRNA respectivamente. En el panel superior derecho se muestran los resultados para los lisados de células co-transfectadas con un relación 0,5:1.5 μg de pHIV-OPMRr-GFP:pshRNA respectivamente. En el panel inferior derecho se muestran los resultados para los lisados de células co-transfectadas con un relación 0,25:1.75 μg de pHIV-OPMRr-GFP:pshRNA respectivamente. Los anticuerpos primarios anti OPMRr y anti β -actina se utilizaron a una dilución de 1:5000 y el anticuerpo secundario de cabra anti ratón se utilizó a una dilución de 1:14.000 para ambos anticuerpos primarios.*

Se realizó un análisis densitométrico de los niveles de expresión de OPMRr en los ensayos de Western blot utilizando el programa Image-J. Los Western blot analizados fueron los correspondientes a las co-transfecciones de 1:1 y 0,25:1,75 (Figura 22).

El análisis de estas co-transfecciones mostró que la inhibición en la expresión de OPMRr inducida por los distintos shRNA fue de 83,7 y 63% para el shRNA-A, y 80,6 y 69,1% para el shRNA-D. Los shRNAs B y C no presentaron ningún tipo de inhibición de la expresión de OPMRr. Estos valores se calcularon utilizando como referencia (0% de cambio) el shRNA scramble.

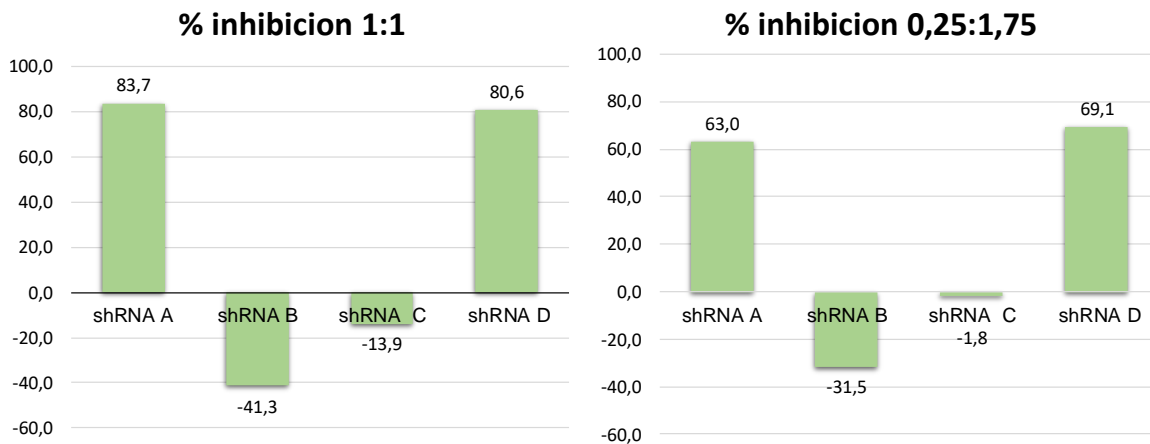


Figura 22. Análisis densitométrico de la inhibición de la expresión de OPMRr inducida por los shRNAs. Los gráficos muestran el análisis densitométrico de los Western blot de las co-transfecciones de pHIV-OPMRr-GFP y pshRNA en relación 1:1 y 0,25:1,75. Se observa que el porcentaje de inhibición de los shRNA A y D fue en promedio de 73% y 75%, respectivamente. Los porcentajes de inhibición negativos reflejan un aumento de la señal respecto del efecto ejercido por el control scramble.

6.4. Generación de líneas celulares con expresión estable de los shRNAs

Los resultados de inhibición de la expresión de OPMRr obtenidos en los experimentos de co-transfección mostraron que los shRNAs A y D presentaron los mayores niveles de inhibición de la expresión de OPMRr. Sin embargo, estos resultados pueden verse afectados por algunas variables como por ejemplo: i) la abundancia relativa entre el mensajero para el OPMRr y el shRNA, ii) la eficiencia de transducción de los plásmidos, iii) el estado fisiológico de las células, iii) la diferencia de potencia entre los promotores utilizados para la expresión de OPMRr y los shRNAs.

Para maximizar las opciones de observar la capacidad inhibitoria de los shRNAs, se procedió a generar líneas celulares que expresaran establemente cada uno de los 5 shRNAs estudiados. De esta forma, se genera un exceso artificial de los shRNAs al interior de las células, de forma que al ser transfectadas con el plásmido que expresa OPMRr, se puede determinar con mayor exactitud la eficiencia de inhibición relativa entre los distintos shRNAs.

Para lograr generar estas líneas estables, las células HEK-293T deben ser infectadas con un vector lentiviral codificante de cada shRNA, los cuales tienen la capacidad de integrarse al genoma celular. Luego, y mediante selección con el antibiótico puromicina, que solo es resistido por aquellas células que incorporaron el genoma del lentivirus-shRNA, se logra obtener una población de células que expresan establemente el correspondiente shRNA y que son identificables por presentar expresión del reportero GFP (Figura 23).

