



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**“TERAPIA GÉNICA POR VECTORES ADENOVIRALES  
EN MODELOS ANIMALES DE ALCOHOLISMO:  
INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA  
DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL  
MEDIANTE UN GEN ANTISENTIDO”**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN  
CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL  
GRADO DE:**

**DOCTOR EN BIOQUÍMICA**

**POR**

**PAULA OCARANZA OSSES**

**Director de Tesis: Dr. Yedy Israel Jacard**

**SANTIAGO-CHILE 2006**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**Paula Ocaranza Osses**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

---

**Director de Tesis:**

Dr. Yedy Israel

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Javier Puente (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Miguel Allende

\_\_\_\_\_

Dr. Sergio Lavandero

\_\_\_\_\_

Dr. Eugenio Spencer

\_\_\_\_\_

*“Si piensas que estás vencido, vencido estás;  
si piensas que no te atreves, no lo harás;  
si piensas que perderás, ya has perdido;  
porque en el mundo encontrarás que el éxito comienza en la voluntad;  
porque en el, muchas carreras se han perdido antes de haberse corrido  
y muchos cobardes han fracasado antes de hacer su trabajo.  
Piensa en grande y tus hechos crecerán,  
piensa en pequeño y quedarás atrás;  
piensa que puedes y podrás;  
si piensas que estas aventajado, lo estás;  
porque tarde o temprano, el hombre que gana... es aquel que cree poder  
hacerlo.”*

*Dr. C. Barnard*

*A mis padres Sylvia y Francisco*

*A mi bebé*

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante estos años de permanencia en el programa de doctorado en Bioquímica me han acompañado distintas personas, familiares y amigos, quienes me han apoyado y han seguido con gran interés todos los proyectos que he emprendido. El apoyo primordial, lo recibí siempre de mis padres a quienes les debo todo lo que soy y que hicieron posible que yo pudiera empezar, permanecer y finalizar mis estudios en la Universidad.

No puedo dejar de agradecer a mis parientes más cercanos, entre ellos debo mencionar a mis primos de Peñaflores y muy especialmente a Rosa, Erika, Silvia y Claudio con quienes he compartido muy gratos momentos; a la Sabina “grande” y Juan Pablo quienes me animan y me aconsejan. A mi tía Chena, quien me acompaña siempre. A mis tíos Nena, Juan y Gastón. A todos ellos y al resto de mi familia que no nombro ahora pero que están presente siempre en mi corazón.....los quiero mucho.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Yedy Israel, gracias por aceptarme como miembro de su laboratorio y por haber sido mi guía durante estos años. Gracias por sus consejos, apoyo y por ser un ejemplo de vida.

A la Dra. Amalia Sapag por su dedicación y ayuda, su presencia en el Laboratorio es primordial.

A mis nuevos amigos del Laboratorio de Farmacoterapia Génica: Guigliana, Fernando, Araceli, Mario, Ginéz, Gonzalo, Gabriel, Lorena, Javier y Robel. Los días en el Laboratorio fueron muy gratos gracias a ellos, disfruté mucho nuestras discusiones científicas y las no científicas, los almuerzos, paseos, etc, etc.

A mis amigos del quinto piso: Fidel Albornoz, Mario Chiong, Anita Gálvez, Jaime Meléndez, Fabián González y Dagoberto Soto.

A mis compañeros de carrera: Mónica Lespinasse, Nevenka Juretic y Mauricio Reyes. Los aprendí a conocer y a querer con los años (que ya son varios).....gracias por todo.

Y finalmente, a mi “*amorcito*” Cristian Manuel por el amor, apoyo y paciencia.....te has convertido en una parte fundamental de mi vida.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Farmacoterapia Génica del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Fue financiada por los proyectos **FONDECYT N°1040555** e **Iniciativa Científica Milenio P99-031F** de responsabilidad del Dr. Yedy Israel J.

Paula Ocaranza recibió la beca **CONICYT** para estudiantes de doctorado y las becas que aportaron al desarrollo de esta tesis **PG/89/2003** y **PG/114/2002** del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

- **FONDECYT N°1040555** “Mecanismos genéticos de aversión al etanol: modelos celulares y animales”  
Investigador responsable: Dr. Yedy Israel J.
- **Iniciativa Científica Milenio P99-031F** “Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología P99-031F”  
Investigador responsable: Dr. Yedy Israel J.
- **Beca CONICYT 2002-2004**
- **PG/89/2003**  
Investigador responsable: Paula Ocaranza O.
- **PG/114/2002**  
Investigador responsable: Paula Ocaranza O.

## **PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

Los resultados de la presente tesis han dado origen a las siguientes publicaciones y congresos:

- **Publicaciones**

Karahanian E, **Ocaranza P**, Israel Y.

“Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity in hepatoma cells is reduced by an adenoviral vector coding for an ALDH2 antisense mRNA”

*Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29(8): 1384-1389, 2005

- **Congresos Internacionales**

Sapag A, **Ocaranza P**, Karahanian E, Lobos L, Cortínez G, Quintanilla ME, Tampier L, Israel Y

“Hacia una terapia génica para el alcoholismo: Estrategia y avance”

II Congreso Nacional de Medicina Genómica

México D.F, México, Octubre 2006

Israel Y, Sapag A, Quintanilla ME, Karahanian E, **Ocaranza P**, Tampier L

“Mitochondrial complex-I and aldehyde dehydrogenase (ALDH2) interactions determine an acetaldehyde burst and ethanol volition in animals: Genetic and pharmacological studies”

13<sup>th</sup> Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA)

Sydney, Australia, Septiembre 2006

**Ocaranza P**, Quintanilla ME, Tampier L, Karahanian E, Sapag A, Israel Y

“A single injection of an aldehyde dehydrogenase antisense-coding gene lowers voluntary ethanol intake over one month in drinker rats”

29<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism

Baltimore, Maryland, EE.UU. Junio 2006

**Ocaranza P**, Quintanilla ME, Tampier L, Karahanian E, Sapag A, Israel Y

“Rats bred as heavy alcohol drinkers reduce their consumption when treated with an adenoviral vector that expresses an anti-aldehyde dehydrogenase antisense gene”

X Congress Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology

Pinamar, Argentina, Diciembre 2005

Karahanian E, **Ocaranza P**, Israel Y

“Administration of an adenoviral vector carrying an *Aldh2* antisense gene reduces ALDH2 activity and leads to an accumulation of acetaldehyde in rat hepatoma cells”

28<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism

Santa Bárbara, California, EE.UU. Junio 2005



- **Congresos Nacionales**

Karahanian E, **Ocaranza P**, Israel Y

“Un vector adenoviral portador de un gen antisentido contra la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial invoca el fenotipo no bebedor de asiáticos”

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile

Pucón, Chile 2005

**Ocaranza P**, Quintanilla ME, Tampier L, Sapag A, Karahanian E, Israel Y

“Ratas bebedoras tratadas con un vector adenoviral que expresa el gen antisentido anti-deshidrogenasa aldehídica disminuyen su consumo de alcohol”

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile

Pucón, Chile 2005

**Ocaranza P**, Israel Y, Karahanian E

“Gen de antisentido contra la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial. Protección contra el alcoholismo por aumento de los niveles de acetaldehído”

XLVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile

Pucón, Chile 2004

| <b>ÍNDICE GENERAL</b>  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> .....                                    | i             |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                 | v             |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....                                  | vii           |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                                      | viii          |
| <b>RESUMEN</b> .....   | ix            |
| <b>SUMMARY</b> .....   | xi            |
| <br>   |               |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                                   | 1             |
| 1.1. Alcoholismo .....   | 1             |
| 1.2. Factores Genéticos .....                                  | 2             |
| 1.3. Metabolismo del alcohol .....                             | 3             |
| 1.3.1. Deshidrogenasa alcohólica.....                          | 5             |
| 1.3.2. Deshidrogenasa aldehídica .....                         | 6             |
| 1.4. ALDH2 y su deficiencia genética.....                      | 7             |
| 1.5. Tratamiento Farmacológico.....                            | 9             |
| 1.5.1. Disulfiram (Antabus®).....                              | 9             |
| 1.5.2. Naltrexona (Revia® o Nalerona®).....                    | 11            |
| 1.5.3. Acamprosato (Campral®).....                             | 12            |
| 1.6. Desarrollo de una terapia génica para el alcoholismo..... | 13            |
| 1.7. Terapia génica con vectores adenovirales .....            | 14            |
| 1.8. Modelos animales para el estudio del alcoholismo .....    | 15            |
| <br>   |               |
| <b>2. HIPÓTESIS GENERAL</b> .....                              | 17            |
| <br>   |               |
| <b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....                               | 17            |
| <br>   |               |
| <b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....              | 17            |
| <br>   |               |
| <b>5. MATERIALES</b> .....                                     | 19            |
| 5.1. Material biológico.....                                   | 19            |
| 5.2. Enzimas.....  | 19            |
| 5.3. Plasmidios .....  | 19            |
| 5.4. Vectores adenovirales .....                               | 20            |
| 5.5. Oligonucleótidos .....                                    | 20            |
| 5.5.1 Deshidrogenasa aldehídica .....                          | 20            |
| 5.5.2 2´-5´A oligonucleotido sintetasa.....                    | 22            |
| 5.6. Reactivos y materiales generales.....                     | 23            |
| 5.6.1. Cultivo celular .....                                   | 23            |
| 5.6.2. Reactivos químicos generales.....                       | 23            |
| 5.6.3. Reactivos para biología molecular .....                 | 24            |
| 5.7. Soluciones y tampones .....                               | 24            |

|   |    |
|---|----|
| <b>6. MÉTODOS</b> .....   | 25 |
| 6.1. Producción del vector adenoviral de primera generación anti-deshidrogenasa aldehídica.....   | 25 |
| 6.2. Cultivos de células embrionarias humanas de riñón (HEK) 293 .....  | 26 |
| 6.3. Propagación y purificación de los vectores adenovirales de primera generación.....   | 26 |
| 6.3.1. Infección de células 293 .....   | 26 |
| 6.3.2. Liberación del vector adenoviral de primera generación.....  | 27 |
| 6.3.3. Purificación del vector adenoviral.....  | 27 |
| 6.3.4. Cuantificación de partículas totales mediante espectrofotometría ..  | 28 |
| 6.3.5. Almacenamiento de partículas virales.....  | 28 |
| 6.3.6. Estimación de las partículas virales infectivas .....  | 28 |
| 6.4. Cultivos de células H4-II-E-C3 de hepatoma de rata .....   | 29 |
| 6.5. Condiciones de cultivo de las células H4-II-E-C3 para los distintos ensayos .....  | 29 |
| 6.6. Medición de la actividad de la ALDH2 en células H4-II-E-C3 en cultivo ....   | 30 |
| 6.7. Cuantificación de las proteínas totales provenientes de los extractos celulares H4-II-E-C3.....  | 31 |
| 6.8. Curva dosis-respuesta con cianamida en células H4-II-E-C3 .....  | 31 |
| 6.9. Curva dosis-respuesta con el vector adenoviral AdV-AS en cultivos de células H4-II-E-C3 .....  | 32 |
| 6.10. Determinación de la expresión del gen <i>Aldh2</i> sentido proveniente de las células H4-II-E-C3 y antisentido proveniente del vector adenoviral AdV-AS en células transducidas con el vector adenoviral..... | 32 |
| 6.11. Medición de la acumulación de acetaldehído formado en cultivos de células H4-II-E-C3 incubadas con etanol .....   | 34 |
| 6.11.1. Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de etanol en células de hepatoma de rata .....   | 34 |
| 6.11.2. Cuantificación del acetaldehído formado en células H4-II-E-C3 mediante HPLC .....   | 34 |
| 6.12. Determinación del consumo voluntario de alcohol en ratas bebedoras de la Universidad de Chile (línea UChB).....   | 35 |
| 6.13. Efecto de la administración del gen antisentido anti- <i>Aldh2</i> sobre el consumo de alcohol de ratas UChB: establecimiento de la condición acceso limitado.....  | 36 |
| 6.14. Efecto del gen antisentido anti- <i>Aldh2</i> sobre los niveles sanguíneos de acetaldehído .....  | 37 |
| 6.15. Preparación de las muestras de hígado de rata UChB para la medición de la actividad de las ALDHs .....  | 38 |
| 6.16. Medición de la actividad de las ALDHs y ALDH2 en extractos de hígado de rata UChB.....  | 39 |
| 6.16.1 Medición de la actividad ALDHs totales en extractos de hígado de rata UChB .....   | 39 |
| 6.16.2 Medición de la actividad ALDH2 de extractos de hígado de rata UChB .....   | 39 |
| 6.17. Determinación de la expresión del gen de la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa mediante RT-PCR semicuantitativa .....   | 40 |
| 6.18. Estadísticas .....  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| <b>7. RESULTADOS</b> .....   | 42 |
| 7.1 Medición de la actividad ALDH2 en células de hepatoma de rata: Curva dosis-respuesta con cianamida .....   | 42 |
| 7.2 Propagación de vectores adenovirales de primera generación a gran escala .....   | 43 |
| 7.3 Inhibición de la ALDH2 por el gen antisentido: Efecto de la transducción con distintas dosis del vector AdV-AS sobre la actividad ALDH2 en el tiempo .....   | 46 |
| 7.4. Reducción en la actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata transducidas con vectores adenovirales que portan el gen <i>Aldh2</i> antisentido .....  | 49 |
| 7.5. Detección de mRNA de la ALDH2 antisentido (AS) luego de la transducción de células H4-II-E-C3 con un vector adenoviral AdV-AS .....   | 51 |
| 7.6. Niveles de mRNA de la ALDH2 sentido (S) y antisentido (AS) luego de la transducción de células H4-II-E-C3 con un vector adenoviral AdV-AS .....   | 53 |
| 7.7. Determinación por RT-PCR de los niveles relativos de mRNA de <i>Aldh2</i> sentido (S) y antisentido (AS) luego de la transducción de células H4-II-E-C3 con un vector adenoviral AdV-AS .....   | 55 |
| 7.8. Acumulación de acetaldehído en células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 transducidas con los vectores AdV-AS .....  | 58 |
| 7.8.1 Producción de niveles basales de acetaldehído en células H4-II-E-C3 incubadas con concentraciones crecientes de etanol ..  | 58 |
| 7.8.2. Acumulación de acetaldehído en células H4-II-E-C3 transducidos con el vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> antisentido.....  | 60 |
| 7.9. Inhibición del consumo de alcohol por el gen antisentido anti- <i>Aldh2</i> . Efecto de la administración de un vector adenoviral anti- <i>Aldh2</i> sobre el consumo de alcohol de ratas bebedoras de la Universidad de Chile (línea UChB): Establecimiento del régimen acceso limitado..... | 62 |
| 7.10. Estudios de larga duración: Efecto de la administración de un vector adenoviral anti- <i>Aldh2</i> sobre el consumo de alcohol en ratas de la línea UChB .....   | 65 |
| 7.10.1. Duración del efecto de la administración del vector AdV-AS anti- <i>Aldh2</i> sobre la actividad de las ALDHs .....  | 68 |
| 7.10.2 Evaluación de una posible activación del sistema interferón por dúplex RNA-RNA. Evaluación de 2´-5´A oligonucleótido sintetasa en el hígado de animales tratados con AdV-AS .....   | 68 |
| 7.11. Efecto de la administración del vector adenoviral anti- <i>Aldh2</i> sobre los niveles sanguíneos de acetaldehído.....   | 72 |
| 7.11.1. Medición de la alcoholemia en animales tratados con el vector anti- <i>Aldh2</i> .....   | 73 |
| 7.11.2. Efecto de la administración del vector AdV-AS anti- <i>Aldh2</i> sobre la actividad de las ALDHs de las ratas UChB.....  | 76 |

|   |    |
|---|----|
| <b>8. DISCUSIÓN</b> .....   | 78 |
| 8.1 La célula de hepatoma de rata como un modelo de estudio de la expresión del gen <i>Aldh2</i> .....                                | 80 |
| 8.2 Producción de un vector adenoviral de primera generación que codifica el gen <i>Aldh2</i> -antisentido.....                       | 81 |
| 8.3 Efecto del vector adenoviral anti- <i>Aldh2</i> sobre la actividad ALDH2 proveniente de células de hepatoma de rata .....         | 83 |
| 8.4 Efecto de la transducción de células de hepatoma de rata con el vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> -antisentido..... | 83 |
| 8.5 Modelo animal en ratas dependientes para el estudio de una nueva modalidad terapéutica contra el alcoholismo.....                 | 85 |
| 8.5.1 Asociación del efecto disfórico del acetaldehído con la ingesta de una solución de etanol.....                                  | 86 |
| 8.5.2 Establecimiento de una condición de acceso limitado de 1 hora ...   | 87 |
| 8.6 Duración de la inhibición del consumo de alcohol inducida por la administración del vector anti- <i>Aldh2</i> .....               | 89 |
| 8.7 Terapia génica mediada por el vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> -antisentido.....                                   | 91 |
| 8.7.1 Proteína quinasa R dependiente de RNA de doble cadena .....   | 92 |
| 8.7.2 Proteína inducida por interferon: 2'-5'A oligonucleótido sintetasa.....   | 93 |
| 8.8 Tratamiento contra el alcoholismo a largo plazo mediado por un vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> -antisentido ..... | 94 |
| <br>  |    |
| <b>9. CONCLUSIONES</b> .....  | 97 |
| <br>  |    |
| <b>10.REFERENCIAS</b> .....   | 99 |

| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>  | <b>PÁGINA</b> |
|---|---------------|
| Figura 1.1 Esquema general del metabolismo del etanol en el hígado.....   | 4             |
| Figura 7.1 Medición de la actividad ALDH2 endógena en células de hepatoma de rata mediante espectrofotometría.....  | 44            |
| Figura 7.2 Propagación de vectores adenovirales a gran escala.....  | 45            |
| Figura 7.3 Efecto de la transducción con dos dosis infectivas del vector que porta el gen <i>Aldh2</i> antisentido sobre la actividad ALDH2 de células de hepatoma de rata .....                                  | 48            |
| Figura 7.4 Actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata transducidas con vectores adenovirales que portan el gen <i>Aldh2</i> antisentido .....   | 50            |
| Figura 7.5 Expresión del gen <i>Aldh2</i> antisentido en cultivos de células H4-II-E-C3 luego de 24 h de transducción con el vector AdV-AS .....  | 52            |
| Figura 7.6 Niveles de mRNA de la <i>Aldh2</i> sentido (S) y antisentido (AS) después de la transducción de células de hepatoma de rata con un vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> antisentido.....    | 54            |
| Figura 7.7 Determinación por RT-PCR de los niveles relativos de mRNA de <i>Aldh2</i> sentido y <i>Aldh2</i> antisentido ( <i>Aldh2</i> -AS) en células de hepatoma de rata transducidas con el vector AdV-AS..... | 56            |
| Figura 7.8 Mecanismo de acción de la ALDH2 antisentido codificado por el vector adenoviral AdV-AS .....   | 57            |
| Figura 7.9 Acumulación de acetaldehído en células de hepatoma de rata incubadas con concentraciones crecientes de etanol .....  | 59            |
| Figura 7.10 Acumulación de acetaldehído en células de hepatoma de rata transducidas con el vector adenoviral que porta el gen <i>Aldh2</i> antisentido .....  | 61            |
| Figura 7.11 Efecto de la administración de un vector adenoviral anti- <i>Aldh2</i> sobre el consumo de alcohol de ratas bebedoras de la Universidad de Chile .....  | 64            |
| Figura 7.12 Duración (34 días) del efecto del vector AdV-AS anti- <i>Aldh2</i> sobre el consumo voluntario de una solución de etanol.....   | 67            |
| Figura 7.13 Efecto de la administración de una dosis de un vector AdV que porta el gen <i>Aldh2</i> antisentido sobre la actividad ALDH después de 34 días de “condición acceso limitado” .....                   | 70            |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 7.14 | Cuantificación de la expresión del gen<br><i>2'-5'A oligonucleótido sintetasa</i> mediante la técnica<br>RT-PCR semicuantitativa después de 38 días de infección..... | 71 |
| Figura 7.15 | Niveles de acetaldehído generados por la administración de<br>etanol en ratas de la línea UChB tratadas con<br>una sola dosis del vector AdV-AS durante 13 días ..... | 74 |
| Figura 7.16 | Efecto del vector anti- <i>Aldh2</i> en ratas de la línea UChB<br>sobre la actividad ALDH .....   | 77 |

| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| Tabla 5.1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la deshidrogenasa aldehídica invertida contenida en el vector adenoviral y ALDH2 endógena de las células H4-II-E-C3 ..... | 21            |
| Tabla 5.2 Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la $\beta$ -actina de rata .....  | 22            |
| Tabla 5.3 Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la 2,5-A oligonucleótido sintetasa de rata .....  | 22            |
| Tabla 7.1 Niveles de etanol sanguíneo en ratas UChB tratadas con el vector que porta el gen <i>Aldh2</i> -antisentido al finalizar el acceso de 1 hora.....                                | 75            |



## ABREVIATURAS

ADH: deshidrogenasa alcohólica

ALDH: deshidrogenasa aldehídica

ALDH2: deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata y humana

ALDH2\*1: deshidrogenasa aldehídica normal o silvestre humana

ALDH2\*2: deshidrogenasa aldehídica mutada humana

(protectora contra el alcoholismo)

*Aldh2*<sup>1</sup>: gen de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CMV: citomegalovirus

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenoso

$K_m$ : constante de Michaelis-Menten

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pfu: unidades formadoras de placa

pv: partículas virales

PVC: partículas virales por célula

RNA: ácido ribonucleico

RT: transcripción inversa

UChB: rata Universidad de Chile Bebedora

## RESUMEN

El alcoholismo es una enfermedad de etiología multifactorial que causa un número de problemas sociales, laborales, legales y médicos. El riesgo de un individuo de desarrollar alcoholismo está influenciado por varios genes. Algunos genes permiten el desarrollo del alcoholismo y otros genes protegen a sus portadores de esta condición. La deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) metaboliza gran parte del acetaldehído generado en el metabolismo hepático del alcohol. En algunos individuos de la población asiática, una mutación en el gen que codifica la ALDH2, disminuye o elimina la actividad de esta enzima. La inactivación de esta enzima produce una exagerada acumulación del acetaldehído sanguíneo luego del consumo de bebidas alcohólicas, lo que genera efectos disfóricos que producen un rechazo al alcohol. Este fenotipo protector descrito en la población asiática puede ser producido en alcohólicos a los cuales se ha administrado el medicamento aversivo disulfiram (Antabus®). Este fármaco, eficaz en disminuir la actividad ALDH2, es sin embargo poco específico, posee una vida media corta, muestra una gran variabilidad individual y genera una serie de efectos tóxicos por unirse en forma no específica a los grupos sulfhidrilos de varias proteínas.

La terapia génica se perfila como una alternativa al actual tratamiento farmacológico del alcoholismo. Un nuevo medicamento aversivo sin los efectos secundarios del disulfiram sería de gran utilidad en el campo del alcoholismo. El tipo de terapia a desarrollar pretende imitar el fenotipo asiático, disminuyendo específicamente la actividad de la ALDH2 mediante la reducción de la traducción del mRNA. La estrategia utilizada para lograr este objetivo, es inhibir la traducción mediante la generación de un RNA antisentido de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial codificado en un vector adenoviral.

En estudios en esta tesis, primeramente, el gen antisentido de la ALDH2 (cDNA de *Aldh2* en posición 3' a 5') contenido en el vector adenoviral bajo el promotor CMV se transdujo a células de hepatoma de rata generando niveles altos de mRNA antisentido. La administración de este vector a células de hepatoma de rata disminuyó de 60 a 70% la actividad ALDH2 y aumentó 8 veces (10  $\mu$ M a 80  $\mu$ M) los niveles de acetaldehído acumulado cuando estas células se incubaron con etanol. En estudios *in vivo*, se administró el adenovirus portador del gen antisentido-*Aldh2* a ratas bebedoras UChB (línea de ratas Bebedoras desarrollada en la Universidad de Chile). Las ratas que recibieron una sola dosis del vector ( $10^{12}$  pv/kg) por vía intravenosa, disminuyeron su consumo de alcohol en 50%, y se observó una reducción de 90% en la actividad de la ALDH2. La reducción del consumo de etanol duró 34 días, tiempo al cual el estudio se finalizó. En estudios paralelos de más corta duración (10 días), los niveles plasmáticos de acetaldehído en los animales tratados con el vector anti-*Aldh2* aumentó 6 a 8 veces (8  $\mu$ M a 60  $\mu$ M) sobre niveles controles (6-14  $\mu$ M;  $p < 0,01$ ) asociado a un 37,5% de inhibición de la actividad ALDH2 hepática. En conclusión, en animales que reciben el gen *Aldh2*-antisentido, una reducción específica en la actividad de la ALDH2 permite la elevación de los niveles de acetaldehído sistémico, que genera una aversión al etanol. Los estudios sugieren que es posible desarrollar una terapia génica específica y de larga duración para el alcoholismo.

## **SUMMARY**

### **Gene therapy by adenoviral vectors carrying the aldehyde dehydrogenase antisense gene (ALDH2-AS) reduces alcohol consumption in alcohol-dependent rats**

Alcoholism is defined by the compulsive excessive use of alcohol despite of negative consequences perceived by the subject. It is not only one of major public health problems due to the morbidity caused by the alcohol abuse disorder but it is also a major social problem. The risk of developing this disease is genetically influenced, with some genes being permissive and other genes protective. Most of the elimination of ethanol occurs by oxidation to acetaldehyde and further into acetate. The reactions are sequentially catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). The oxidation of acetaldehyde to acetate is catalyzed primarily by ALDH2, the low  $K_m$  isozyme of ALDH present in mitochondria. A mutation in the gene coding for ALDH2 present in some Asian populations, lowers or abolishes the activity of this enzyme and results in marked elevations in blood acetaldehyde upon ethanol consumption. The resulting phenotype greatly protects against alcohol abuse and alcoholism.

The protective Asian phenotype can be elicited in alcoholics who are administered the aversive medication disulfiram (Antabuse®), affording these individuals the same protection from alcohol abuse. However, disulfiram is a non-specific drug that binds to sulfhydryl groups, has a short half-life, cannot be metabolized by some patients into its active metabolite, and has marked toxicity side effects, as it nonspecifically binds to sulfhydryl groups in other proteins.

Gene therapy, as a new approach, opens the possibility of developing a specific aversive medication for alcoholism. This new treatment, based on the reduction of

*Aldh2* mRNA transduction, provides a means by which gene expression can be specifically inhibited to yield the low-ALDH2 Asian phenotype. The aim of the work presented in this thesis is to reduce *Aldh2* mRNA translation in the rat by the intracellular generation of an antisense aldehyde dehydrogenase RNA coded by an antisense gene (*Aldh2* cDNA in a 3' to 5' orientation) contained in an adenoviral vector. Rat hepatoma cells were transduced with the antisense coding gene against ALDH2 carried by the adenoviral vector, leading to the generation of high levels of antisense mRNA. The cells infected with this vector, reduced their ALDH2 activity by 60 to 70% and, in the presence of ethanol, increased 8-fold the levels of acetaldehyde (10  $\mu$ M to 80  $\mu$ M). In studies *in vivo*, the adenoviral vector coding for the antisense-*Aldh2* RNA was administered to UChB rats (University of Chile alcohol dependent rats). The rats infected with a single dose of the vector ( $10^{12}$  vp/kg) by tail vein injection inhibited its ALDH2 activity in 90% and reduced its alcohol consumption in 50%. The reduction in alcohol consumption lasted 34 days, time at which the study was terminated. A parallel study in which rats were infected 10 days earlier with a single dose of the vector carrying the antisense gene showed a 37.5% reduction in hepatic ALDH2 activity, while acetaldehyde plasma levels following the administration of ethanol increased 6-8 fold over controls (5-10  $\mu$ M to 40-60  $\mu$ M) ( $p < 0,01$ ). Overall, rats treated with an *Aldh2*-antisense coding gene show significant reductions in hepatic ALDH2 activity and elevations in systemic acetaldehyde upon ethanol administration, which are accompanied by marked reductions in ethanol voluntary consumption in alcohol dependent animals. These preclinical studies suggest that a long-lasting specific gene therapy against alcoholism may be developed.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 ALCOHOLISMO**

El alcoholismo es una enfermedad crónica caracterizada por la ingesta compulsiva y excesiva de bebidas alcohólicas que con el tiempo conduce a: i) la pérdida de control sobre el consumo, ii) tolerancia, iii) dependencia psicológica y en algunos casos iv) dependencia física (American Psychiatric Association, 2001).

El consumo de alcohol y los efectos biológicos del alcoholismo a nivel individual y poblacional, constituyen en Chile uno de los problemas más importantes de la salud pública. Según los criterios del Ministerio de Salud el “bebedor problema” es un individuo con cualquiera forma de ingestión de alcohol que directa o indirectamente provoca consecuencias negativas para éste o para terceros en las áreas de salud, armonía familiar, rendimiento laboral (o escolar), seguridad personal y funcionamiento social (Consejo Nacional para el Control de Estupefacientes: CONACE, 2001). En un estudio posterior (CONACE, 2003), se estimó que cerca de 5 millones de personas eran usuarios actuales de alcohol. De éstos, cerca de un 12% de la población entre 12 y 64 años de edad presentaban serios trastornos en su vida personal y social debido al consumo abusivo de bebidas alcohólicas que podían llegar al alcoholismo crónico.

Las mayores tasas de consumo de alcohol se observan entre los estudiantes de educación superior y los trabajadores de jornada completa. En Chile, según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el alcoholismo es responsable del 4,5% de los egresos hospitalarios, del 7% de las muertes como causa principal y del 25% de las muertes como causa asociada.

Uno de los indicadores de alcoholismo más objetivo es la tasa de muerte por cirrosis hepática, la que si bien tiene distintas causas, ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte en la población general, siendo en Chile un 95% de los casos de etiología alcohólica (Téllez y Santis, 1994). En el año 1998, los costos totales asociados a bebedores problemas y alcoholismo en Chile ascendieron a US\$ 2.969 millones anuales, producto mayoritariamente de una menor productividad laboral, ausentismo laboral y muertes prematuras (Figueroa y cols., 1998).

El alcoholismo es una enfermedad compleja en la que inciden factores genéticos y medioambientales. Se ha estimado que la implicancia del factor genético es de aproximadamente un 60% (Prescott y Kendler, 1999; Schuckit y cols., 2000; Heath y cols., 2001), considerándose el alcoholismo como una enfermedad poligénica en que algunos genes predisponen a ésta y otros genes tienen un efecto protector (Goate y Edenberg, 1998). Los factores medioambientales tendrían una implicancia del 40% restante (Schuckit, 2000) y entre los factores que podrían gatillar y dar curso al alcoholismo, se consideran una variedad de influencias socioculturales como por ejemplo reuniones sociales y niveles de estrés (Heath y cols., 2001).

## **1.2 FACTORES GENÉTICOS**

Como se indicara, la predisposición al alcoholismo está determinada en gran parte por factores genéticos. Así lo demuestran estudios realizados con hermanos gemelos (Heath y cols., 1991; Schuckit y cols., 2000), mellizos, hermanos gemelos hijos de padres alcohólicos entregados en adopción separadamente (Prescott y Kendler, 1999) e hijas(os) de padres alcohólicos (Schuckit y cols., 2000). La influencia genética por sí misma es multigénica (Thomasson y cols., 1991) y algunos factores están relacionados

directamente con las enzimas que metabolizan el alcohol. Éste es el caso en aproximadamente un tercio de los individuos de origen del Este de Asia (Goedde y cols., 1992) quienes portan una mutación puntual en un gen que codifica para una proteína que participa directamente en la remoción del acetaldehído, el primer producto de la oxidación hepática del alcohol. Esta mutación inactiva a la enzima por lo que los individuos presentan niveles bajos de consumo de alcohol (Yoshida y cols., 1984).

### **1.3 METABOLISMO DEL ALCOHOL**

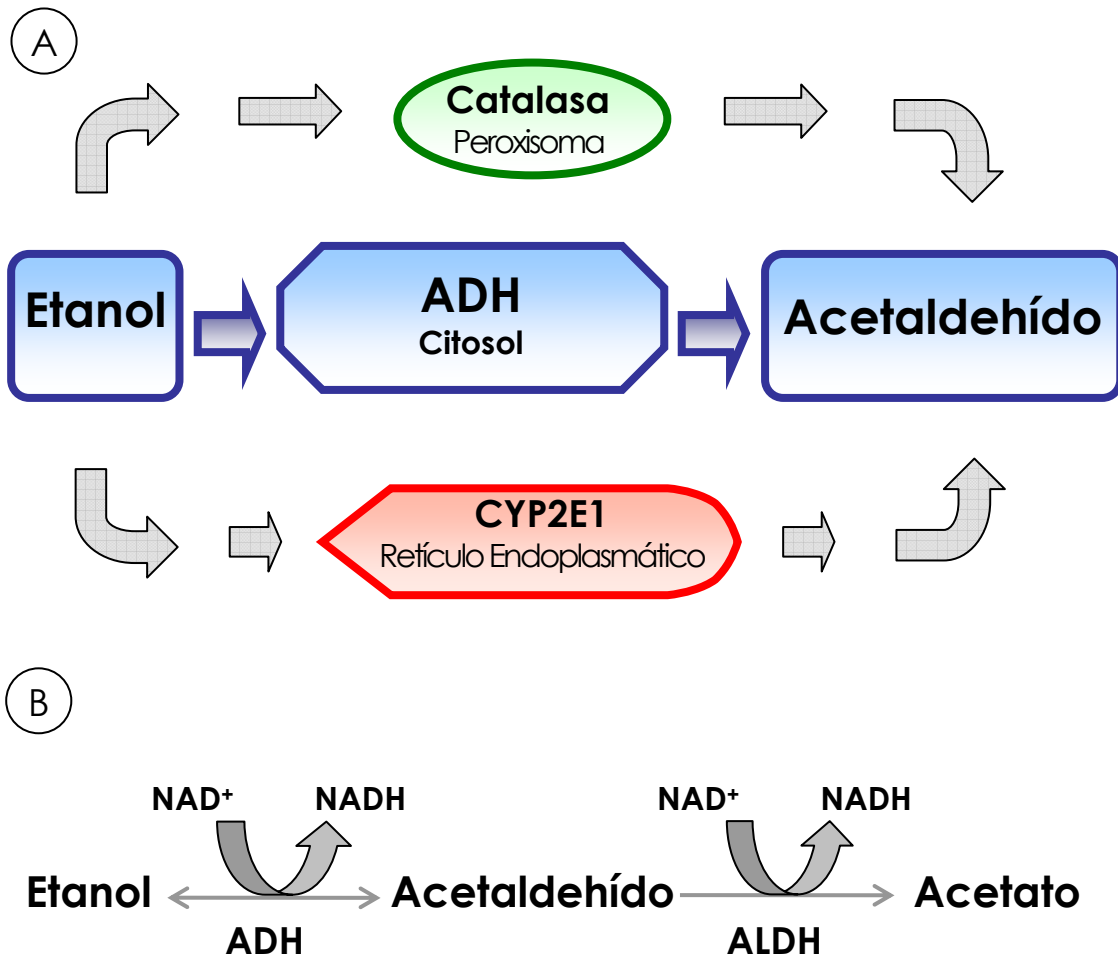
El alcohol (etanol) ingerido es absorbido por la mucosa gástrica y después, rápidamente por el intestino delgado proximal que presenta una mayor superficie de absorción (Umulis y cols., 2005). Se distribuye por los tejidos siguiendo el espacio del agua corporal (su coeficiente de partición agua/lípidos es de 2100/1) y es degradado esencialmente por oxidación hepática en un 90%, siendo solamente un 10% eliminado por vías accesorias como el riñón (orina) y el pulmón (aire expirado) (Brecher y cols., 1997; Lands, 1998; Umulis y cols., 2005).

El metabolismo hepático del etanol se puede dividir en 2 grandes etapas. La primera etapa de su metabolismo (Figura 1.1A) constituye la oxidación del etanol a acetaldehído, de la cual tres vías enzimáticas son las responsables: i) la enzima deshidrogenasa alcohólica citosólica (ADH), ii) el sistema microsomal que oxida etanol (CYP2E1) ubicado en el retículo endoplasmático liso, y iii) la catalasa ubicada en los peroxisomas (Lieber, 1999). De estas tres vías, la ADH es la enzima que principalmente metaboliza el etanol a acetaldehído (Matsumoto y Fukui, 2002).

El acetaldehído generado (Figura 1.1B) es rápidamente oxidado a acetato por la deshidrogenasa aldehídica (ALDH2) de baja  $K_m$  presente en la mitocondria (Farres y



cols., 1989; Huang y Lindahl, 1990; Svanas y Weiner, 1985; Thomasson y cols., 1991). Tanto la ADH como la ALDH2 utilizan como cofactor en sus reacciones de oxidación a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) (Svanas y Weiner, 1985; Sheikh y cols., 1997), generando NADH.



**Figura 1.1: Esquema general del metabolismo del etanol en el hígado.**

**A) Vías enzimáticas de la oxidación de etanol a acetaldehído.** La mayoría del etanol ingerido es metabolizado en el hígado mediante varias vías enzimáticas. En el citosol, la deshidrogenasa alcohólica (ADH) oxida el etanol a acetaldehído. El sistema microsomal (CYP2E1) metaboliza una porción del etanol en el retículo endoplasmático. La enzima catalasa de los peroxisomas, constituye una tercera vía metabólica menor del etanol. **B) Segunda etapa del metabolismo del etanol: deshidrogenasa aldehídica mitocondrial.** El acetaldehído formado mayormente por la ADH es oxidado a acetato en la mitocondria por la enzima deshidrogenasa aldehídica (ALDH). Las enzimas deshidrogenasa alcohólica y la deshidrogenasa aldehídica utilizan a la nicotinamida adenina dinucleótido como cofactor.

En el hígado, se han descrito varias isoenzimas tanto para la ADH como para la ALDH (Yoshida y cols., 1998), en que solamente algunas son responsables del metabolismo del etanol proveniente de las bebidas alcohólicas y consideradas como protectoras contra el alcoholismo.