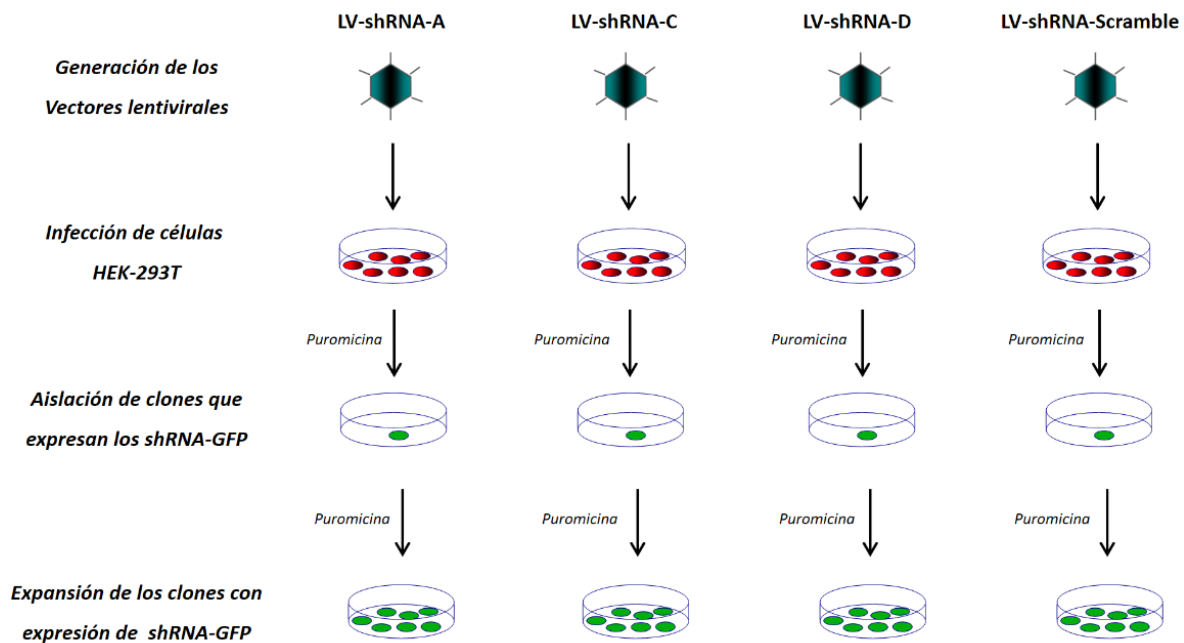


Figura 23: Esquema teórico de la generación de líneas celulares HEK-293T que expresan establemente los shRNA. Se muestra de forma descendente la secuencia de: i) generación de los Lentivirus, ii) infección de las células HEK-293T, iii) selección de clones mediante cultivo en medio con puromicina y iv) expansión de la línea celular.

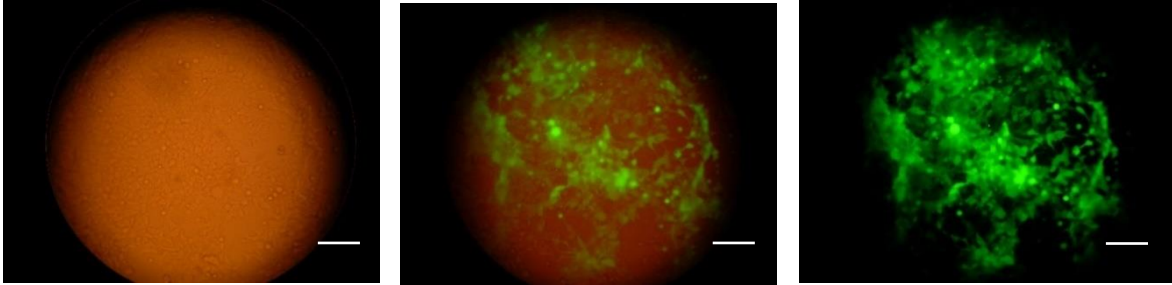
Los vectores lentivirales fueron generados en células HEK-293T según los procedimientos indicados en el punto 5.10 y el título de los vectores lentivirales fueron determinados mediante citometría de flujo y expresados como unidades de transferencia por mL (TU/mL). Los resultados que se pueden observar en la Tabla 2 muestran a modo de ejemplo los títulos de los vectores lentivirales codificantes para el shRNA A y scramble. Los resultados mostraron que los títulos virales obtenidos se encontraron en el rango de 1×10^9 TU/mL, los que son equivalentes a los títulos de preparaciones comerciales de vectores lentivirales.

LV	Titulo	
LV-shRNA A	1.5x10 ⁹	unidades transducentes / mL
LV-shRNA SCR	7.5x10 ⁸	unidades transducentes / mL