### **1.3.1 Deshidrogenasa Alcohólica**

Hasta el año 1989 se habían descrito 20 isoenzimas distintas para la ADH humana (Lands, 1998; Matsuo y cols., 1989) que se han clasificado en siete clases según la homología de sus secuencias aminoacídicas y características cinéticas (Duester y cols, 1999; Galter y cols., 2003). Estas proteínas se ubican en el citoplasma y consisten en enzimas homo- y heterodiméricas dependientes de  $\text{NAD}^+$  con subunidades de una masa molecular de 40 kDa (Duester y cols, 1999; Galter y cols., 2003; Chambers y cols., 2002). De las siete clases descritas, las ADHs de la clase I son las responsables de la mayor parte del metabolismo del etanol debido a que poseen una  $K_m < 5 \text{ mM}$  para etanol (Lands, 1998). Tales enzimas están codificadas en tres genes distintos (*ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*), siendo el gen *ADH1A* exclusivo del tejido hepático fetal. El gen de la *ADH1B* posee tres variantes polimórficas (*ADH1B\*1*, *ADH1B\*2* y *ADH1B\*3*), encontrándose el alelo *ADH1B\*1* predominantemente en caucásicos, el alelo *ADH1B\*2*, en la población oriental (Matsuo y cols., 1989) y el alelo *ADH1B\*3* en africanos (Chen y cols., 1999). El gen de la *ADH1C* posee dos variantes polimórficas (*ADH1C\*1* y *ADH1C\*2*). En la población asiática se encuentra principalmente la variante *ADH1C\*1*, mientras que en caucásicos ambas variantes se encuentran distribuidas de igual manera (Chen y cols., 1999).

De las variantes descritas anteriormente, la *ADH1B\*2* y *ADH1C\*1* se encuentran en mayor proporción en la población alcohólica del Asia del Este, chinos, coreanos y japoneses (Chen y cols., 1999; Thomasson y cols., 1991; Tanaka y cols., 1996).

En un meta-análisis de 48 estudios publicado recientemente por Zintzaras y cols. (2006), se encontró que las variantes *ADH1B\*1* y *ADH1C\*2* (de actividades bajas) se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar el alcoholismo, versus las variantes *ADH1B\*2* y *ADH1C\*1* (de actividades altas), que son protectoras.

### **1.3.2 Deshidrogenasa Aldehídica**

De los 12 genes descritos para la ALDH humana solamente 8 son hepáticas (Vasiliou y cols., 1999). Las diferencias principales que presentan incluyen diferencias en propiedades enzimáticas, ubicación subcelular y distribución tisular (Yoshida y cols., 1998). Estas proteínas se encuentran en citoplasma, mitocondria y en la fracción microsomal y consisten en enzimas homodiméricas u homotetraméricas en que cada subunidad es de aproximadamente 500 residuos aminoácidos (Yoshida y cols., 1998).

En los estudios de metabolización hepática del alcohol, la ALDH se ha clasificado según su afinidad por el acetaldehído (Weiner, 1979). Las ALDHs de  $K_m$  alta ( $K_m \geq 1$  mM) corresponden a la ALDH1 que se ubica en el citosol y las ALDHs de  $K_m$  baja ( $K_m \leq 1$   $\mu$ M) a la ALDH2 que se encuentra en la matriz mitocondrial y es la principal responsable de la oxidación de acetaldehído a acetato (Feldman y Weiner, 1972; Tank y cols., 1981; Klyosov y cols., 1996; Zhou y Weiner, 2000). Ambas enzimas consisten en homotetrámeros con una masa molecular de 220 kDa en que cada subunidad

presenta una masa molecular aproximada de 55 kDa (Feldman y Weiner, 1972; Crabb y cols., 1989; Guan y cols., 1988).

Se ha descrito que el gen de la ALDH2 da origen a dos variantes alélicas en la población, la *ALDH2\*1* y la *ALDH2\*2*. En un meta-análisis realizado por Zintzaras y cols. (2006) se ha relacionado al alelo *ALDH2\*1* (que codifica una enzima activa) directamente con el mayor riesgo de desarrollar el alcoholismo, versus el alelo *ALDH2\*2* (que codifica una enzima virtualmente inactiva) que es protector.

En los estudios realizados por Klyosov y cols., (1996) se ha establecido una  $K_m$  para acetaldehído a pH 7,5 de 0,2  $\mu\text{M}$  para la ALDH2\*1 humana mientras que la  $K_m$  para acetaldehído de la enzima citosólica (ALDH1) es de 180  $\mu\text{M}$ . Para que la ALDH1 participe significativamente en la oxidación del acetaldehído, la concentración de este metabolito debe aumentar considerablemente (5–10 veces) por sobre la concentración normal de la célula. Este aumento se ha descrito cuando la actividad de la ALDH2 está reducida debido a la presencia dominante negativa del alelo *ALDH2\*2* (Harada y cols., 1982; Thomasson y cols., 1991).

#### **1.4 ALDH2 Y SU DEFICIENCIA GENÉTICA**

La ALDH2 humana es una enzima ubicua encontrándose en el hígado, corazón, cerebro, pulmón, músculo esquelético, riñón y páncreas con los niveles más altos en hígado, riñón, pulmón y músculo esquelético y cardíaco (Stewart y cols., 1996).

Se ha descrito que la presencia de una mutación puntual en el gen de la ALDH2, esta asociada a niveles elevados de acetaldehído circulante luego de la ingesta de bebidas alcohólicas, que llevan al desarrollo de un marcado enrojecimiento facial (Yoshida y cols., 1984). La sensibilidad al alcohol descrita en los individuos que portan este gen

mutado se debe a una sustitución puntual en la proteína madura del aminoácido en posición 487 correspondiente a glutamina, que es reemplazada por lisina (Farres y cols., 1994). Los individuos que portan esta mutación, tienen una enzima cuya capacidad para oxidar el acetaldehído a acetato está muy reducida por lo que al ingerir bebidas alcohólicas los niveles plasmáticos de acetaldehído aumentan hasta 20 veces por sobre lo normal (Adachi y cols., 1989). Las consecuencias que trae el aumento de los niveles de acetaldehído son vasodilatación cutánea (enrojecimiento facial), taquicardia, náuseas, mareos y, en algunos individuos, vómitos (Harada y cols., 1982; Mizoi y cols., 1983) lo que lleva al rechazo del alcohol por parte del individuo (aversión) y a una protección contra el desarrollo del alcoholismo (Zintzaras y cols., 2006).

En las condiciones existentes *in vivo*, la proteína ALDH2\*2 es inactiva porque las concentraciones celulares del cofactor NAD<sup>+</sup> son aproximadamente 15 veces más bajos que su valor de K<sub>m</sub> (Farres y cols., 1994; Zhou y Weiner, 2000). La presencia de esta mutación con características de dominante, genera heterocigotos *ALDH2\*1/ALDH2\*2* con una actividad que es solamente un 15% de aquella de los homocigotos *ALDH2\*1/ALDH2\*1* (Enomoto y cols., 1991; Xiao y cols., 1996).

La prevalencia del alcoholismo en individuos que portan el alelo *ALDH2\*2* es de un 75 – 90% menor que en los individuos que portan solamente la forma *ALDH2\*1* activa (Harada y cols., 1982; Thomasson y cols., 1991; Higuchi, 1994). Otros estudios muestran que los heterocigotos *ALDH2\*1/ALDH2\*2* de origen asiático nacidos en Canadá o en los Estados Unidos consumen dos tercios menos alcohol que los homocigotos *ALDH2\*1*, mientras que los homocigotos *ALDH2\*2* respectivos son virtualmente abstemios (Tu e Israel, 1995). Estos individuos no presentan problemas

fisiológicos ni un desarrollo anormal por lo que probablemente la ALDH2 no sea esencial para la supervivencia (Yoshida y cols., 1998; Luo y cols., 2005).

## **1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

La manifestación del alcoholismo entre individuos es muy variable por lo que el tratamiento a seguir es específico para cada paciente. Para ello es necesario basarse en el historial de la persona, la decisión de la persona por recuperarse y el entorno que lo rodea (Pettinati y Rabinowitz, 2005). Establecido los antecedentes personales, el tratamiento a seguir involucra las etapas de privación y desintoxicación del individuo y a continuación, desarrollar una abstinencia o una reducción substancial de la ingesta de alcohol en combinación con una intervención psicosocial, modalidades farmacológicas o la combinación de ambas (Garbutt y cols., 1999).

Hasta la fecha existen tres medicamentos aceptados por la FDA (*Food Drug Administration*) para tratar el alcoholismo en los Estados Unidos que son el disulfiram, la naltrexona y el acamprosato (Pettinati y Rabinowitz, 2005).

### **1.5.1 Disulfiram (Antabus®)**

El tratamiento con disulfiram en los Estados Unidos ha sido aceptado desde el año 1954. Este fármaco actúa de manera inespecífica inhibiendo a todas las deshidrogenasas aldehídicas debido a la interacción de su metabolito con los grupos sulfhidrilos de la enzima (Weiner, 1979). Al inhibirse la deshidrogenasa aldehídica de tipo 2 (ALDH2), enzima necesaria para metabolizar el acetaldehído, se acumula este producto que causa los efectos disfóricos y aversivos luego de la ingesta. La combinación disulfiram-alcohol genera náuseas, vómitos y rubor facial que son

análogos a los producidos por la deficiencia genética presentada en la población asiática.

Este profármaco, debe ser metabolizado en el hígado a su forma activa (S-metil N,N-ditiocarbamato sulfóxido) para inhibir a la enzima ALDH2 (Madan y cols., 1995; Mays y cols., 1996), lo que se traduce en una marcada variación terapéutica entre los pacientes por lo que la dosis recomendada de 250 mg podría no ser suficiente para inducir un efecto aversivo en todos los individuos (Fuller y Gordis, 2004).

En un estudio realizado por Brewer y cols. (2000) en que se analizaron 13 estudios clínicos supervisados y 5 estudios clínicos no supervisados, algunos pacientes no pudieron generar concentraciones plasmáticas elevadas del metabolito activo para inactivar a la ALDH2 de manera adecuada incluso a dosis altas del fármaco. A una dosificación mayor a 500 mg, se podrían producir efectos adversos como la interacción con otros fármacos, psicosis y neuropatías (Brewer y cols., 2000; Williams, 2005).

En el año 2004, Fuller y Gordis recopilaron los estudios realizados con disulfiram luego de 60 años de su aceptación en el tratamiento contra el alcoholismo. En este estudio, se establece que el tratamiento con disulfiram es poco efectivo puesto que debe existir un compromiso por parte del paciente para medicarse. Solamente en los estudios en que ha existido una supervisión por parte de familiares cercanos o profesionales (Brewer y cols., 2000), los efectos colaterales y adversos asociados a una dosificación inadecuada e ingesta irregular del fármaco se han controlado, demostrado la efectividad del medicamento en tratar el alcoholismo lo que se ha traducido en un aumento significativo en los días de sobriedad.

### 1.5.2 Naltrexona (Revia® o Nalerona®)

La naltrexona, un inhibidor de los receptores de endorfinas, se utilizó inicialmente para tratar a los individuos que dependían de opiáceos. En el año 1994, la FDA aceptó el tratamiento de pacientes alcohólicos con naltrexona a partir de los buenos resultados obtenidos en los estudios preclínicos. Actualmente, este fármaco también está siendo utilizado en el tratamiento del alcoholismo en Australia, Canadá y en varios países europeos (Pettinati y Rabinowitz, 2005). Para aumentar la adhesión del paciente al uso de tal medicamento, recientemente se ha desarrollado una forma inyectable de duración de un mes (*vide infra*).

El consumo de alcohol genera efectos análogos a los producidos por la morfina debido al aumento de la liberación de endorfinas desde las neuronas para finalmente desinhibir las neuronas dopaminérgicas (Kenna y cols., 2004). El individuo al ingerir alcohol afecta la producción, liberación y actividad de las endorfinas, las cuales son indirectamente responsables de los efectos placenteros del alcohol (Krystal y cols., 2001). La naltrexona es un antagonista de los receptores de las endorfinas y el mecanismo por el cual disminuye la ansiedad por el consumo de alcohol es bloqueando la unión de las endorfinas por parte de sus receptores lo que atenuaría la liberación de dopamina responsable de los efectos placenteros del alcohol (Litten y cols., 1996; Williams, 2005). Tal mecanismo llevaría a reducir los efectos placenteros del etanol.

Hasta el momento, la administración de este fármaco es por vía oral lo que está asociado a reacciones gastrointestinales (Croop y cols., 1997). Para superar estos inconvenientes en el año 2004 se ha descrito una versión de larga duración de



naltrexona que es inyectable, durando cada inyección aproximadamente 30 días cuyos efectos adversos están minimizados (Johnson y cols., 2004; Garbutt y cols., 2005). La FDA de los EE.UU. aprobó su uso en Abril de 2006.

### **1.5.3 Acamprosato (Campral®)**

En Europa, este medicamento para tratar el alcoholismo ha sido usado por más de 20 años y solamente en el año 2004 ha sido aprobado su uso en los EE.UU.. Este fármaco se ha utilizado para mantener la abstinencia del consumo de alcohol y aliviar los efectos de intoxicación y algunos síntomas de privación. Se ha descrito que este fármaco actuaría bloqueando el receptor glutaminérgico-N-metil-D-aspartato (NMDA), limitando la hiperexcitabilidad de las neuronas debido a la privación del alcohol (Litten y cols., 1996; Johnson y Ait-Daoud, 2000). La vida media de este fármaco es aproximadamente de 12 horas y es excretado principalmente por vía renal dando una gran ventaja para los pacientes con daño hepático (Kenna y cols., 2004). No se han descrito interacciones con otros fármacos y los efectos adversos incluyen mareos y problemas estomacales menores. Uno de los mayores problemas de este medicamento es que debe ser ingerido 3 veces al día (Paille y cols., 1995).

Debido a que el alcoholismo es una enfermedad compleja, se han probado distintas combinaciones de estos fármacos: disulfiram actúa generando un rechazo marcado en el consumo del alcohol, acamprosato aparentemente es más eficaz en el desarrollo de una abstinencia y naltrexona en controlar el consumo del alcohol. Estas combinaciones han dado muy buenos resultados solamente si el tratamiento ha sido supervisado por profesionales para asegurar la ingesta diaria de los fármacos. Una discusión comparativa de la eficiencia de estos medicamentos se encuentra en la discusión.

## 1.6 DESARROLLO DE UNA TERAPIA GÉNICA PARA EL ALCOHOLISMO

En los últimos años han surgido varias técnicas para modular la expresión de genes específicos relacionados con el desarrollo de diversas patologías. Mediante la terapia génica, se han utilizando distintas estrategias para transferir genes completos o segmentos de ellos al interior de las células para regular genes (Strachan y Read, 1999).

Una de las evidencias más directas de una protección génica en desarrollar una enfermedad como el alcoholismo es la protección innata debido a la presencia de una mutación en un solo gen (Harada y cols., 1982; Thomasson y cols., 1991). Las primeras aproximaciones para desarrollar una terapia génica contra el alcoholismo se realizaron en el año 2001 en que se utilizaron oligonucleótidos fosforotioato de antisentido dirigidos en contra de la ALDH2<sup>1</sup> hepática (Garver y cols., 2001).

Estos fosforotioatos de antisentido, redujeron *ex vivo* e *in vivo* los niveles del mRNA de la ALDH2 y la actividad de la ALDH2, por lo que ratas de la cepa Lewis disminuyeron su consumo de alcohol en dos tercios con respecto a los animales controles. Además, se produjo un aumento en los niveles de acetaldehído sanguíneo en 3 a 4 veces al administrarse etanol, imitando el fenotipo asiático ALDH2\*2 de baja actividad (Garver y cols., 2001). La desventaja del uso de fosforotioatos de antisentido es una vida media de 48 horas en animales (Zhang y cols., 1996) a 6 días en humanos (Bayever y cols., 1993) y el hecho que tales compuestos no son absorbidos por la vía oral.

## 1.7 TERAPIA GÉNICA CON VECTORES ADENOVIRALES

Los vectores adenovirales han sido descritos como los vehículos de transferencia génica más eficientes tanto *in vitro* como *in vivo* (Morsy y Caskey, 1999) puesto que, presentan una maquinaria específica para entregar DNA a las células (Verma y Somia, 1997). Una característica de gran relevancia de estos vectores es su tropismo natural por el hígado. Según los resultados obtenidos por Krasnykh y cols. (2000), después de la administración intravenosa de vectores adenovirales *in vivo* se observó que la mayoría se encontraban en el hígado.

En los primeros estudios en que se utilizaron vectores adenovirales para la transferencia de genes, se observó que el factor que reducía la duración de la expresión del transgen era la inmunogenicidad (Yang y cols., 1994; Dai y cols., 1995) lo que está directamente relacionado con la expresión (aunque mínima) de proteínas virales (Stephenson, 2001; Brenner, 2000; Sandig y cols., 2000). Para minimizar una respuesta inmune por parte del hospedero los vectores adenovirales utilizados en terapia génica han sido manipulados para dar origen a los vectores virales que son totalmente carentes de genes virales, o vectores adenovirales “destripados” (Russell, 2000).

Los vectores adenovirales de primera generación se caracterizan por presentar una delección en el gen temprano *E1* que es responsable de la iniciación de la expresión de los otros genes virales (He y cols., 1998). Sin embargo en estudios realizados con estos vectores *in vivo*, se observó que la expresión del transgen era transitoria debido a la respuesta inmune generado principalmente en contra de las proteínas de la

cápside viral que siguen siendo sintetizadas en pequeñas cantidades a pesar de la falta de *E1* (Gao y cols., 2000).

En los estudios de Morral y cols. (1999), se ha descrito la duración del efecto de vectores adenovirales de primera generación de 1 a 2 meses. Para aumentar el tiempo de expresión del transgen, se desarrollaron vectores adenovirales a los que se delecionaron genes adicionales (Engelhardt y cols., 1994) dejando finalmente, solamente los elementos que definen el comienzo y el término del genoma ITR (repeticiones terminales invertidos) y la secuencia de empaquetamiento viral  $\Psi$  (Wang y Huang, 2000; Sandig y cols., 2000). Estos vectores de tercera generación o “destripados” (Hardy y cols., 1997; Morsy y cols., 1998) expresan sus transgenes en el hígado por uno a dos años (Chen y cols., 1997; Morsy y cols., 1998; Morral y cols., 1999). Sin embargo, la efectividad de una administración repetida es reducida por la inmunidad desarrollada a la cápside viral administrada, aunque ésta no es sintetizada en el hospedero por falta de genes virales que la codifiquen (Parks y cols., 1996). Existe sin embargo la posibilidad de usar un inmunosupresor por sólo dos a tres días antes de la administración del virus (Lieber y cols., 1997; Wolf y cols., 1997) o la posibilidad de cambiar el serotipo de la cápside adenoviral (Morral y cols., 1999).

## **1.8 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL ALCOHOLISMO**

Los estudios con animales han ayudado a descifrar los factores genéticos involucrados en un alto consumo de bebidas alcohólicas. En el campo del alcoholismo, en estudios con ratas se ha visto que existen cepas que prefieren beber soluciones que contienen alcohol a beber agua y cepas que rechazan el alcohol. Frente a una marcada preferencia por consumir esta bebida que contiene alcohol, se han realizado por años

cruzamientos selectivos llegando a establecer finalmente líneas de ratas que prefieren o rechazan el alcohol. Una línea de rata reconocida en el campo del alcoholismo, es la desarrollada por Mardones y Segovia-Riquelme (1983) en la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile. Las líneas de ratas que prefieren consumir alcohol presentan una característica común que es consumir más de 5 g de etanol por kilogramo de peso corporal por día cuando una solución de alcohol (10% vol./vol.) es presentada durante 24 horas como alternativa al consumo de agua también presente (Lumeng y cols., 1995). Esta cualidad de un alto consumo de alcohol lo presentan las ratas de la Universidad de Chile Bebedoras (UChB) (Mardones y Segovia-Riquelme, 1983).