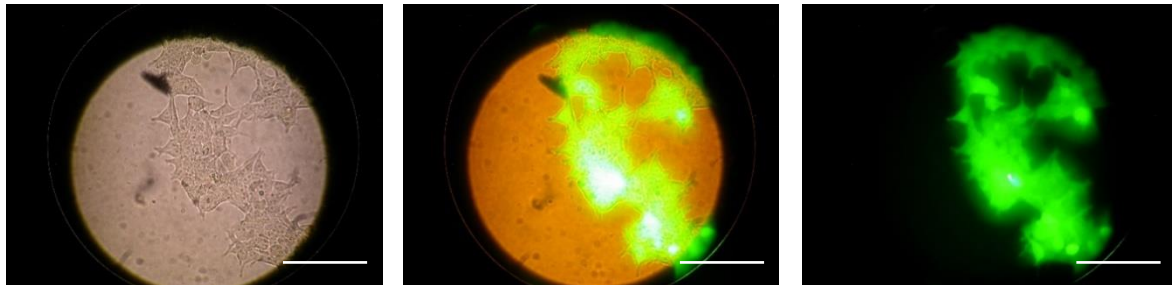
Tabla 2. Cuantificación de los vectores lentivirales. *Se muestran los títulos de los vectores lentivirales (LV) que codifican para los shRNA A y Scramble (Scr) expresados en unidades de transducción/mL (TU/mL) y determinados mediante citometría de flujo.*

Se generaron líneas celulares que expresaban establemente los shRNAs A, C, D y *Scramble*. No se generó la línea codificante del shRNA B en base a la baja capacidad de inhibición que mostró el shRNA B en los experimentos de co-transfección. La generación de las líneas celulares que expresan establemente los shRNA A, C, D y *Scramble* fue exitosa, ya que al cultivar las células en medio completo con puromicina 3 µg/mL (antibiótico eucarionte) estas fueron capaces de crecer y expandirse sin problemas. Adicionalmente todas las células expresaban la proteína reportera fluorescente verde GFP, lo que en conjunto son señales de que efectivamente la secuencia del vector lentiviral, que incluye las secuencias codificantes del shRNA, el reportero GFP y el gen de resistencia a puromicina, se integraron efectivamente al genoma celular y se expresaron estable y persistentemente en células HEK-293T como se muestra en la Figura 24.

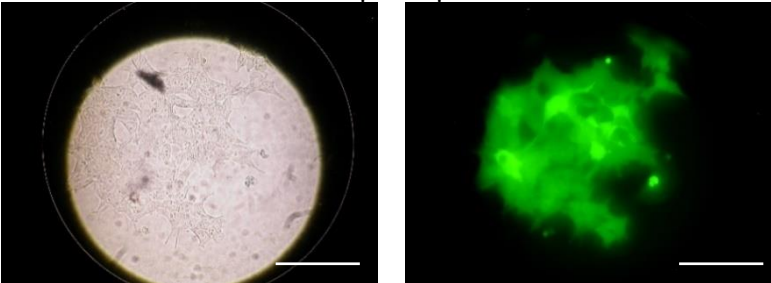
1-. Línea celular HEC-293T que expresan shRNA A



2-. Línea celular HEC-293T que expresan shRNA C



3-. Línea celular HEC-293T que expresan shRNA D



4-. Línea celular HEC-293T que expresan shRNA Scramble (Scr)

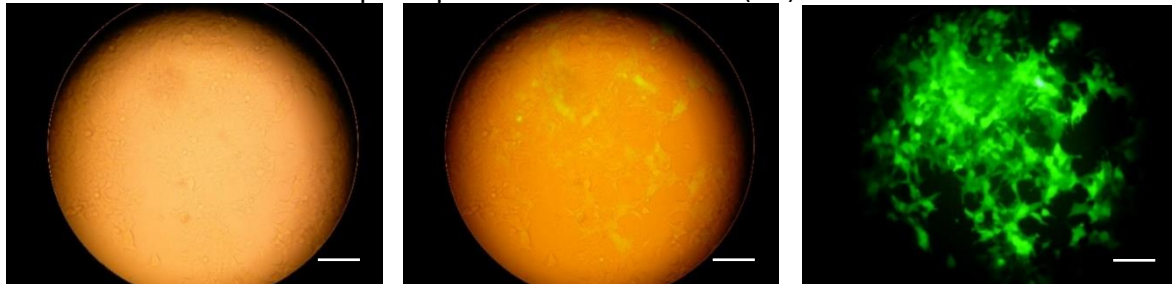


Figura 24. Microfotografías de fluorescencia de células HEK-293T que expresan establemente los distintos shRNAs. Se muestra una secuencia de microfotografías de células HEK-293T que expresan establemente uno de los shRNAs seleccionados expuestas a solo luz blanca, mixta y solo fluorescencia respectivamente. Figura 24A. Resultados para el shRNA-A. Figura 24B. Resultados para el shRNA-C. Figura 24C. Resultados para el shRNA-D. Figura 24D. Resultados para el shRNA-Scramble. La barra blanca representa 250 μ m.

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue inhibir la expresión *in vitro* de OPMRr mediante el uso de shRNAs. Para ello se clonó, mediante técnicas de biología molecular, el gen que codifica para OPMRr en un vector de expresión, lo que permitió la expresión de este gen en células HEK293-T, la cual fue confirmada mediante estudios de *Western blot*. En una segunda etapa, mediante experimentos de co-transfección en células HEK-293T se estudió la capacidad de inhibición de la expresión de OPMRr de cuatro secuencias de shRNA dirigidas al RNA mensajero de OPMRr. Los resultados mostraron que dos secuencias de shRNA, denominadas A y D, presentaron el mayor nivel de inhibición de la expresión de OPMRr cercano a 70% medido mediante *Western blot*. En experimentos adicionales, se generaron líneas celulares que expresan establemente las secuencias de estos shRNAs, lo que permitirá en experimentos futuros confirmar los datos obtenidos en los experimentos de co-transfección.