En la rata tanto como en el hombre, la ALDH2 presenta una  $K_m$  baja para acetaldehído y una estructura tetramérica conservada con unidades iguales de aproximadamente 55 kDa (Feldman y Weiner, 1972; Guan y cols., 1988; Xiao y cols., 1996). La ALDH2 hepática de rata y humana presentan más de un 80% de secuencia nucleotídica idéntica y una homología aminoacídica mayor al 90% (Farres y cols., 1989; Chang y Yoshida, 1994). Se ha descrito que las ratas presentan una ALDH1 de muy baja actividad por una delección en el promotor del gen que la codifica (Chen y cols., 1996) y debido a que presentan una  $K_m$  para acetaldehído de 17  $\mu$ M, el acetaldehído generado es oxidado principalmente por la ALDH2 en la rata tanto como en el hombre (Klyosov y cols., 1996; Yoshida y cols., 1984). Esta baja actividad de la ALDH1 citosólica hace que la rata sea un excelente modelo para estudiar el consumo de alcohol puesto que la metabolización del alcohol ingerida es análoga a la descrita en los humanos que presentan una ALDH1 de muy alta  $K_m$  (Klyosov y cols., 1996) y por consiguiente, virtualmente no metabolizan acetaldehído por esta ruta.

## 2. HIPÓTESIS GENERAL

La transducción de hepatocitos con vectores adenovirales que contienen el gen que codifica un RNA de antisentido contra el mensajero deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (*Aldh2*<sup>1</sup>), imitan el fenotipo asiático porque disminuyen la expresión del gen de la ALDH2<sup>1</sup>, reducen la actividad enzimática de ALDH2<sup>1</sup>, presentan altos niveles de acetaldehído al consumir etanol y resultan en un bajo consumo voluntario de alcohol en animales.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* e *in vivo* si la expresión de la ALDH2<sup>1</sup> hepática es inhibida por la transducción de vectores adenovirales que codifican un RNA de antisentido contra el mensajero de la ALDH2<sup>1</sup> y determinar si el consumo de alcohol por animales que han recibido tales vectores virales se encuentra disminuido.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Hipótesis #1: Estudios *in vitro*.** La transducción a células de hepatoma de rata de un vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido contra el mRNA de la ALDH2<sup>1</sup>, reduce la actividad de la ALDH2<sup>1</sup> y aumenta los niveles de acetaldehído en presencia de alcohol.

**Objetivos Específicos:** Determinar *in vitro* si el vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido de la ALDH2<sup>1</sup>:

**#1a:** reduce la actividad de la ALDH2<sup>1</sup>,

**#1b:** aumenta los niveles de acetaldehído en células de hepatoma de rata incubadas con alcohol y,

**#1c:** no altera los niveles de mRNA de la ALDH2<sup>1</sup>.

**Hipótesis #2: Estudios *in vivo*.** La administración a ratas de un vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido de la ALDH2<sup>1</sup>, reduce la actividad de la ALDH2<sup>1</sup> hepática, eleva los niveles de acetaldehído al administrar alcohol y disminuye el consumo voluntario de etanol de los animales.

**Objetivos Específicos:** Determinar *in vivo* si la administración a ratas de un vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido de la ALDH2<sup>1</sup>:

**#2a:** reduce la actividad de la ALDH2<sup>1</sup> hepática,

**#2b:** resulta en un aumento en los niveles de acetaldehído plasmático luego de la administración de alcohol y,

**#2c:** reduce el consumo voluntario de etanol de los animales.

## 5. MATERIALES

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

**Animales:** Se utilizaron ratas hembras de la línea UChB (Universidad de Chile Bebedora) del genotipo *Aldh2<sup>1</sup>/Aldh2<sup>1</sup>* de 200–300 g provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, siguiendo las normas institucionales para el manejo de animales de experimentación.

### 5.2 ENZIMAS

Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizaron con transcriptasa inversa de M-MLV y las de polimerización en cadena (PCR) con la DNA polimerasa Taq, ambas se adquirieron en Promega (Madison, WI, EE.UU.). Para asegurar la pureza del RNA extraído, se utilizó la enzima DNasa RQ1 de Promega (Madison, WI, EE.UU.).

### 5.3 PLASMIDIOS

**p19NSALDH:** plasmidio que codifica el cDNA de la deshidrogenasa aldehídica de hígado de rata Sprague Dawley que incluye la región codificante para el péptido señal (Jeng y Weiner, 1991). Gentileza de Dr. Henry Weiner, Purdue University.

**pACCMVpLpARS:** vector de transferencia para construir adenovirus recombinantes mediante cotransfección de células 293 con pJM17 (Becker y cols., 1994). Gentileza de Hernán Grenett, Universidad de Alabama.

**pJM17:** plasmidio genómico para construir adenovirus recombinantes. Porta todos los genes adenovirales excepto el gen temprano *E1*. Fue adquirido a Microbix Biosystems (Toronto, Ontario, Canadá).



## 5.4 VECTORES ADENOVIRALES

Se utilizaron vectores adenovirales de primera generación en los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

**AdV-AS:** el vector codifica el cDNA de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata que esta en orientación antisentido (ALDH2-AS). El cDNA de la ALDH2 de 1862 nt que incluye el péptido señal (nt 30 al 1891 del archivo GenBank X14977), se encuentra invertido con respecto al promotor de citomegalovirus (CMV) y la señal de poliadenilación de SV40. Construido por Eduardo Karahanian (Karahanian y cols., 2005).

**AdV-vacío:** este vector adenoviral ("*helper*") donado por Merck (H14), presenta la secuencia de señal de empaquetamiento  $\psi$  (*psi*) flanqueado por sitios loxP además de una delección en el gen *E1* (gen temprano 1). En la región correspondiente al gen *E3* (gen temprano 3), contiene secuencias intrónicas para llevarlo al tamaño de 35,8 kb (Sandig y cols., 2000).

**AdV-GFP:** este vector adenoviral de primera generación contiene el gen que codifica y expresa la proteína fluorescente verde bajo el promotor CMV (Williams y cols., 2004).

## 5.5 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los partidores se sintetizaron en Oligopéptido, Centro de Síntesis de Biomoléculas, Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte.

### 5.5.1 Deshidrogenasa aldehídica

Para las reacciones de transcripción inversa, se utilizaron los partidores TG-171 (Tabla 5.1) para generar el cDNA de la ALDH2 antisentido (expresado por el vector adenoviral), y el partidador TG-184 para generar el cDNA de la ALDH2 sentido endógeno

de las células de hepatoma de rata. Como control de la reacción de RT, se utilizó el partidor TG-78 para generar el cDNA de  $\beta$ -actina de rata (Tabla 5.2).

En las reacciones de polimerización en cadena se utilizaron las parejas de partidores TG-171 y TG-184 para la obtención de los cDNAs de la ALDH2 sentido y antisentido (Tabla 5.1). La pareja de partidores TG-77 y TG-78 se utilizaron para la generación de cDNAs de  $\beta$ -actina de rata (Tabla 5.2).

En algunas reacciones de PCR se utilizaron para la generación del cDNA de la ALDH antisentido distintas parejas de partidores manteniendo siempre el partidor único de la RT es decir, las parejas: TG-2 y TG-171, TG-24 y TG-171, TG-36 y TG-171 y TG-100 y TG-171. Los oligonucleótidos TG-2, TG-24, TG-36 y TG-100 hibridan a distancias crecientes del sitio de unión de TG-171.

**Tabla 5.1.**

**Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la deshidrogenasa aldehídica invertida contenida en el vector adenoviral y ALDH2 endógena de las células H4-II-E-C3**

| Partidor      | Secuencia 5'→3'             | Ubicación <i>Aldh2</i> | Tm   |
|---------------|-----------------------------|------------------------|------|
| TG-2          | GTT GTC CAG GGT CTC CAA GG  | 418 – 399              | 64°C |
| TG-24         | ATC GAT GGG AAT GGT TTT CC  | 529 – 510              | 58°C |
| TG-36         | CCT CAG TGG AAC CTG TGA AGG | 833 – 813              | 66°C |
| TG-100        | CCG ACC ACC CGA GAC TTG     | 1083 – 1066            | 60°C |
| <u>TG-171</u> | CCC GCC GTG GGC CAC GCC TGA | 57 – 77                | 76°C |
| <u>TG-184</u> | GTT CTT CTG AGG CAC TTT GAC | 1584 – 1564            | 62°C |

Los oligonucleótidos listados se utilizaron para amplificar la ALDH2 de rata proveniente de las células H4 y el cDNA de la ALDH2 en posición antisentido contenida en el vector adenoviral mediante la técnica de RT-PCR. Los partidores subrayados se utilizaron tanto en la reacción de transcripción inversa como en la reacción de polimerización en cadena.

**Tabla 5.2.****Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la  $\beta$ -actina de rata**

| Partidor     | Secuencia 5'→3'            | Ubicación $\beta$ -actina | Tm   |
|--------------|----------------------------|---------------------------|------|
| TG-77        | TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC | 262 – 281                 | 62°C |
| <u>TG-78</u> | GGA TCT TCA TGA GGT AGT CT | 2371 – 2352               | 58°C |

Los oligonucleótidos listados se utilizaron para amplificar la  $\beta$ -actina de rata proveniente de las células H4 mediante la técnica de RT-PCR. El partidor subrayado se utilizó tanto en la reacción de transcripción inversa como en la reacción de polimerización en cadena.

**5.5.2 2'-5'A oligonucleótido sintetasa**

En los estudios *in vivo* con ratas UChB mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa, se estudió la expresión de la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa. Para la reacción de transcripción inversa, se utilizó el partidor poli(dT). En las reacciones de PCR se utilizó la pareja de partidores TG-347 y TG-348 para la obtención del cDNA de la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa (Tabla 5.3). Como control interno de la reacción de RT-PCR, se utilizaron los partidores descritos previamente en la Tabla 5.2 que corresponden a partidores específicos para  $\beta$ -actina de rata.

**Tabla 5.3.****Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa de rata**

| Partidor | Secuencia 5'→3'            | Ubicación 2'-5'A | Tm   |
|----------|----------------------------|------------------|------|
| TG-347   | GCA GGA CCT TGA CAC AGT GA | 1198 – 1218      | 62°C |
| TG-348   | GTG GAC GGT CAG ATG GAA GT | 1360 – 1340      | 62°C |

Los oligonucleótidos listados se utilizaron para amplificar la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa de rata proveniente de muestras hepáticas de ratas UChB mediante la técnica de RT-PCR.

## **5.6 REACTIVOS Y MATERIALES GENERALES**

### **5.6.1 Cultivo Celular**

Las líneas celulares de hepatoma de rata H4-II-E-C3 (CRL-1600) y células embrionarias humanas de riñón (HEK) 293 (CRL-1573) se adquirieron en la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). El material plástico estéril utilizado para amplificar los distintos cultivos es Sarsted (Newton, NC, EE.UU.). De GibcoBRL. Life Technologies se adquirieron tripsina-EDTA, los antibióticos penicilina y estreptomycinina y el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). El suero fetal bovino caracterizado y suero de equino definido son de Hyclone (Logan, UT, EE.UU.). Las placas de 6 pocillos de poliestireno para cultivo celular en que se realizaron los experimentos con las células H4-II-E-C3 y las placas de 100 mm en que se amplificaron las células 293 para preparar vectores adenovirales son Corning (Corning Inc. NY, EE.UU.).

### **5.6.2 Reactivos Químicos Generales**

Los siguientes reactivos se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.): bicarbonato de sodio, Trizma base, Triton X-100, bromuro de etidio, EDTA (sal disódica dihidrato), acetaldehído y propionaldehído (99,8% por ensayo), acetato de sodio, 4-metil-pirazol, 2,4-dinitrofenilhidrazona,  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, trietanolamina, acetato de amonio, Tris-HCl y azul de tripano. La ampicilina (sal sódica) se adquirió a Calbiochem (Darmstadt, Alemania) y a Mallinckrodt (Xalostoc, DF, Méjico) el cloruro de sodio. Los ácidos, solventes orgánicos e inorgánicos restantes se adquirieron a Fisher Scientific (Pittsburg, PA) o a Merck (Darmstadt, Alemania).

### 5.6.3 Reactivos para biología molecular

Los reactivos adquiridos a GibcoBRL. Life Technologies (Bethesda, MD, EE.UU.) son agarosa ultra pura, dodecil sulfato de sodio (SDS), TRIZOL y fenol ultra puro. La agarosa Nusieve GTC se adquirió en FMC (Rockland, Maine, EE.UU.). La película 667 es Polaroid (St. Albans, Hertfordshire, Inglaterra). En Promega (Madison, WI, EE.UU.) se adquirieron el marcador de peso molecular de DNA "1 kb ladder", dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

El agua desionizada se obtuvo a partir de agua destilada con un purificador Barnstead NANOpure Infinity D8982-33 (18 MΩ – cm) (Dubuque, IA, EE.UU.).

## 5.7 SOLUCIONES Y TAMPONES

**Tampón TAE:** Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3.

**PBS:** NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM.

**Tampón de diálisis:** Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 2 mM.

**Tampón de almacenamiento:** Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; sacarosa 5%.

**Tampón de lisis:** 0,1% SDS; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. PRODUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL DE PRIMERA GENERACIÓN ANTI-DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA

Para la generación de un vector adenoviral que contiene el gen *Aldh2* en orientación invertida, el cDNA de la ALDH2 de rata de 1862 nucleótidos (nt 30 al 1891 del archivo GenBank X14977) se extrajo mediante digestión con la enzima de restricción *Xba* I desde el plasmidio p19NSALDH (Jeng y Weiner, 1991). Este fragmento de 1,9 kb se clonó en el sitio único *Xba* I del plasmidio pACCMVpLpARS (Becker y cols., 1994; gentileza de Hernán Grenett, Universidad de Alabama; GenBank AY590429) y la orientación invertida con respecto al promotor de citomegalovirus (CMV) se verificó mediante la digestión con enzimas de restricción. El RNA antisentido generado tiene 2337 nt, de los cuales 71 nt se encuentran entre el promotor de CMV y el cDNA de la ALDH2 invertida y 404 nt entre el cDNA del inserto hasta la señal de poliadenilación de SV40. Los 71 nt del extremo 5', constan de 47 nt de pACCMVpLpARS y 24 nucleótidos del plasmidio p19NSALDH. Los 404 nt ubicados en el extremo 3' del cDNA de la ALDH2 consisten en 39 nucleótidos del plasmidio p19NSALDH y 365 nt del plasmidio pACCMVpLpARS.

Para producir el vector adenoviral de primera generación, células 293 se cotransfectaron mediante la técnica de fosfato de calcio (Becker y cols., 1994) con 10 µg de pACCMVpLpARS que contiene el cDNA ALDH2 antisentido y 10 µg del plasmidio pJM17 que contiene todos los genes virales excepto *E1*. Las células cotransfectadas se incubaron durante dos semanas tiempo necesario para la recombinación homóloga y la liberación de la partícula viral al medio de cultivo. Luego, cultivos de células 293 se infectaron con los vectores adenovirales recombinantes

generados para amplificarlos (Becker y cols., 1994). La estructura de este vector se verificó mediante mapas de restricción del DNA viral y por Southern Blot usando el cDNA ALDH2 como sonda.

## **6.2. CULTIVOS DE CÉLULAS EMBRIONARIAS HUMANAS DE RIÑÓN (HEK) 293**

Se utilizaron cultivos de células 293 (ATCC CRL-1573) para amplificar los distintos vectores adenovirales de primera generación a partir de vectores adenovirales preparados como fuese descrito por Karahanian y cols., (2005). Para amplificarlos, se cultivaron las células 293 en matraces de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub> más penicilina 100 U/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL y 10% de suero fetal de bovino caracterizado y esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> (Indura, Santiago, Chile) y 95% aire en un incubador Napco 6101F-1 (Chicago, IL, EE.UU.).

## **6.3 PROPAGACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES DE PRIMERA GENERACIÓN**

### **6.3.1 Infección de células 293**

Las células 293 se cultivaron en 30 placas de 100 mm de diámetro con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB), 3,7 g NaHCO<sub>3</sub> más penicilina/estreptomycin 10 mg/L. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Al alcanzar un 100% de confluencia, las células se transdujeron con las partículas virales previamente purificadas. A las 48 h postinfección las células comenzaron a redondearse y a soltarse

de la placa indicando el inicio del efecto citopático esperado, producto de la replicación de los vectores adenovirales. La liberación del vector viral se describe a continuación.

### **6.3.2 Liberación del vector adenoviral de primera generación**

El vector viral se obtuvo mediante un proceso de 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento de las células a  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Las células no lisadas y los restos celulares fueron descartadas luego de una centrifugación a  $15.204 \times g$  (12.000 r.p.m.) durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Brinkmann-Eppendorf, 5810R) y las partículas virales se recuperaron en el sobrenadante.

### **6.3.3 Purificación del vector adenoviral**

Se realizó una gradiente discontinua con CsCl por centrifugación ( $100.000 \times g$  durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ ) (Beckman, Avanti J301) en que se utilizaron dos soluciones de CsCl de distintas densidades en Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Luego de la centrifugación, los adenovirus que presentan una densidad aproximada de 1,34 g/mL se ubican entre las dos soluciones de CsCl con distintas densidades:  $d = 1,4$  (53 g CsCl en 87 mL Tris-HCl 10 mM pH 7,9) y  $d = 1,2$  (26,8 g CsCl en 92 mL Tris-HCl 10 mM pH 7,9). La banda de virus formada entre las dos soluciones, se extrajo y se transfirió a un casete de diálisis (10,000 MWCO, Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) y se dializó durante 1 hora en tampón de diálisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0;  $\text{MgCl}_2$  2 mM) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este proceso se realizó tres veces.



#### **6.3.4 Cuantificación de partículas totales mediante espectrofotometría**

Las partículas virales se lisaron utilizando un tampón conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1%, en Tris-HCl 10 mM pH 7,4 más EDTA 1 mM. Se prepararon diluciones del virus en este tampón y se incubaron durante 10 minutos a 56°C en un bloque térmico (VWR, Select Heatblock). Luego se determinó la concentración de partículas totales en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV1201) a 260 nm en una cuveta de 1 mL. Para determinar la concentración de partículas virales por mL, se utilizó la siguiente fórmula (Mittereder y cols., 1996):

$$\text{Concentración (partículas virales/mL)} = A_{260} \times 10^{12} \times 50$$

#### **6.3.5 Almacenamiento de partículas virales**

Los vectores adenovirales purificados y cuantificados se dividieron en alícuotas de 20  $\mu$ L y se almacenaron en Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sacarosa 5% a -80°C. Cada alícuota de este stock se descongeló lentamente en hielo una vez y no se recongeló, descartándose cualquier remanente. En estas condiciones los vectores adenovirales mantuvieron su infectividad por al menos un año.

#### **6.3.6 Estimación de las partículas virales infectivas**

La estimación de la proporción de virus infectivo por partícula viral, se realizó transduciendo cultivos celulares de hepatoma de rata H4-II-E-C3 (H4) con un vector adenoviral AdV-GFP. La manera en que se procesaron las células transducidas con AdV-GFP es idéntica a las condiciones usadas con los otros dos vectores (AdV-AS y AdV-vacío). Brevemente, las células H4 se infectaron con las mismas cantidades de partículas virales por mL de los distintos vectores adenovirales. A las 48 h

postconfluencia las células se trataron con tripsina para despegarlas de la placa de cultivo y se centrifugaron para extraer todo el medio de cultivo. El precipitado de células se resuspendió en medio fresco para tomar una alícuota y resuspenderlo en un volumen igual de azul de tripano al 0,4%. Se determinó el número de células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 135) con luz blanca. Luego, sobre el mismo preparado se hizo incidir luz fluorescente (Filter Set 09, emisión 516 nm) y se contaron las células que emitían el color verde. La razón entre células verdes a células totales  $\times 100$  es el porcentaje de vectores virales viables estimados en la preparación. El método asume que una célula que emite fluorescencia verde ha sido transducida por al menos un vector viral.