A continuación, se discutirán la relevancia, proyecciones y las limitaciones de los principales resultados obtenidos en esta Tesis.

7.1. Generación del plásmido que expresa el receptor μ -opioide de rata en eucariontes

Mediante técnicas de biología molecular fue posible clonar OPMRr en el plásmido lentiviral pHIV-GFP, generando el plásmido pHIV-OPMRr-GFP. Para lograr determinar la integridad, concentración y tamaño molecular de los plásmidos purificados se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8% comparándolos con un estándar de peso molecular que comprendía tamaños moleculares entre 250 pb a 10.000 pb. Sin embargo, la técnica de

electroforesis en geles de agarosa no fue lo suficientemente sensible para detectar bandas de tamaño molecular inferiores a 50 pb, lo que se pudo demostrar en la última digestión de pHIV-OPMRr-GFP con EcoRV (Figura 16), en donde se esperaba un fragmento de 6 pb y el cual no se pudo observar en el gel de agarosa. Esto se debe a que las bandas de menor peso molecular tienen proporcionalmente una menor capacidad de intercalar el cromóforo, en este caso GelRed, lo que incide en una menor fluorescencia de ellas y en una detección más dificultosa. Por otro lado, las moléculas de un tamaño mayor a 8.000 pb presentan una resolución muy baja debido a que la concentración de agarosa utilizada en los geles (0.8%) es óptima para resolver tamaños moleculares entre 1.000 y 4.000 pb. Para mejorar la resolución de moléculas de mayor tamaño se debe disminuir el porcentaje de agarosa en los geles. Sin embargo, la reducción del porcentaje de agarosa hace que los geles sean más débiles y propensos a romperse.

7.2. Expresión del gen del receptor μ -opioide de rata en células HEK-293T.

Se logró expresar el gen de OPMRr en células HEK-293T en cultivo mediante su transfección con el plásmido pHIV-OPMRr-GFP utilizando como agente de transfección el polímero catiónico PEI. A pesar de que las microfotografías de la Figura 17 mostraron una transfección exitosa de los plásmidos pHIV-GFP y pHIV-OPMRr-GFP, se pudo observar una diferencia en la intensidad de la fluorescencia entre las células transfectadas con pHIV-GFP, la que fue más intensa y nítida, en comparación con pHIV-OPMRr-GFP, que tuvo una fluorescencia menor y más difusa, diferencia que se mantiene a medida que aumenta la cantidad de plásmido. Esta diferencia en la intensidad de fluorescencia puede deberse a que existe una menor cantidad de moléculas del plásmido pHIV-OPMRr-GFP en la misma masa, ya que este es más pesado que el pHIV-GFP. También es posible que esta diferencia

pueda deberse a que la maquinaria celular, en el caso del pHIV-OPMRr-GFP, está siendo utilizada tanto para generar GFP como el receptor μ -opioide, que en comparación al pHIV-GFP éste solo tiene que generar GFP. Es importante señalar que para lograr una transfección exitosa con PEI es menester determinar la relación de PEI/plásmido óptima para la transfección, la que no se realizó en éste trabajo, ya que fue facilitada por una investigación anterior del Dr. Mario Rivera-Meza la cual determinó que correspondía a 12 μ L de PEI (7,5 mM) / 2 μ g de plásmido (Rivera-Meza y cols., 2014). La importancia de la relación PEI/plásmido se evidencia en el análisis de Western blot, en donde se observa los cambios en la intensidad de la señal correspondiente a OPMRr al utilizar distintas cantidades de pHIV-OPMRr-GFP (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 μ g) en la transfección y utilizando la misma cantidad de PEI (Figura 18). En ellos se puede apreciar un aumento proporcional en la intensidad de la señal de receptor hasta los 2 μ g de plásmido. A partir de ahí las transfecciones con 2; 2,5 y 3 μ g de plásmido arrojaron una señal de intensidad muy similar, lo que indicaría una saturación en la capacidad de entregar el plásmido al modificarse la proporción óptima PEI/plásmido.

Es importante a su vez señalar que en el *Western blot* de la figura 18 se observa que la banda atribuible a OPMRr es específica para este receptor, ya que no se observa esta señal en células HEK-293T transfectadas con el vector control pHIV-GFP. Sin embargo, se encontró que el peso molecular aparente de OPMRr era mayor al esperado de acuerdo al número de aminoácidos que componen a la proteína y que corresponden a 398 aminoácidos (NCBI Reference Sequence: NP_001291669.1; Zastawny y cols., 1994), equivalente a un peso molecular teórico de 43,6 KDa. Los resultados del análisis de *Western blot* muestran que en los estudios de transfección de células HEK-293T el peso molecular obtenido fue cercano a 180 KDa. Estas diferencias podrían explicarse a que OPMRr puede sufrir modificaciones post-traduccionales (glicosilación principalmente) las

que pueden afectar el peso molecular de la proteína (Pasternak y cols., 2013). Otro fenómeno que puede explicar estas diferencias es la existencia de dímeros de receptor, los cuales han sido reportados para OPMR dando origen a complejos receptor-receptor de elevado peso molecular (Al-Hasani y cols., 2011; Kasai y cols., 2011; Law y cols., 2000; Lee y Ho, 2013). Otro factor que puede influir en este fenómeno, es que los niveles de proteína OPMRr generado por la transfección son mucho mayores a los niveles fisiológicos, lo que puede promover la formación de dímeros de receptor o incluso asociaciones de mayor estequiometría, interacciones que pueden verse favorecidas por el dominio hidrofóbico que presentan los receptores transmembrana como el OPMRr. En literatura también se encuentran referencias que muestran una elevada variabilidad en el peso molecular de OPMR dependiendo del anticuerpo utilizado y de la técnica de lisis utilizada para obtener los homogenizados (Janes, 2016).

7.3. Determinación de la inhibición de OPMRr mediante shRNAs

Considerando que la expresión de OPMR se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y en otros sistemas fisiológicos como el aparato digestivo, el uso de antagonistas químicos sistémicos de OPMR podría generar interacciones en otros sistemas y añadir variables en posteriores estudios *in vivo*. También es importante destacar que la selectividad de los antagonistas para OPMR (ejm., naltrexona) no es total y dependiendo de la dosis utilizada también puede interactuar con otras isoformas del receptor opioide como el receptor kappa y delta. Una de las principales ventajas de utilizar RNA de interferencia es la especificidad que estos poseen y la posibilidad de ser dirigidos en zonas discretas del cerebro, como por ejemplo en el VTA, al ser incorporados a vectores lentivirales.

La inhibición de la expresión del gen de OPMRr por los shRNA se estudió mediante la co-transfección de células HEK-293T con los plásmidos pHIV-OPMRr-GFP y los distintos shRNAs y la posterior evaluación de la expresión de OPMRr mediante Western blot. Los shRNAs que demostraron inhibir la expresión del gen de OPMRr en células en cultivo correspondieron a las secuencias A y D, las que inhibieron un entre un 85-60% la expresión de OPMRr con respecto a las co-transfectadas con el control scramble. Las secuencias B y C no mostraron una inhibición en la expresión OPMRr. Esta inhibición de la expresión de OPMRr solo se pudo apreciar en las co-transfecciones de 1:1 y 0,25:1,75 μ g de pHIV-OPMRr-GFP:pshRNA. Esta falta de inhibición en las otras proporciones de co-transfección puede deberse a variabilidades del proceso de co-transfección. Esta variabilidad podría ser solucionada al utilizar líneas celulares que expresen establemente los distintos shRNAs, de esta forma solo se deberían realizar transfecciones con un único plásmido, el pHIV-OPMRr-GFP.

Otra observación que se encontró en los experimentos de co-transfección (Figura 21) fueron los bajos niveles de OPMRr que presentaron las células transfectadas solamente con el plásmido pHIV-OPMRr-GFP y que correspondían a un control positivo de los experimentos. Esta baja expresión se puede explicar a que en estas transfecciones se utilizaron relaciones plásmido:PEI fuera de los rangos óptimos, tal como se discutió en 7.2.

Una de las consideraciones que se debían de tener en cuenta antes de comenzar el trabajo era la posibilidad de que ninguna de las 4 secuencias de shRNAs generase una inhibición relevante. Esto es debido a que las secuencias de los shRNAs, luego de ser procesadas por la maquinaria celular resultan en una hebra simple de RNA que se une por complementariedad a la secuencia blanco del RNA mensajero. Sin embargo, el acceso a las distintas zonas del RNA mensajero no es equivalente, ya que el RNA es capaz de formar estructuras espaciales complejas que podrían no dejar lo suficientemente expuestas las

zonas de reconocimiento de los shRNAs (Shao y cols., 2007). Un análisis *in silico* del plegamiento teórico del mRNA de OPMRRr (sitio web del RNA Institute, College of Arts and Sciences, Universidad Estatal de Nueva York) mostró que el shRNA que mostró el mayor nivel de inhibición (shRNA-A, entre 85-60% de inhibición) reconoce una secuencia del mRNA de OPMRr que se encuentra en un extremo de la molécula plegada, lo cual podría favorecer su acceso y por lo tanto su actividad inhibitoria (Figura 25).

Por otro lado, los shRNAs B y C que mostraron baja capacidad inhibitoria presentan sitios de reconocimiento en la porción central de la molécula, lo que podría resultar en impedimentos estéricos que explicarían su baja capacidad de inhibición. Sin embargo, el shRNA D que presentó una elevada capacidad inhibitoria (entre 80 y 60%) también reconoce una zona central del mRNA plegado. Esta discrepancia se podría explicar por el hecho de que la representación del mRNA plegado es del tipo planar 2D y no considera la estructura tridimensional de la molécula que también puede afectar el acceso de los shRNA. A pesar de que existen estas herramientas bioinformáticas que permiten predecir el plegamiento de las moléculas de mRNA, estas no son aún lo suficientemente precisas para no requerir la validación biológica de la actividad inhibitoria de los shRNAs, que fue el objetivo principal de este estudio.