#### **6.4 CULTIVOS DE CÉLULAS H4-II-E-C3 DE HEPATOMA DE RATA**

Las células H4-II-E-C3 (ATCC CRL-1600) se cultivaron en matraces de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub> más penicilina 100 U/ mL y estreptomycin a 0,1 mg/mL. El medio se esterilizó mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m y se suplementó con 10% de suero de equino definido y 5% de suero fetal de bovino caracterizado. Los cultivos se propagaron y mantuvieron en el incubador Napco 6101F-1 a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

#### **6.5 CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CÉLULAS H4-II-E-C3 PARA LOS DISTINTOS ENSAYOS**

Las células H4-II-C-E3 (H4) se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por pocillo de 3,5 cm de diámetro (día 1). Cuando los cultivos alcanzaron el 90% de confluencia (día 3), las células se infectaron con distintas dosis de los vectores

adenovirales durante 24 horas. Transcurridas las 24 h de infección (día 4) en que los cultivos celulares alcanzan el 100% de confluencia, se les descartó el sobrenadante y se reemplazó por medio fresco. A las 48 h postconfluencia (día 6), las células se lavaron 3 veces con PBS frío, reemplazando el medio completo por uno sin suero, agregando a éste los sustratos o inhibidores como se indica en cada caso.

## **6.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ALDH2 EN CÉLULAS H4-II-E-C3 EN CULTIVO**

Para determinar la actividad de la ALDH2, las células mantenidas durante 6 días en cultivo como se indicara en el párrafo anterior, se lavaron tres veces con PBS y se lisaron con 200  $\mu$ L de una solución de Tritón X-100 al 1%. El lisado se centrifugó durante 15 minutos a  $15.204 \times g$  (12.000 r.p.m.) a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Una vez determinada e igualada la concentración de proteínas de los extractos, la actividad de la ALDH2 se midió mezclando 150  $\mu$ g de proteínas totales con 800  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> en fosfato de sodio 34 mM pH 8,5; 4 mM ditioneitol (DTT), 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM 4-metil-pirazol en un volumen final de 800  $\mu$ L. La reacción se inició agregando propionaldehído al resto de los componentes de la reacción incubados previamente durante 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la lectura. La concentración final de propionaldehído es 21  $\mu$ M que asegura que la actividad medida es virtualmente sólo la actividad de la ALDH2. La absorbancia se midió a 340 nm (por la aparición de NADH) cada 20 segundos durante 10 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV1201. Los cambios de absorbancia respecto al tiempo se graficaron y se calculó la pendiente de las rectas obtenidas para determinar la actividad de la ALDH2 por mg de proteína presente en los extractos.

## **6.7 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES PROVENIENTES DE LOS EXTRACTOS CELULARES H4-II-E-C3**

Las proteínas se cuantificaron mediante el sistema comercial Micro BCA que ocupa ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Se diluyó 5  $\mu$ L de cada extracto con 495  $\mu$ L de agua destilada y sobre esta dilución se agregó 500  $\mu$ L de la mezcla de tres soluciones del sistema comercial en la proporción A:B:C = 25:24:1. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 60°C en un baño termostático Napco 202 y los valores de las absorbancias medidas a 562 nm se interpolaron en una curva de calibración con albúmina de suero de bovino (BSA) para calcular la concentración de proteínas en las muestras.

## **6.8 CURVA DOSIS-RESPUESTA CON CIANAMIDA EN CÉLULAS H4-II-E-C3**

Se incubaron cultivos de células H4-II-E-C3 postconfluentes con concentraciones crecientes del inhibidor cianamida (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M) durante distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos). Transcurrido el tiempo de incubación, a las placas de cultivo se les removió el sobrenadante y las células se lavaron 3 veces con PBS frío. A continuación las células se lisaron con 200  $\mu$ L de Tritón X-100 1%, se determinó la concentración de proteínas totales y se midió la actividad de la ALDH2 en los extractos. La concentración y el tiempo de incubación establecida como óptima se utilizaron en los siguientes experimentos.

## **6.9 CURVA DOSIS-RESPUESTA CON EL VECTOR ADENOVIRAL AdV-AS EN CULTIVOS DE CÉLULAS H4-II-E-C3**

Se probaron dos dosis infectivas de los vectores adenovirales: una dosis de infección baja y una alta correspondientes a una cantidad relativa de adenovirus (partículas virales/célula) igual a 5 (PVC = 5) y a 15 (PVC = 15), respectivamente. Se estudiaron los efectos del vector adenoviral a las 24, 48, 72 y 96 horas postinfección y los resultados obtenidos se compararon con células sin infectar y con células incubadas con cianamida 100  $\mu$ M durante 1 hora. Los siguientes experimentos con los vectores se realizaron a las 24 h postinfección, que es equivalente a las 48 h postconfluencia de los cultivos celulares (Moncada y cols., 2003).

## **6.10 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Aldh2* SENTIDO PROVENIENTE DE LAS CÉLULAS H4-II-E-C3 Y ANTISENTIDO PROVENIENTE DEL VECTOR ADENOVIRAL AdV-AS EN CÉLULAS TRANSDUCIDAS CON EL VECTOR ADENOVIRAL**

Los cultivos celulares a aproximadamente un 90% de confluencia se infectaron con dos dosis: PVC = 5 y PVC = 15. Transcurridas las 48 h postconfluencia (24 horas después de la infección) se extrajo el RNA total de las células H4 con 1 mL del reactivo TRIzol por pocillo. El lisado, luego de ser pasado varias veces (“*up and down*”) por la punta de una micropipeta, se transfirió a un tubo limpio y estéril y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para disociar los complejos nucleoproteicos. Se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo a cada tubo, se agitó e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000  $\times$  g (10.629 r.p.m.) a 4°C, rescatándose la fase acuosa y de ésta se precipitó el RNA con 0,5 mL de isopropanol. Luego, se incubaron a temperatura ambiente durante 10

minutos y se centrifugaron a  $12.000 \times g$  (10.629 r.p.m.) a 4°C durante 10 minutos adicionales. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó durante 5 minutos a  $7.500 \times g$  (8.403 r.p.m.) a 4°C, descartándose el sobrenadante. El precipitado se secó 10 minutos al vacío en un desecador de policarbonato de 15 cm de diámetro (Scienceware, SpaceSaver, Pequannock, NJ, EE.UU.). Finalmente, el RNA se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua destilada estéril y se determinó la concentración por absorbancia a 260 nm.

Los niveles de mRNA del gen *Aldh2* celular y del antisentido proveniente del vector adenoviral, se determinaron mediante reacciones de transcripción inversa (RT) seguidas por una PCR. Las reacciones de RT se realizaron mezclando 3  $\mu$ g de RNA total como molde, 100 pmoles del oligonucleótido correspondiente (Tabla 5.1 y Tabla 5.2) y 200 unidades de la enzima en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 60 minutos en un bloque térmico (VWR Select Heatblock). Posteriormente se realizaron reacciones de PCR independientes para los RNAs de la *Aldh2* y *Aldh2-AS* en un termociclador (MJ Research PTC-100). Para ello se mezclaron 1,25 unidades de la enzima DNA polimerasa Taq, una dilución 1:5 del producto obtenido de la reacción RT, 25 pmoles de partidor sentido, 25 pmoles de partidor antisentido, 200  $\mu$ M de cada dNTP en  $MgCl_2$  2mM, Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM en un volumen final de 25  $\mu$ L. Las mezclas de reacción se sometieron a una etapa inicial de desnaturación a 94°C durante 3 minutos y luego a 26 ciclos que comprenden una desnaturación a 94°C durante 1 minuto, 2 minutos de alineamiento a 63°C y 2 minutos de extensión a 72°C. Finalmente se realizó una etapa de extensión durante 10 minutos a 72°C. Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% durante 80 minutos a 100 volts, y luego fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) y expuestos a luz UV.

## **6.11 MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ACETALDEHÍDO FORMADO EN CULTIVOS DE CÉLULAS H4-II-E-C3 INCUBADAS CON ETANOL**

### **6.11.1 Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de etanol en células de hepatoma de rata**

Luego de 48 horas postconfluencia en los cultivos de células H4 se determinó acetaldehído. Para ello, se lavaron las células H4 tres veces con PBS frío, y se agregó 3 mL de DMEM sin suero más alcohol para alcanzar las distintas concentraciones finales de etanol (0, 1, 5 y 10 mM). La incubación de las células se realizó durante 1 h a 37°C y para evitar la evaporación tanto del alcohol como del acetaldehído formado, los pocillos (en “6-well”) se taparon herméticamente con tapones de goma n°8. Luego de la incubación, se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se guardó a –80°C en tubos con anillo de goma herméticamente cerrados para su uso posterior. En estos ensayos se utilizó como control positivo células tratadas con cianamida 100 µM que se incubaron con el inhibidor durante 1 hora previo a la adición de etanol. A partir de los resultados, se estableció la concentración final de alcohol para realizar los experimentos con los distintos vectores adenovirales.

### **6.11.2 Cuantificación del acetaldehído formado en células H4-II-E-C3 mediante HPLC**

La cuantificación de acetaldehído presente en el medio de cultivo se hizo mediante una reacción de derivación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Lucas y cols., 1986) y como estándar interno se utilizó crotonaldehído (trans-2-butenal). El sobrenadante guardado a –80°C, se descongeló lentamente en hielo y se tomó una alícuota de 500 µL para realizar el ensayo. Los 500 µL del medio se agregaron a 4 mL de una solución de NaCl 0,15 M; HClO<sub>4</sub> 0,6 M, en tubos de polipropileno de 15 mL. Luego de agitar las soluciones, se agregaron 100 µL de DNPH 0,5 mg/mL, HCl 6 M y 10 µL de

crotonaldehído 0,62 mM disuelto en metanol. Se agitaron los tubos y se incubó durante 1 h a 40°C en un baño termorregulado. Transcurrida la incubación, se neutralizó la reacción a temperatura ambiente mediante la adición de 2 mL de acetato de sodio 3 M. A continuación se agregaron 2 mL de isoctano y se agitaron los tubos vigorosamente durante 20 minutos. Posteriormente se recuperó 1,5 mL de la fase orgánica mediante una centrifugación a  $10.408 \times g$  (7.000 r.p.m.) durante 10 minutos en una centrífuga Beckmann-Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania), y se llevó a sequedad en un desecador de policarbonato con presión negativa. El residuo se resuspendió en 100  $\mu$ L de una mezcla agua:acetonitrilo (grado HPLC) en una razón de 35:65. De la suspensión obtenida, se inyectaron 20  $\mu$ L de la muestra en un HPLC Shimadzu (Japón) (inyector SIL-10A, controlador SCL-10A, bomba LC-10AD, detector UV-visible SPD-10AV, interfaz CBM-101) implementado con una columna Supelcosil LC18 (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). La separación se hizo usando una mezcla agua:acetonitrilo 35:65 con un flujo de 1,25 mL/min. El acetaldehído derivado se detectó a 365 nm y los cromatogramas se procesaron con el programa CLASS-LC10 (Shimadzu, Japón). Paralelamente al tratamiento de las muestras se hizo una curva estándar con concentraciones entre 1 y 100  $\mu$ M de acetaldehído que se procesaron de la misma manera.

#### **6.12 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO VOLUNTARIO DE ALCOHOL EN RATAS BEBEDORAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE (LÍNEA UChB)**

Todos los experimentos se realizaron en ratas hembras de 200-300 g de peso de la línea UChB (bebedoras) del genotipo *Aldh2<sup>1</sup>/Aldh2<sup>1</sup>*, a las cuales se les determinó su consumo voluntario de alcohol en la forma que se describe a continuación. Al cumplir los dos meses de edad las ratas se separaron en jaulas individuales en un ciclo de



12 h de luz y oscuridad. A continuación se les ofreció a elegir entre una solución de etanol al 10% (vol./vol.), o agua por un período de dos meses. Alimento estuvo a libre disposición durante las 24 h del día. Finalizado este período, el consumo de alcohol de cada animal se calculó promediando el consumo de los últimos 30 días. El valor final se expresó como gramos de etanol consumido por kilo de peso de animal por día.

### **6.13 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL GEN ANTISENTIDO ANTI-*Aldh2* SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL DE RATAS UChB: ESTABLECIMIENTO DE LA CONDICIÓN ACCESO LIMITADO**

Finalizada la determinación del consumo voluntario de alcohol durante 2 meses, los animales se pesaron previo a la administración del vector adenoviral que porta el gen antisentido para la ALDH2. El vector adenoviral se diluyó en tampón de almacenamiento (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; sacarosa 5%) y fue administrado por vía endovenosa (0,8 a 1,3 mL) en la vena de la cola. El día de la administración del vector, las ratas se dividieron en grupos. Al primer grupo se inyectó una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/kg de vector adenoviral portando el gen antisentido para ALDH2 (AdV-AS) y el segundo grupo se inyectó con una dosis similar de vector adenoviral vacío (AdV-vacío). En el primer estudio (Estudio #1), la determinación del consumo de alcohol al 10% (vol./vol.) y agua ofrecidos durante las 24 horas del día (condición de acceso libre) se estudió inmediatamente luego de la administración del vector viral. Al día 10 de haber sido administrado el vector viral, se retiró la botella que contenía la solución de etanol 10%. Transcurrido las 18 horas de abstinencia, se inició la determinación del consumo de alcohol ofreciéndole a los animales etanol 10% (vol./vol.) durante sólo una hora cada día (condición de acceso limitado). En esta condición, el consumo de alcohol en la hora de acceso es inicialmente de 1-1,2 g/kg, lo

que es 3 – 4 veces mayor que el consumo promedio por hora en la condición de 24 horas de libre acceso al alcohol. Los siguientes experimentos (Estudios #2 y #3) con ratas UChB se realizaron con una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg de los vectores adenovirales (AdV-AS y AdV-vacío) o con un volumen equivalente de tampón de almacenamiento. Tres días después de la administración del vector viral se inició la determinación del consumo de alcohol ofreciéndosele a los animales etanol 10% durante una hora cada día. En el Estudio #2 los experimentos se terminaron a los 34 días de ingesta de alcohol en la condición de acceso limitado, determinándose las actividades de ALDHs en el hígado de los animales.

#### **6.14 EFECTO DEL GEN ANTISENTIDO ANTI-*Aldh2* SOBRE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE ACETALDEHÍDO**

En el Estudio #3, al día 9 (día 6 de acceso limitado) de la administración del vector viral o un volumen equivalente de tampón de almacenamiento (grupo control) se determinaron los niveles de alcohol sanguíneo a los 60 minutos de acceso limitado. Al día 10, los animales recibieron una dosis intraperitoneal de alcohol (1g/kg, administrados en una solución al 20% vol./vol.) para determinar acetaldehído arterial y luego se sacrificaron para determinar la actividad de ALDHs hepáticas. Los niveles de acetaldehído se midieron a los 0, 5, 10, 15 y 30 minutos en muestras de 0,1 mL de sangre, que se obtuvieron mediante la cateterización de la arteria carótida en ratas previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). La determinación de acetaldehído en las muestras de sangre se realizó por cromatografía de gases usando el método de “*headspace*” descrito por Eriksson y cols. (1977). Brevemente, las muestras de sangre se recibieron en 1 mL de n-propanol (0,8 mg%), usado como estándar interno, en frascos herméticamente cerrados con tapas provistas de válvulas

(Mininert®). Después de incubar la preparación a 60°C durante 15 minutos se tomó 1 mL de la fase gaseosa y se inyectó en el cromatógrafo de gases equipado con una columna de Porapak T usando nitrógeno como gas de arrastre a una velocidad de flujo de 30 mL/min.

#### **6.15 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HÍGADO DE RATA UChB PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ALDHS**

La actividad de las ALDHs se determinó a partir de aproximadamente 2 g de hígado de rata UChB. El hígado a 4°C se trozó en pedazos pequeños, se lavó 3 veces con PBS para remover los coágulos de sangre y se depositó en un tubo plástico de 15 mL. Los trozos se resuspendieron en 2 mL de Tritón X-100 al 1% más DTT 0,33 mM para luego homogeneizar el tejido utilizando un UltraTurrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania) con el vástago pequeño. Se efectuaron 5 ciclos de homogeneización (30 s)-incubación en hielo (1 minuto). La mezcla se traspasó a tubos Seton para ultracentrífuga y se completó el volumen a 12 mL con Tritón X-100 al 1% más DTT 0,33 mM mezclándose suavemente para prevenir la formación de espuma. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga Beckmann Avanti J301 a  $46.000 \times g$  durante 1 h a 4°C. Finalmente, se tomó una alícuota de 2  $\mu$ L para determinar la concentración de proteínas de las muestras, como fuese descrito previamente, y el sobrenadante restante se guardó a -80°C para su uso posterior.

## **6.16 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ALDHs Y ALDH2 EN EXTRACTOS DE HÍGADO DE RATA UChB**

### **6.16.1 Medición de la actividad ALDHs totales en extractos de hígado de rata UChB**

La actividad de las ALDHs totales (de alta y de baja  $K_m$ ) se midió mezclando 600  $\mu\text{g}$  de proteínas totales con  $\text{NAD}^+$  800  $\mu\text{M}$  en fosfato de sodio 34 mM pH 8,5; DTT 4 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y 4-metil-pirazol 10 mM en un volumen final de 800  $\mu\text{L}$ . La reacción se inició agregando propionaldehído a una concentración final de 1mM al resto de los componentes de la reacción incubados previamente durante 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la lectura. Se registró la absorbancia a 340 nm (aparición de NADH) cada 20 segundos durante 10 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV1201. Se graficaron los cambios de absorbancia respecto al tiempo y se calculó la pendiente de las rectas obtenidas para determinar la actividad de todas las ALDHs por mg de proteína presente en los extractos.

### **6.16.2 Medición de la actividad ALDH2 de extractos de hígado de rata UChB**

La actividad de la ALDH2 (de baja  $K_m$  para acetaldehído) se determinó mezclando 600  $\mu\text{g}$  de proteínas totales más todos los reactivos (descrito previamente) y la reacción se inició agregando propionaldehído a una concentración final de 21  $\mu\text{M}$ . Se graficaron los cambios de absorbancia respecto al tiempo y se calculó la pendiente de las rectas.

## 6.17 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA 2'-5'A OLIGONUCLEÓTIDO SINTETASA MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Se purificó RNA total de aproximadamente 100 mg de hígado de rata a partir de las ratas UChB infectadas con el vector adenoviral AdV-AS o con un volumen equivalente de tampón de almacenamiento, utilizando 1 mL de reactivo TRIzol. El tejido se homogeneizó utilizando un Ultra-Turrax T25 con el vástago pequeño en tubos plásticos de 15 mL. Se efectuaron 5 ciclos de homogeneización (30 s)-incubación en hielo (1 min). La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 0,2 mL de cloroformo por mL de TRIzol utilizado. Finalmente, la mezcla se sometió a centrifugación durante 15 minutos a  $15.777 \times g$  (14.000 r.p.m.) a temperatura ambiente y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. El RNA que se obtuvo, se precipitó de la fase acuosa con 0,5 mL de isopropanol, y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75% y finalmente se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua destilada estéril. El producto obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm (Shimadzu UV-1201, Japón).