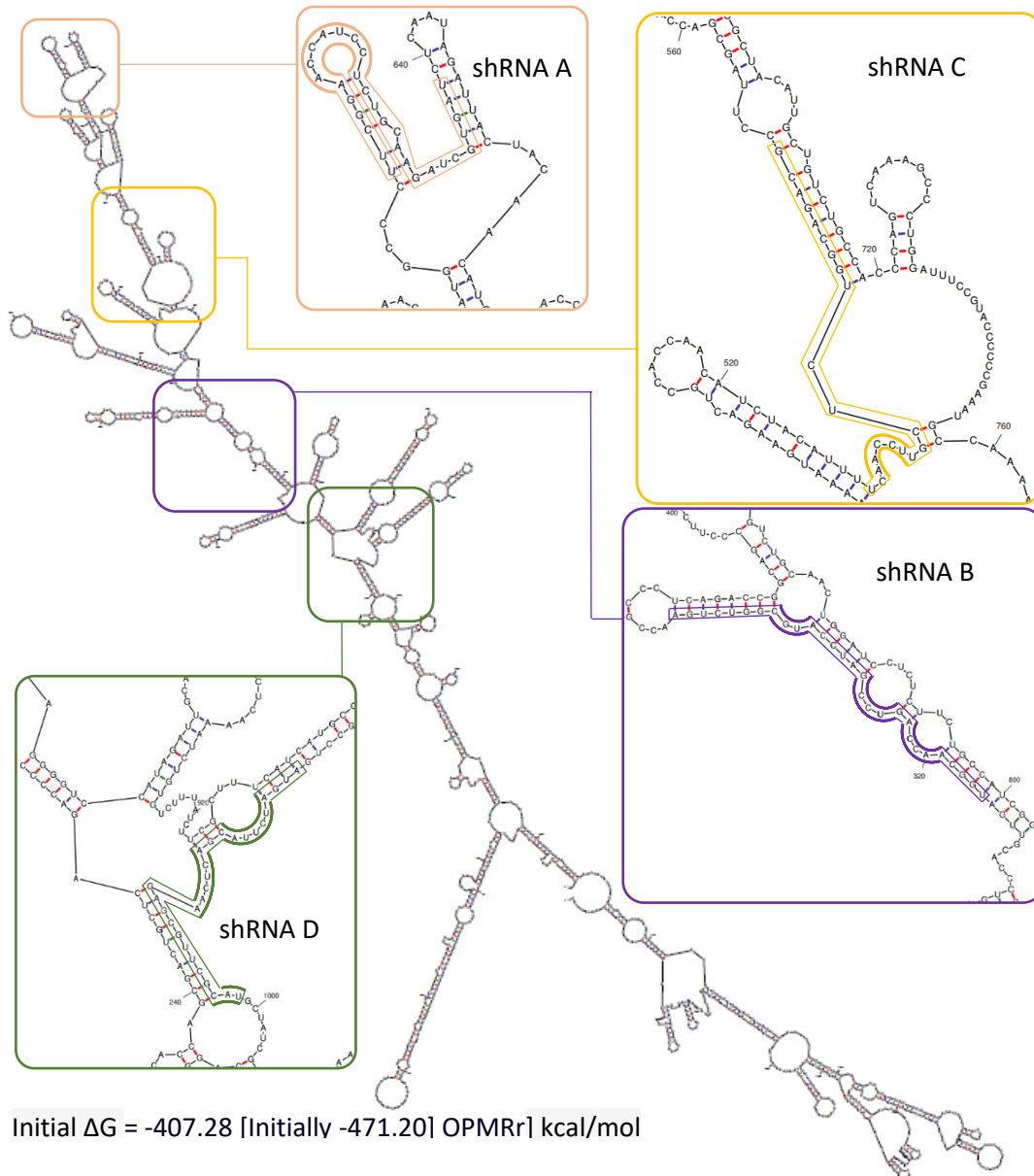


Figura 25. Predicción planar (2D) *in silico* del plegamiento del mRNA de OPMRr y los sitios de reconocimiento de las 4 secuencias de shRNA. Se observa la predicción de la estructura que posee menor energía libre, y por lo tanto más estable, en dos dimensiones, del RNA mensajero del OPMRr obtenida por el sitio web del The RNA Institute, College of Arts and Sciences de la Universidad Estatal de Nueva York en Albany. Los sitios de reconocimiento de cada una de las secuencias de los 4 shRNAs, se encuentran destacadas los sitio de reconocimiento de la secuencia del para el shRNA A en color damasco, el shRNA B en morado, el shRNA C en amarillo y el shRNA D en verde.

En estudios realizados por Lasek y cols. (2007), se diseñaron shRNAs con secuencias de 19 pb dirigidas al RNA mensajero del OPMR de ratón para posteriormente ser empacadas en vectores lentivirales y de esta forma poder inhibir la expresión del gen de OPMR en el VTA de ratones C57BL/6J. En este estudio ellos realizaron transfecciones de células HEK-293 que expresaban el OPMR de ratón con 3 secuencias de shRNA y una secuencia control (scramble). La actividad de los shRNA se determinó mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de OPMR mediante RT-qPCR. Los autores encontraron que las secuencias utilizadas redujeron los niveles de mRNA de OPMR en 80%-95%, sin embargo no cuantificaron el efecto de los shRNA en los niveles de proteína. En este mismo estudio, los shRNA más efectivos fueron empaquetados en vectores lentivirales y administrados mediante estereotaxis en el cerebro de ratones C57BL/6J. Utilizando un agonista opioide marcado (DAMGO) determinaron que el shRNA seleccionado era efectivo en reducir significativamente la densidad de OPMR en el tejido.

En esta tesis se evaluó mediante análisis de *Western blot* el efecto *in vitro* de los shRNA en los niveles de OPMRr, y se encontró que las secuencias correspondientes a los shRNA A y D presentaron un nivel de inhibición de la expresión de OPMRr de 83,7% y 80,6% respectivamente. Este nivel de inhibición es similar a los obtenidos *in vitro* en el estudio de Lasek y cols. (2007), sugiriendo que los shRNA A y D serían efectivos en reducir los niveles de OPMRr en el cerebro de ratas bebedoras UChB.

7.4. Proyecciones: Generación de vectores lentivirales y de las líneas celulares que expresen establemente los shRNAs.

Para una mejor demostración de la capacidad de los shRNAs A y D en inhibir la expresión de OPMRr, se planteó el objetivo de generar líneas celulares HEK-293T que expresaran

establemente estos shRNA y luego transfectar dichas células con un plásmido codificante para OPMRr. De esta forma se podría aumentar la abundancia relativa de las moléculas de shRNA frente al número de moléculas de RNA de OPMRr y observar de mejor manera la potencia inhibitoria de los shRNAs. Otra ventaja de usar líneas celulares que expresen establemente los shRNA, es la posibilidad de observar los efectos inhibitorios en la expresión de OPMRr a tiempos mayores que los que se pueden observar en los experimentos de co-transfección que están limitados a rangos temporales de 48 a 72 horas.

Aprovechando la capacidad de los vectores lentivirales de integrarse al genoma celular y permitir una expresión estable del transgén incorporado en su material genético, en esta tesis se generaron cinco vectores lentivirales correspondientes a las cinco secuencias de los shRNA (A, B, C, D y scramble). La infección de células HEK-293T con estos vectores lentivirales permitió la generación de líneas celulares que expresan establemente los shRNAs A, C, D y scramble. La línea celular correspondiente a la secuencia B se decidió no generarla debido a que en los ensayos de co-transfección mostró los menores niveles de inhibición. Los experimentos destinados a evaluar la inhibición de la expresión de OPMRr en estas líneas celulares quedarán pendientes para próximas investigaciones.

Otra proyección importante de los estudios realizados en esta tesis, es la utilización de los vectores lentivirales generados en futuros experimentos *in vivo*. Una vez definido el mejor shRNA para inhibir la expresión de OPMRr, el correspondiente vector lentiviral será administrado mediante cirugía estereotáxica en el VTA de ratas bebedoras UChB con el objetivo de estudiar la importancia de los niveles de receptor μ -opioide presentes en el sistema mesocorticolímbico en la apetencia por el alcohol de estos animales y su relevancia en el fenómeno de la recaída que también puede ser modelado en estos animales

8. CONCLUSIONES

- i) Mediante el uso de técnicas de biología molecular fue posible clonar y expresar el gen del receptor μ -opioide de rata en células HEK-293T en cultivo.
- ii) Se determinaron dos secuencias distintas de shRNA (A y D) que lograron silenciar en más de 70% la expresión del cDNA codificante para el receptor μ -opioide de rata en células HEK-293T en cultivo.
- iii) Se generaron vectores lentivirales codificantes de los shRNA A y D que podrán ser utilizados a futuro en experimentos *in vivo*.
- iv) Se generaron líneas celulares que expresan establemente los shRNAs A y D, los que permitirán validar los resultados obtenidos en esta tesis.

9. REFERENCIAS

Ahmed F, Raghava G. Designing of highly effective complementary and mismatch siRNAs for silencing a gene. *Plos One* **6**:e23443 (2011).

Al-Hasani R, Bruchas M. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* **115**:1363–1381 (2011).

Berrios-Cárcamo P, Quintanilla M, Herrera-Marschitz M, Vasiliou V, Zapata-Torres G, Rivera-Meza M. Racemic salsolinol and its enantiomers act as agonists of the μ -opioid receptor by activating the G_i protein-adenylate cyclase pathway. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **10**:253 (2017).

Castillo-Carniglia Á, Kaufman J, Pino P. Alcohol-attributable mortality and years of potential life lost in Chile in 2009. *Alcohol and Alcoholism* **48**:729–736 (2013).

Consejo Nacional para el Control de Estupeficientes (CONACE). Estrategia Nacional de Drogas y Alcohol 2011 – 2014. Santiago, Chile. Ministerio del Interior y Seguridad Pública, Gobierno de Chile (2011).

Correa M, Salamone J, Segovia K, Pardo M, Longoni R, Spina L, Peana A, Vinci S, Acquas E. Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **36**:404–430 (2012).

Dawson D, Grant B, Stinson F, Chou P, Huang B, Ruan W. Recovery from DSM–IV alcohol dependence: United States, 2001–2002. *Addiction Biology* **100**:281–292 (2005).