Los niveles de mRNA del gen 2'-5'A *oligonucleótido sintetasa* celular existentes luego de la infección viral (Stark y cols., 1998; Clarke y cols., 1995), se determinaron mediante reacciones de transcripción inversa (RT) seguidas por una PCR. La reacción de RT se realizó mezclando 3  $\mu$ g de RNA total con 100 pmoles del oligonucleótido reverso poli(dT) y 200 unidades de la enzima en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 60 min. en un bloque térmico. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de la reacción de transcripción inversa y reacciones de PCR independientes para cada dilución. Las mezclas de reacción se sometieron a una etapa inicial de desnaturación a 94°C durante 5 min. y

luego 30 ciclos que comprenden una desnaturación a 94°C durante 30 segundos, 30 segundos de alineamiento a 65°C y 30 segundos de extensión a 72°C. Finalmente se realizó una etapa de extensión durante 5 minutos a 72°C. Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis verticales en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) y expuestos a luz UV.

#### **6.18 ESTADÍSTICAS**

Todos los experimentos se realizaron como mínimo tres veces y las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ . El cálculo de la significancia de los resultados se realizó por un análisis de varianza (ANOVA) o T-test, mediante un software Graphpad Prism versión 4.00 para Windows (uso libre), Graphpad software, San Diego, California, EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ALDH2 EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATA: CURVA DOSIS-RESPUESTA CON CIANAMIDA

En el año 1990, Huang y Lindahl describieron la existencia de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) en células de hepatoma de rata, la que presenta características similares a la ALDH2 de hígado de rata y humanos. Con estos antecedentes, se determinó la actividad de la ALDH2 en cultivos de células H4-II-E-C3 (H4) mediante espectrofotometría a 340 nm, como fuese descrito en Métodos. En tales experimentos se utilizó cianamida un inhibidor químico inespecífico de la ALDH2 y las otras ALDHs que asegura el tipo de actividad medida. La metodología utilizada para determinar la actividad de la deshidrogenasa aldehídica en mitocondrias aisladas fue la descrita por Tank y cols., (1981), adaptada con pequeñas modificaciones para medir la actividad de la ALDH2 en extractos en células de hepatoma de rata. Los resultados de la Figura 7.1A revelan que la metodología implementada es la adecuada para medir la actividad de la ALDH2 en los extractos celulares debido a que se registraron cambios en la absorbancia a 340 nm al incubar la mezcla de reacción que contiene 150  $\mu\text{g}$  de proteínas totales con una concentración final de propionaldehído 21  $\mu\text{M}$ . Consumido todo el sustrato presente en la mezcla de reacción, las lecturas de densidad óptica se estabilizaban indicando el término de la reacción.

Establecida la metodología para medir la actividad ALDH2 en los extractos celulares, se estudiaron tres concentraciones del inhibidor cianamida (50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) durante distintos tiempos de incubación (0, 0,5, 1, 1,5 y 2 horas) con el inhibidor. La Figura 7.1B muestra el efecto sobre la actividad ALDH2 de la incubación con concentraciones

crecientes del inhibidor y a diferentes tiempos, obteniéndose en promedio una reducción en la actividad ALDH2 de 80%, reducción que es significativa en comparación con un cultivo de células H4 control (sin tratar) al que se le asignó un valor relativo de 100% de actividad enzimática.

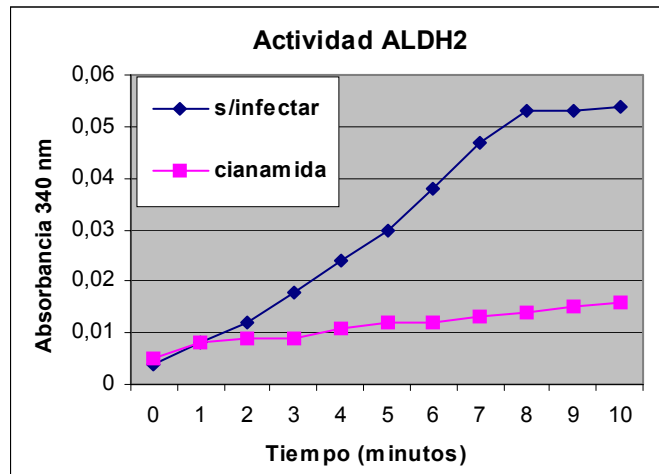
A partir de los datos mostrados en la Figura 7.1A y 7.1B se confirma que la metodología utilizada permite registrar la actividad de la ALDH2. La inhibición de la actividad de la deshidrogenasa aldehídica obtenida con las distintas concentraciones de cianamida fue similar a todos los tiempos por lo que, los siguientes experimentos con células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se realizaron a una concentración final de cianamida 100  $\mu$ M y un tiempo de incubación de 1 hora.

## **7.2 PROPAGACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES DE PRIMERA GENERACIÓN A GRAN ESCALA**

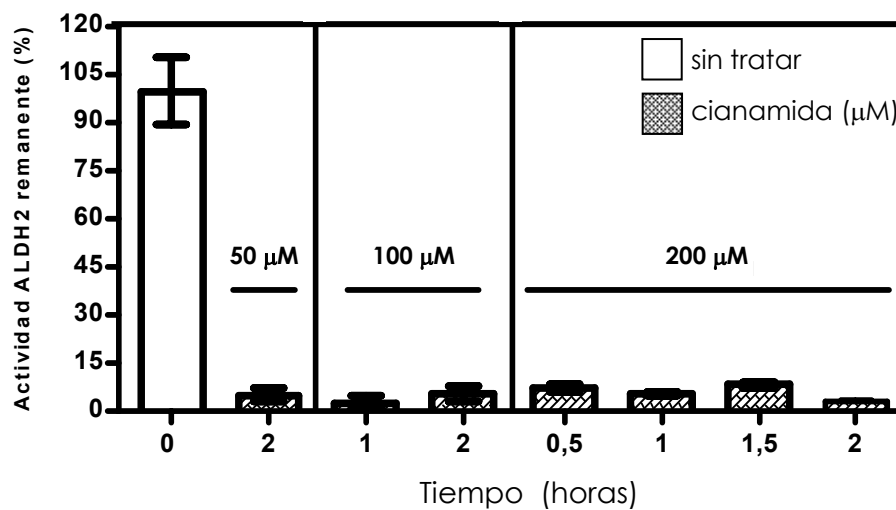
Se prepararon vectores adenovirales a gran escala (Figura 7.2) según el procedimiento descrito (Métodos 6.3) que consiste en aumentar secuencialmente el tamaño del cultivo de células 293 y los ciclos de infección de la partícula adenoviral hasta llegar a infectar 30 placas de 100 mm. En su siguiente purificación, la utilización de un gradiente discontinuo de cloruro de cesio depende de la obtención de una banda viral de densidad 1,3 que se ubica entre ambas soluciones según lo descrito en la literatura (Mittereder y cols., 1996). Se debe generar  $> 3 \times 10^8$  células para poder visualizar apropiadamente la banda en este tipo de gradientes. La cantidad de placas de cultivo infectadas para realizar el gradiente de CsCl abarcó el rango de 9 – 100 placas de cultivo obteniéndose  $6,3 \times 10^{11}$  y  $3 \times 10^{13}$  partículas virales por mL, respectivamente.



A



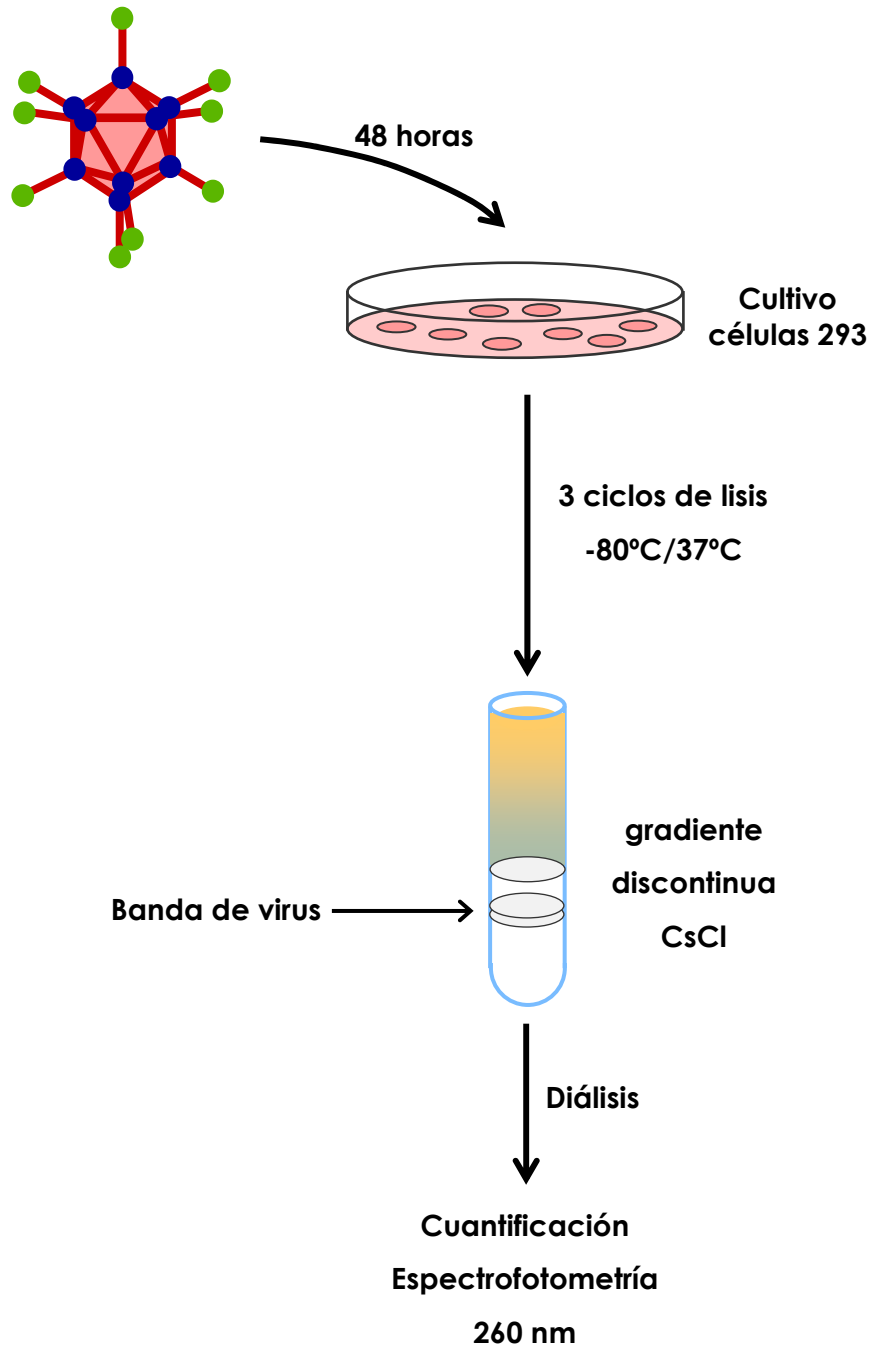
B



**Figura 7.1: Medición de la actividad ALDH2 endógena en células de hepatoma de rata mediante espectrofotometría.**

**A) Formación de NADH (D.O. a 340 nm) en extractos celulares provenientes de células H4-II-E-C3.** A la mezcla de reacción que contiene 150  $\mu\text{g}$  de proteínas totales se adicionó el sustrato, momento en que se comenzó a registrar cambios en la densidad óptica (D.O.) a 340 nm. Consumido el sustrato, las lecturas se estabilizaron indicando el término de la reacción.

**B) Curva dosis-respuesta con cianamida, un inhibidor químico inespecífico de la ALDH2.** Cultivos de células de hepatoma de rata, se incubaron con concentraciones crecientes de cianamida a distintos tiempos. En todas las condiciones de estudio, se obtuvo una reducción en la actividad ALDH2 de 80%. A las células H4 sin tratar, se le adjudicó 100% de actividad enzimática.



**Figura 7.2: Propagación de vectores adenovirales a gran escala.**

Las células embrionarias de riñón humana (HEK) 293 se transdujeron durante 48 h con el vector adenoviral a propagar. Transcurrido el tiempo, las células se recolectaron y se realizaron 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Luego de una centrifugación a  $15.204 \times g$ , el sobrenadante se depositó sobre una gradiente discontinua de CsCl. Se centrifugó a  $100.000 \times g$ , obteniéndose una banda viral al que se le eliminó las sales por diálisis y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm.

### **7.3 INHIBICIÓN DE LA ALDH2 POR EL GEN ANTISENTIDO: EFECTO DE LA TRANSDUCCIÓN CON DISTINTAS DOSIS DEL VECTOR AdV-AS SOBRE LA ACTIVIDAD ALDH2 EN EL TIEMPO**

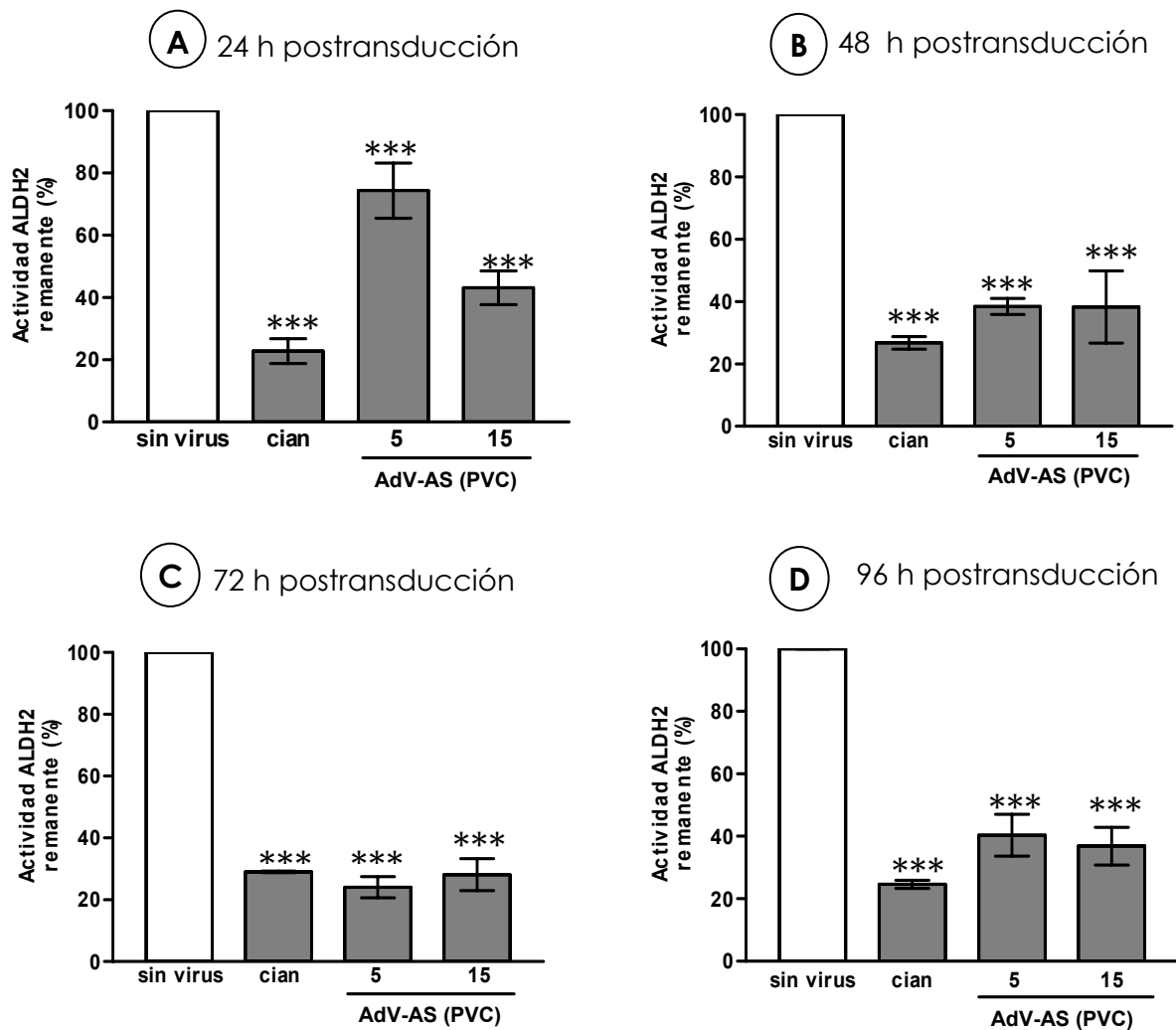
Previo a los estudios realizados con el vector adenoviral de primera generación que codifica el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS), se estableció la dosis y el tiempo de transducción con este vector en cultivos de células de hepatoma de rata. Se analizaron dos dosis infectivas del vector AdV-AS, correspondientes a una cantidad relativa de adenovirus (partículas virales/célula) igual a 5 (PVC = 5) y a 15 (PVC = 15), sobre la actividad de la ALDH2. El curso temporal de la postransducción estudiada corresponde a las 24, 48, 72 y 96 horas, momento en que se detuvo el cultivo celular, lavaron las células con PBS frío y se desprendieron mecánicamente en presencia de Tritón X-100 1% para centrifugar y determinar la actividad ALDH2 en los extractos celulares.

Los datos de actividad ALDH2 obtenidos (Figura 7.3) muestran que la transducción de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 con el vector adenoviral que codifica para el gen *Aldh2* antisentido, produjo una marcada disminución en la actividad ALDH2 a todos los tiempos de postransducción estudiados. Estos valores se compararon con la actividad ALDH2 proveniente de células H4 sin tratar y sin virus a las que se les adjudicó un valor relativo de 100%. El control negativo cianamida (100  $\mu$ M durante 1 h) se incluyó en todos los ensayos para comparar los niveles de reducción obtenidos con el vector AdV-AS versus los obtenidos en presencia del inhibidor químico.

Una dosis infectiva baja equivalente a una PVC = 5 (Figura 7.3), produjo una reducción paulatina en la actividad de la ALDH2 en el tiempo en comparación con la reducción registrada al transducir los cultivos de células H4 con una dosis infectiva alta

(PVC = 15). A las 24 horas postransduccionales (Figura 7.3A) la actividad ALDH2 disminuyó en 26% en un cultivo de células H4 transducidas con una PVC = 5, disminución que se hizo más marcada a las 48 horas (Figura 7.3B) alcanzando un máximo (76%) en la reducción en la actividad ALDH2 a las 72 horas postransduccionales (Figura 7.3C). La transducción de los cultivos de hepatoma de rata con una dosis infectiva alta (PVC = 15) del vector AdV-AS produjo una disminución en la actividad de la ALDH2 de 57% a las 24 horas (Figura 7.3A), 61,6% a las 48 horas (Figura 7.3B) obteniéndose la máxima reducción en la actividad ALDH2 de 72% a las 72 horas postransduccionales. A las 96 horas de postransducción, se registró una reducción en la actividad ALDH2 de 63,2% (Figura 7.3D). Las Figura 7.3C y 7.3D muestran que a tiempos mayores de postransducción de 72 y 96 horas, la reducción en la actividad de la ALDH2 a ambas dosis infectivas fue de 80%, disminución que no mostró diferencias significativas con la alcanzada con el inhibidor químico cianamida.