Deehan G, Hauser S, Wilden J, Truitt W, Rodd Z. Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **7**:104 (2013).

Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *PNAS* **85**:5274-5278 (1988).

Djouma E, Lawrence A. The Effect of Chronic Ethanol Consumption and Withdrawal on μ -Opioid and Dopamine D1 and D2 Receptor Density in Fawn Hooded Rats Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **302**:551-559 (2002).

Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus L, Xia Y. Current Research on Opioid Receptor Function. *Current Drug Targets* **13**:230–246 (2012).

Galligan J, Akbarali H. Molecular physiology of enteric opioid receptors. *American Journal of Gastroenterology Supplements* **2**:17–21 (2014).

Gianoulakis C. Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* **26**:304-318 (2001).

Heilig M, Goldman D, Berrettini W, O'Brien C. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nature Reviews Neuroscience* **12**:670–684 (2012).

Israel Y, Quintanilla M, Karahanian E, Rivera M, Herrera M,. The “first hit” toward alcohol reinforcement: role of ethanol metabolites. *Alcoholism Clinical and experimental research* **39**:776-786 (2015).

Janes K. An Analysis of Critical Factors for Quantitative Immunoblotting. *Science Signaling* **8**:371 (2016).

Karahanian E, Quintanilla M, Tampier, L, Rivera M, Bustamante D, Gonzalez V, Morales P, Herrera M, Israel Y, Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* **35**: 606-612 (2011).

Kasai S, Yamamoto H, Kamegaya E, Uhl G, Sora I, Watanabe M, Ikeda K. Quantitative Detection of μ -Opioid Receptor: Western Blot Analyses Using μ -Opioid Receptor Knockout Mice. *Current Neuropharmacology* **9**:219-222 (2011).

Lasek A, Janak P, He L, Whistler J, Heberlein U. Downregulation of mu opioid receptor by RNA interference in the ventral tegmental area reduces ethanol consumption in mice. *Genes, Brain and Behavior* **6**:728–735 (2007).

Law P, Tine S, McLeod L, Loh H. Association of a Lower Molecular Weight Protein to the m-Opioid Receptor Demonstrated by ¹²⁵I-b-Endorphin Cross-Linking Studies. *Journal of Neurochemistry* **75**:164-173 (2000).

Lee CW, Ho I. Pharmacological Profiles of Oligomerized μ -Opioid Receptors. *Cells* **2**:689-714 (2013).

Logan T, (5/5/09). *Short Interfering RNA (That's "SIR" to you)* [diapositivas de PDF] slide 13. <http://mcmanuslab.ucsf.edu/sites/mcmanuslab.ucsf.edu/files/presentations/BMS265presentation.pdf>.

Margozzini P, Sapag J. El consumo riesgoso de alcohol en Chile: tareas pendientes y oportunidades para las políticas públicas. Santiago, Chile. Temas de la Agenda Pública N°75. Centro de políticas públicas UC (2015).

Melis M, Carboni E, Caboni P, Acquas E. Key role of salsolinol in ethanol actions on dopamine neuronal activity of the posterior ventral tegmental area. *Addiction Biology* **20**:182-193 (2013).

Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochemistry International* **26**:305-336 (1995).

Obbard D, Gordon K, Buck A, Jiggins F. The evolution of RNAi as a defense against viruses and transportable elements. *Philosophical transactions of the royal society B* **364**: 99-115 (2008).

Organización Mundial de la Salud (OMS), Glosario de términos de alcohol y drogas. Madrid, España. Ministerio de Sanidad y Consumo de España (1994). Recuperado de http://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Global status report on alcohol and health 2014. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf

Pasternak G, Pan Y. Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept. *Pharmacological Reviews* **65**:1257–1317 (2013).

Quintanilla M, Rivera M, Berrios P, Kennedy B, Herrera M e Israel Y. (R)-salsolinol, a product of the ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake. *Addiction Biology* **21**:1063–1071 (2016).

Rivera-Meza M, Quintanilla M, Bustamante D, Delgado R, Buscaglia M, Herrera-Marschitz M. Overexpression of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels into the Ventral Tegmental Area Increases the Rewarding Effects of Ethanol in UChB Drinking Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **38**:911–920 (2014).

Sanchez-Catalan M, Kaufling J, Georges F, Veinante P y Barrot M. The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* **282**:198-216 (2014).

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA). (2016). El consumo de alcohol en Chile: situación epidemiológica. Recuperado de http://www.senda.gob.cl/media/estudios/otrosSENDA/2016_Consumo_Alcohol_Chile.pdf

Shao Y, Chan C, Maliyekkel A, Lawrence C, Roninson I, Ding Y. Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA* **13**:1631–1640 (2007)

Sobczak M, Sałaga M, Storr M, Fichna J. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *The Journal of Gastroenterology* **49**:24–45 (2014).

Urra J. Efecto de la privación al consume crónico de alcohol en los niveles de receptor mu-opioide en cerebro de rata. Tesis para optar al título de bioquímico. Universidad de Santiago de Chile (2016)

Zastawny R, George S, Nguyen T, Cheng R, Tsatsos J, Briones-Urbina R, O'Dowd B. Cloning, Characterization, and Distribution of a μ -Opioid Receptor in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* **62**:2099-2105 (1994).