Los resultados obtenidos con la curva dosis respuesta con el vector AdV-AS en el tiempo muestran que independientemente de la concentración del vector AdV-AS utilizado, el efecto de disminución de la actividad ALDH2 es logrado en ambos casos llegando incluso a los mismos niveles de inhibición (80%). La diferencia radica en que con una dosis infectiva alta (PVC = 15) la reducción de la actividad ALDH2 es inmediata en cambio con una dosis baja, la máxima reducción en la actividad es más lenta. Con los datos obtenidos, los siguientes experimentos *in vitro* se realizaron con una dosis infectiva baja (PVC = 5) y alta (PVC = 15) a las 24 horas postransduccionales.



**Figura 7.3: Efecto de la transducción con dos dosis infectivas del vector que porta el gen *Aldh2* antisentido sobre la actividad ALDH2 de células de hepatoma de rata.**

Las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se transdujeron durante 24 h con el vector que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) a dos dosis (PVC = 5 y PVC = 15). Se realizaron en paralelo controles: células sin virus y células incubadas con cianamida (100  $\mu$ M, 1 h).

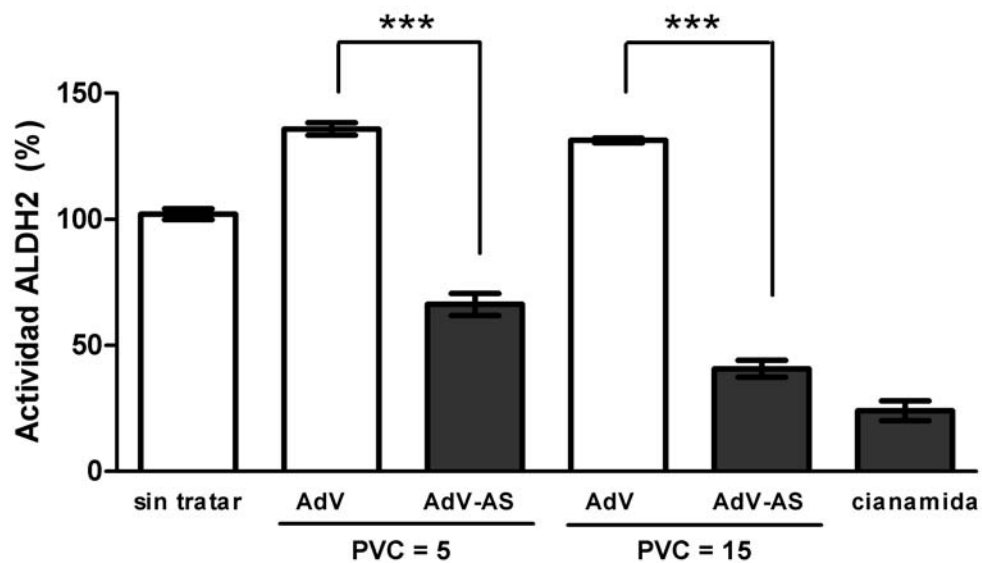
**A)** Actividad ALDH2 luego de 24 h de postransducción con el vector AdV-AS. **B)** Actividad ALDH2 luego de 48 h de postransducción con el vector AdV-AS. **C)** Actividad ALDH2 luego de 72 h de postransducción con el vector AdV-AS. **D)** Actividad ALDH2 luego de 96 h de postransducción con el vector AdV-AS. La actividad de la ALDH2 se presenta como porcentaje respecto a la actividad de células sin tratar. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. AdV-AS vs. sin virus: \*\*\* $p < 0,001$

#### **7.4 REDUCCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LA ALDH2 EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATA TRANSDUCIDAS CON VECTORES ADENOVIRALES QUE PORTAN EL GEN *Aldh2* ANTISENTIDO**

En los siguientes experimentos realizados con el vector adenoviral AdV-AS, se incorporó un nuevo control que consistió en la utilización de un vector adenoviral de primera generación que no contiene el cDNA antisentido de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial por lo que se denominó AdV-vacío. La razón de la utilización de este vector AdV-vacío es confirmar que la disminución de la actividad ALDH2 se debe a la presencia y expresión de la ALDH antisentido y no a la presencia del vector adenoviral por sí.

Las células H4-II-E-C3 se transdujeron durante 24 h con un vector control (AdV-vacío) o un vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) a 2 dosis (PVC = 5 y PVC = 15) momento en que se retiró el medio infectivo y se reemplazó por medio de cultivo fresco. Los cultivos se mantuvieron hasta cumplir las 48 horas postconfluencia y se realizaron en paralelo controles adicionales: células sin tratar y células de hepatoma de rata incubadas con el inhibidor cianamida.

Los resultados obtenidos (Figura 7.4), utilizando una nueva preparación de los adenovirus, muestran que después de 24 horas de postransducción con el vector AdV-AS, la actividad ALDH2 disminuyó en 60 y 70% ( $p < 0,001$  versus AdV-vacío) a una dosis infectiva igual a 5 y 15, respectivamente. Los cultivos celulares que se transdujeron con las dos dosis infectivas del AdV-vacío, no mostraron diferencias significativas en la actividad de la ALDH2 en comparación con las células controles. Estos resultados indican que la infección con un vector adenoviral por sí mismo, no es el causante de la disminución de la actividad ALDH2 registrada.



**Figura 7.4: Actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata transducidas con vectores adenovirales que portan el gen *Aldh2* antisentido.**

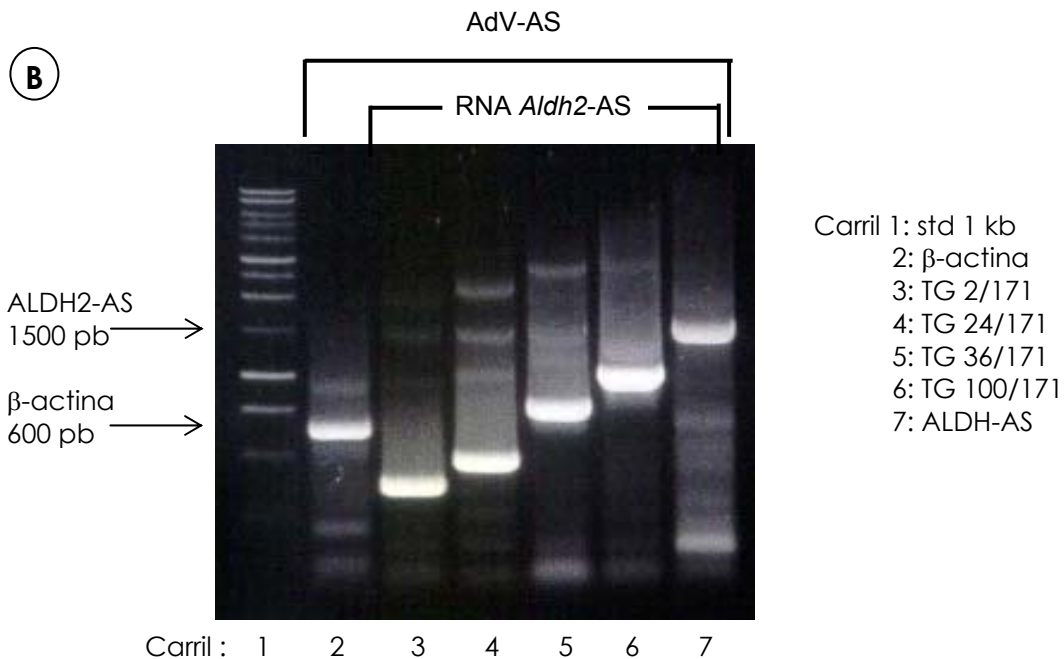
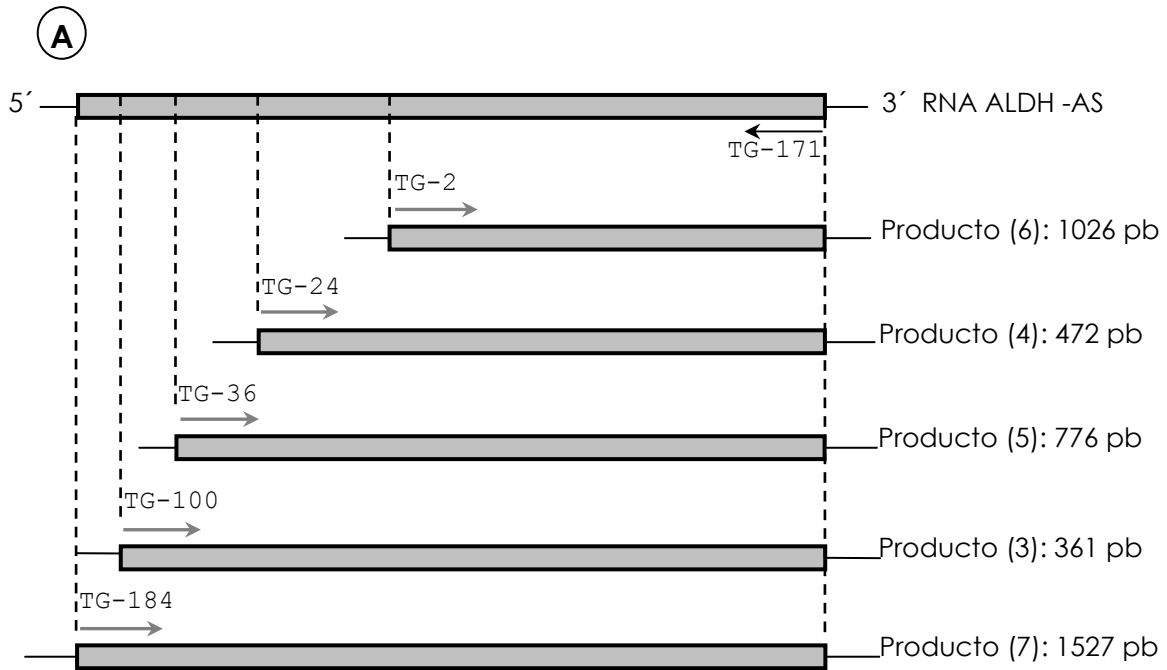
Las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se transdujeron durante 24 h con un vector control (AdV) o un vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) a 2 dosis (PVC = 5 y PVC = 15). Se realizaron en paralelo controles adicionales: células sin tratar y células de hepatoma incubadas con cianamida 100  $\mu$ M durante 1 h, para alcanzar la máxima inhibición de la ALDH2. La actividad de la ALDH2 se presenta como porcentaje respecto a la actividad de células sin tratar. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. AdV vs. AdV-AS: \*\*\* $p < 0,001$  para ambas PVCs. 100% control = 3,5 nmol/min/mg proteína

## 7.5 DETECCIÓN DE mRNA DE LA ALDH2 ANTISENTIDO (AS) LUEGO DE LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS H4-II-E-C3 CON UN VECTOR ADENOVIRAL AdV-AS

La expresión del gen *Aldh2* antisentido en cultivos de células H4-II-E-C3 infectadas con AdV-AS se determinó mediante reacciones de transcripción inversa (RT) seguidas de una reacción de polimerización en cadena (PCR) en RNA celular extraído mediante TRIzol. Las reacciones de PCR para el cDNA de la ALDH-AS, se realizaron con parejas de partidores (Tabla 5.1 y 5.2) que generaran amplicones de distinto tamaño. La estrategia experimental utilizada esquematizada en la Figura 7.5A, muestra los partidores utilizados que hibridan a distancias crecientes del sitio de unión del partidor único de la RT (TG-171) que se utilizó también en las reacciones de PCR.

En la fotografía de la Figura 7.5B se muestran los productos de las reacciones de RT-PCR realizadas para confirmar la expresión del mRNA de la ALDH2-AS en cultivos de células de hepatoma. Los resultados muestran que se obtuvieron los productos de los tamaños deseados con todas las parejas de partidores (carriles 3 a 6) incluyendo un producto de 1500 pb correspondiente a la ALDH2-AS íntegro. El carril 2 muestra un producto de 600 pb correspondiente a mRNA de  $\beta$ -actina de rata utilizado como control interno. Se realizaron además los controles sin RT y control H<sub>2</sub>O (datos no mostrados), en que no se obtuvo producto. En la Figura 7.5B se puede apreciar visualmente que la intensidad de las bandas de los productos de distintos tamaños de mRNA ALDH2-AS es semejante entre ellos y a la obtenida de  $\beta$ -actina de rata (carril 2). Puesto que se obtuvo un producto de mRNA ALDH-AS de 1500 pb, estos resultados sugieren que el mRNA de la ALDH-AS no está siendo degradado lo que sería una primera aproximación del mecanismo de acción del vector adenoviral AdV-AS (Figura 7.5).





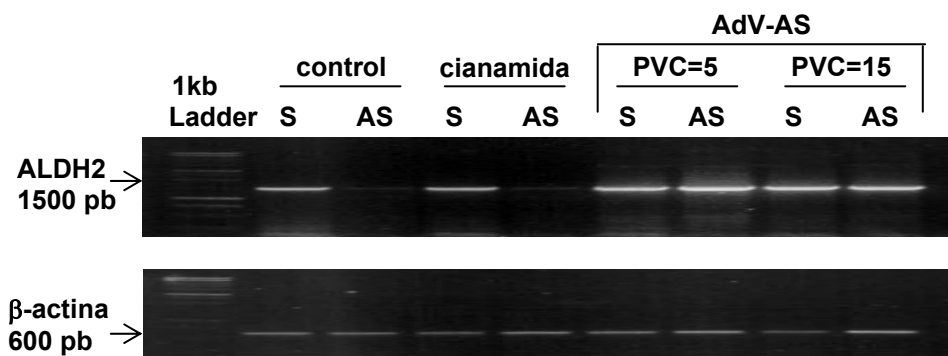
**Figura 7.5: Expresión del gen *Aldh2* antisentido en cultivos de células H4-II-E-C3 luego de 24 h de transducción con el vector AdV-AS.**

**A) Esquema representativo de la ubicación de los partidores y tamaño del producto de PCR esperado.** En negro se muestra el partidor antisentido TG-171 utilizado en la RT y PCR, en gris los distintos partidores sentido. Las líneas achuradas muestran el tamaño relativo de los productos de PCR esperados. El tamaño teórico se indica al lado derecho del esquema. El número en paréntesis indica el carril en B. **B) Niveles de mRNA de la ALDH2 antisentido después de la transducción con el vector AdV-AS.** Con los partidores escogidos, se obtuvieron amplicones de distintos tamaños correspondientes a la ALDH2-AS (carriles 3-7). Como control interno, se determinó  $\beta$ -actina de rata (carril 2). Se realizaron los controles sin RT y control H<sub>2</sub>O (datos no mostrados) en que no se obtuvo amplificación.

## **7.6 NIVELES DE mRNA DE LA ALDH2 SENTIDO (S) Y ANTISENTIDO (AS) LUEGO DE LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS H4-II-E-C3 CON UN VECTOR ADENOVIRAL AdV-AS**

Se determinaron los niveles de expresión del gen *Aldh2* y del gen *Aldh2* antisentido en cultivos de células de hepatoma, utilizando el RNA total extraído de las células H4 transducidas con una PVC = 5 y una PVC = 15 durante 24 horas con el vector adenoviral AdV-AS. Se realizó por separado una RT con el partidor TG-184 (Tabla 5.1) para el mRNA de la ALDH2 sentido (S en Figura 7.6; endógena de las células H4) y una RT con el partidor TG-171 (Tabla 5.1) para el RNA de la ALDH2 antisentido (AS) proveniente del vector AdV-AS. Las reacciones de PCR para el cDNA de la ALDH-AS y ALDH-S, se realizaron con parejas de partidores listadas en la Tabla 5.1 en que el partidor único de la RT que permite discriminar entre sentido y antisentido se utilizó también en la reacción de PCR.

En la fotografía de la Figura 7.6 se muestran los productos obtenidos de 1500 pb de las reacciones de RT-PCR realizados con el fin de comparar los niveles de mRNA de *Aldh2-S* (sentido) con los niveles de RNA de *Aldh2-AS* (antisentido) luego de 24 horas de postransducción a partir del mismo RNA total extraído de las células a las dos dosis infectivas del vector AdV-AS. Se puede apreciar una pequeña banda de 1500 pb en las células que no se trataron con el vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido, lo que se atribuye a contaminación entre carriles y no a una contaminación con DNA viral porque las muestras se habían tratado con DNAsa RQ1 previo al ensayo de RT. Luego de la infección con las distintas dosis del vector AdV-AS (PVC = 5 y PVC = 15), se observaron niveles altos tanto del mRNA sentido y antisentido. Los niveles de mRNA antisentido no aumentaron a una PVC mayor con el vector AdV-AS.



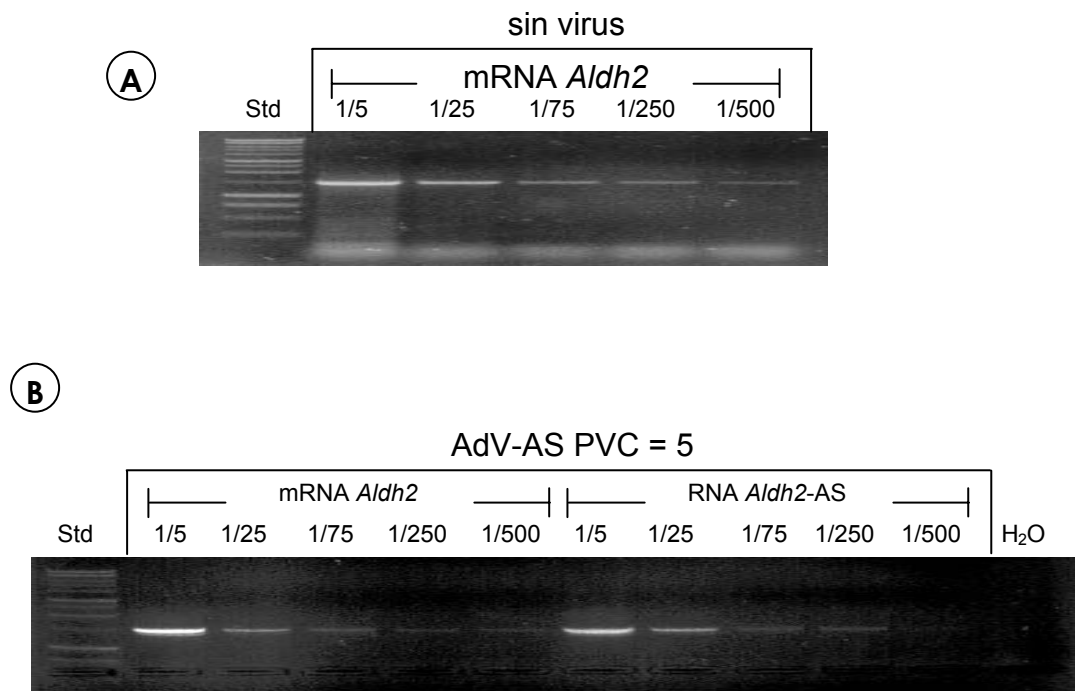
**Figura 7.6: Niveles de mRNA de la *Aldh2* sentido (S) y antisentido (AS) después de la transducción de células de hepatoma de rata con un vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido.**

Las células de hepatoma de rata se transdujeron con un vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) a dos dosis (PVC = 5 y PVC = 15) durante 24 horas. Las células sin tratar y las células incubadas con cianamida (100  $\mu$ M durante 1 h) se utilizaron como controles. Como control interno, se determinó la expresión de  $\beta$ -actina.

## 7.7 DETERMINACIÓN POR RT-PCR DE LOS NIVELES RELATIVOS DE mRNA DE *Aldh2* SENTIDO (S) y ANTISENTIDO (AS) LUEGO DE LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS H4-II-E-C3 CON UN VECTOR ADENOVIRAL AdV-AS

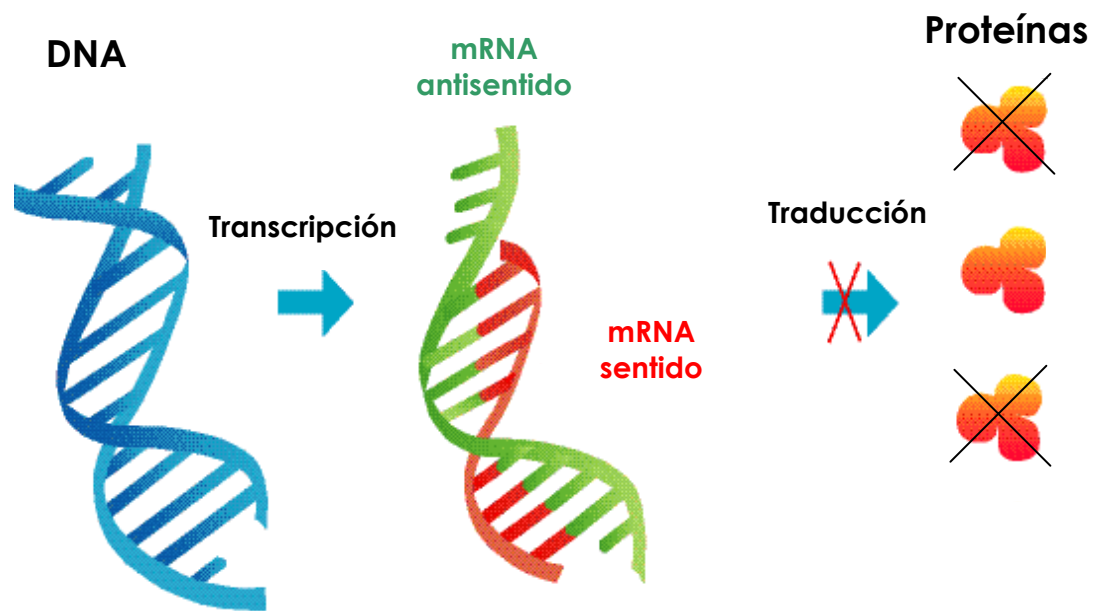
Los resultados en la Figura 7.6 muestran que los niveles de expresión del mRNA de la *Aldh2-S* y RNA de la *Aldh2-AS* a una PVC = 5 son similares entre sí. Para confirmar estos resultados, se realizó una RT-PCR semicuantitativa en que a partir de una reacción de transcripción inversa (RT) se prepararon diluciones seriadas (1/25, 1/75, 1/250, 1/500) para luego efectuar reacciones de PCR independientes.

La Figura 7.7A, muestra los productos de las reacciones de RT-PCR de 1500 pb correspondientes a la ALDH2 endógena (ALDH-S) provenientes de los cultivos de células H4 sin tratar (control). En la Figura 7.7B, se muestra el producto de 1500 pb que corresponde a la ALDH-S (carriles 2 al 6) y el producto de 1500 pb que corresponden a la ALDH-AS (carriles 7 al 11) obtenidos a partir de células H4 transducidas con una PVC = 5. Se puede apreciar que la intensidad de la banda correspondiente al RNA de la *Aldh2* antisentido (ALDH2-AS) usando una dilución de 1/250 de la transcripción inversa como molde es de una intensidad similar a la obtenida con una dilución de 1/75 del amplicón de mRNA de la *Aldh2* sentido. Sin embargo, si se comparan los niveles de mRNA de la ALDH2 sentido proveniente de células H4 transducidas con el vector con los niveles de mRNA de ALDH2 de las células sin virus, la cantidad de RNA de la ALDH2 sentido parece ser igual o levemente mayor a RNA-AS. El hecho que el mRNA sentido y el RNA antisentido de 1500 pb sean detectados en el mismo RNA total extraído de las células H4 sugiere que ambos ácidos nucleicos estén interactuando entre sí formando un dúplex RNA-RNA que no esta siendo degradado. Este mecanismo de ocupación del RNA explicaría la reducción en la actividad de la ALDH2 en células transducidas con el vector AdV-AS (Figura 7.8).



**Figura 7.7: Determinación por RT-PCR de los niveles relativos de mRNA de *Aldh2* sentido y *Aldh2* antisentido (*Aldh2*-AS) en células de hepatoma de rata transducidas con el vector AdV-AS.**

Los niveles de mRNA de la ALDH2 de rata y del vector AdV-AS se determinaron mediante reacciones de transcripción inversa seguida por reacciones de PCR usando distintas diluciones de la transcripción inversa como molde (1/5, 1/25, 1/75, 1/250 y 1/500). Como estándar se ocupó el marcador de peso molecular "1 kb ladder". El control negativo es una reacción de PCR en la que se usó agua en vez de una dilución de transcripción inversa como molde (H<sub>2</sub>O). **A)** Productos de RT-PCR semicuantitativa de 1500 pb correspondientes a la ALDH2 provenientes de cultivos de células de hepatoma de rata. **B)** Niveles relativos de mRNA de *Aldh2* sentido y antisentido luego de 24 horas de transducción con el vector AdV-AS.



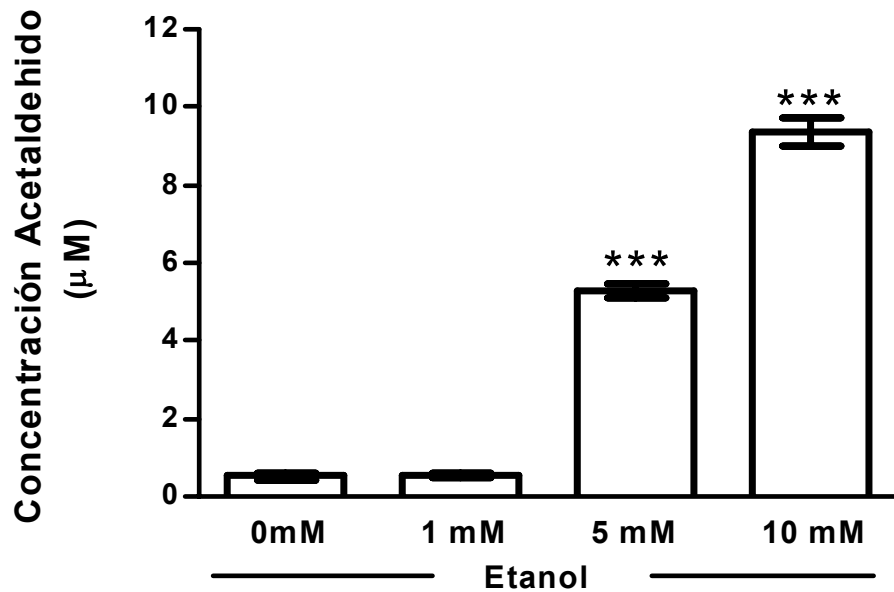
**Figura 7.8: Mecanismo de acción de la ALDH2 antisentido codificado por el vector adenoviral AdV-AS.**

El RNA antisentido con una secuencia complementaria al mRNA *Aldh2* sentido entregado por el vector AdV-AS al expresarse en células de hepatoma de rata híbrida formando un dúplex RNA-RNA. La formación del dúplex RNA-RNA, detiene la traducción y disminuye la formación de proteínas.

## **7.8 ACUMULACIÓN DE ACETALDEHÍDO EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATA H4-II-E-C3 TRANSDUCIDAS CON EL VECTOR AdV-AS**

### **7.8.1 Producción de niveles basales de acetaldehído en células H4-II-E-C3 incubadas con concentraciones crecientes de etanol**

Para determinar si la inhibición de la expresión del gen *Aldh2* y de la actividad ALDH2 conducen a una acumulación de los niveles de acetaldehído en el medio de cultivo de las células H4-II-E-C3, se estudió si existían niveles basales de acetaldehído en los cultivos celulares incubadas con etanol. Las células de hepatoma de rata a las 48 horas de postconfluencia, se incubaron durante 1 hora con concentraciones crecientes de etanol (0, 1, 5 y 10 mM). Los resultados obtenidos en la Figura 7.9 muestran que a una concentración final de etanol de 1 mM genera niveles de acetaldehído (1  $\mu$ M) menores y no significativamente diferentes a la condición control sin etanol (0 mM). Una concentración de etanol de 5 mM acumuló niveles de acetaldehído correspondientes a 5  $\mu$ M, niveles significativamente mayores ( $p < 0,001$ ) a los producidos con 0 y 1 mM. La concentración final de etanol de 10 mM que corresponde a una concentración de consumo moderado de alcohol en humanos, produce 10  $\mu$ M de acetaldehído, niveles que son significativos en comparación con la condición 0 mM sin alcohol y 1 mM ( $p < 0,001$ ). A partir de estos resultados se estableció estudiar el efecto del gen *Aldh2* antisentido en presencia de una concentración final de etanol equivalente a 10 mM.



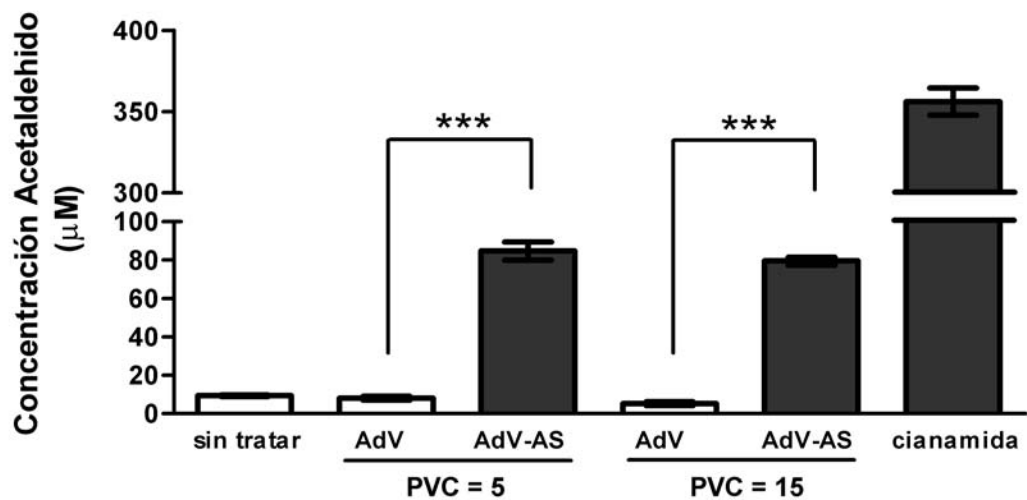
**Figura 7.9: Acumulación de acetaldehído en células de hepatoma de rata incubadas con concentraciones crecientes de etanol.**

Células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se incubaron con distintas concentraciones de etanol durante 1 h, y el acetaldehído acumulado en el medio se cuantificó por HPLC. Las barras representan la concentración de acetaldehído en el medio de cultivo de las células H4. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Control (0 mM etanol) vs. 5 y 10 mM: \*\*\* $p < 0,001$ .



### **7.8.2 Acumulación de acetaldehído en células H4-II-E-C3 transducidas con el vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido**

Las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se transdujeron durante 24 horas con un vector control vacío (AdV) o un vector antisentido AdV-AS a 2 dosis (PVC = 5 y PVC = 15). Todos los cultivos se incubaron con una solución de etanol para generar una concentración final de etanol equivalente a 10 mM. Como control de acumulación de acetaldehído por inhibición de ALDHs se trataron placas con el inhibidor cianamida. La Figura 7.10 muestra que la transducción de cultivos de células de hepatoma de rata con el vector AdV-AS aumentó la producción de acetaldehído en 8 veces (de 10  $\mu$ M a 80 – 90  $\mu$ M;  $p < 0,001$ ) con respecto a las células controles sin transducir o respecto a células en presencia de una dosis equivalente del AdV-vacío. Sin embargo a las dos dosis del vector AdV-AS, a una dosis baja (PVC = 5) y a una dosis alta (PVC = 15) los aumentos en los niveles de acetaldehído generado son similares y no presentan diferencias significativas entre sí. Los niveles de acetaldehído en células incubadas con el inhibidor no-específico cianamida (100  $\mu$ M, 1 hora) acumularon acetaldehído en concentraciones de 350  $\mu$ M.



**Figura 7.10: Acumulación de acetaldehído en células de hepatoma de rata transducidas con el vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido.**

Las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 se transdujeron con un vector adenoviral control (AdV) y el que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) a dos dosis (PVC = 5 y PVC = 15) durante 24 h. Dos días luego de la transducción, las células se incubaron con etanol 10 mM durante 1 h, y el acetaldehído acumulado en el medio se cuantificó mediante HPLC. Como control negativo se usaron células H4 sin tratar y como control positivo células incubadas con cianamida (100 μM durante 1 h) para alcanzar la máxima inhibición de la ALDH2. Los resultados se expresaron como el promedio ± SEM de cuatro experimentos independientes. AdV vs. AdV-AS: \*\*\*p<0,001. Células no tratadas vs. AdV (PVC = 5 ó 15): no significativo.

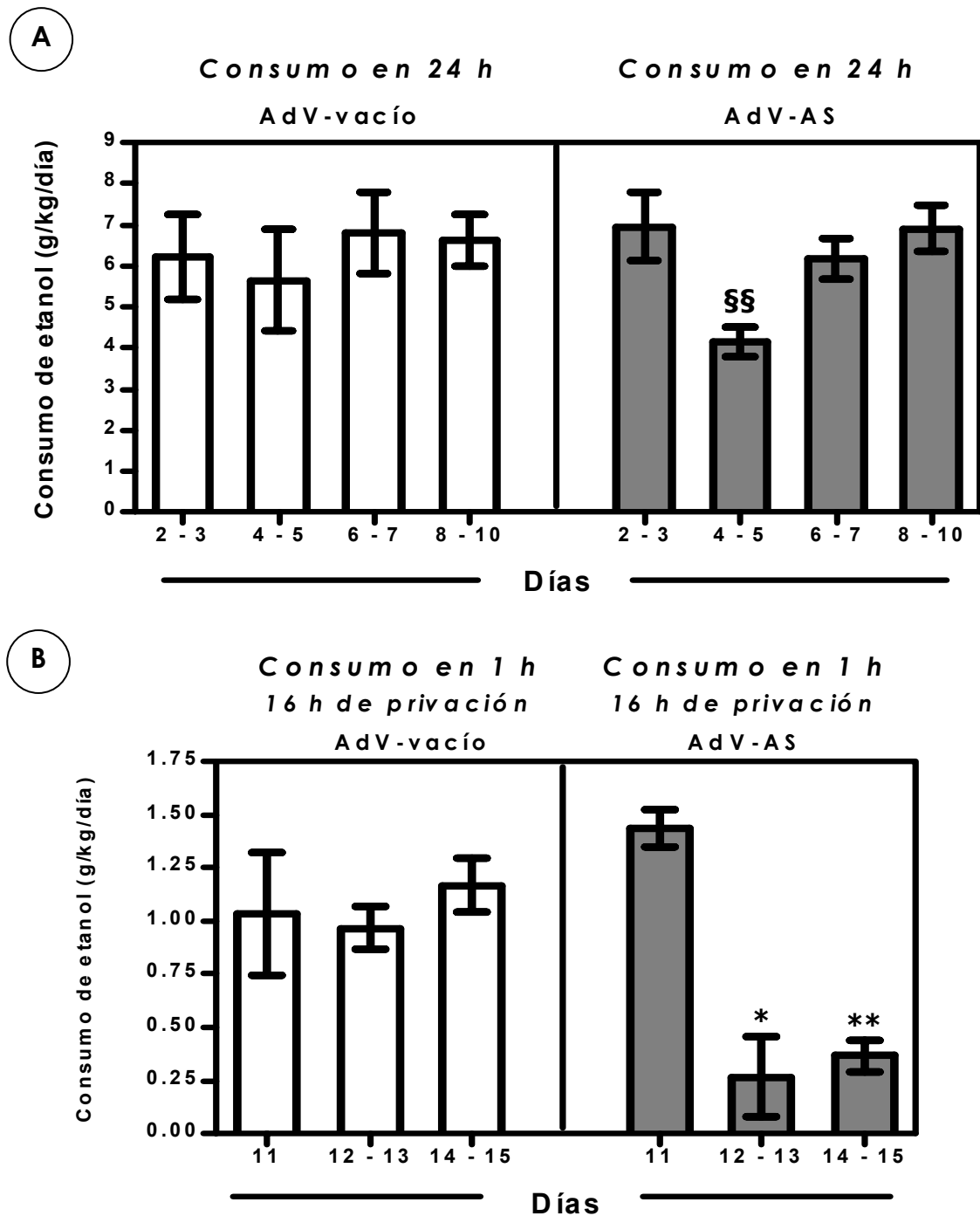
## **7.9 INHIBICIÓN DEL CONSUMO DE ALCOHOL POR EL GEN ANTISENTIDO ANTI-*Aldh2*. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL ANTI-*Aldh2* SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL DE RATAS BEBEDORAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE (LÍNEA UChB): ESTABLECIMIENTO DEL RÉGIMEN DE ACCESO LIMITADO**

Realizados los experimentos *in vitro* con las células H4-II-E-C3 y establecidos los efectos del vector adenoviral de primera generación AdV-AS es decir: i) reducción de la actividad de la ALDH2 y ii) aumento en los niveles de acetaldehído a las dos dosis del vector y su comparación con un vector adenoviral control AdV-vacío, se procedió a determinar si efectos similares se obtenían *in vivo*, específicamente con el modelo animal de la línea de ratas Universidad de Chile Bebedoras(UChB).

En el Estudio #1 se utilizaron 8 ratas de la línea UChB a los cuales se les registró el consumo voluntario de agua y de una solución al 10% de etanol diariamente durante 2 meses. El consumo de etanol promedio registrado durante los últimos 30 días, momento en que se inició el experimento para este grupo de animales fue de  $6,9 \pm 1,1$  g/kg/día. A continuación, los animales se dividieron en 2 grupos en que al primer grupo se les inyectó una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv/kg del vector adenoviral AdV-AS y al segundo grupo una dosis igual ( $3 \times 10^{11}$  pv/kg ) del vector AdV-vacío. Los animales con acceso libre durante las 24 h a las dos soluciones ofrecidas, mostraron al día 4 y 5 de haber recibido el vector AdV-AS, una disminución significativa de 30% ( $p < 0.01$ ) en el consumo de alcohol (Figura 7.11A), volviendo durante los días restantes a un consumo normal (día 7 al día 10), en comparación al grupo que recibió el vector control (AdV-vacío). Los animales que recibieron una dosis similar del vector AdV-vacío no

mostraron diferencias significativas en el consumo diario de la solución de etanol 10% durante los 10 primeros días.

Los estudios sugirieron que una aversión al alcohol se obtendría sólo cuando el animal tratado con AdV-AS puede aparear los efectos disfóricos del etanol con su consumo, y que por consiguiente ésta asociación se vería aumentada si los animales tuviesen acceso a etanol sólo por un corto período al día. Además, estudios en la literatura (Murphy y cols., 1986; Sinclair y cols., 1992) demuestran que ratas que se han habituado al consumo de alcohol luego de un consumo prologado consumen grandes cantidades de alcohol cuando son expuestas a una solución de alcohol por tan sólo una hora al día (paradigma de acceso limitado). Por consiguiente, finalizado el día 10 de oferta *ad-libitum* de alcohol y agua, los animales se privaron de la solución de etanol durante 16 horas (*“overnight”*) para comenzar un período denominado de acceso limitado de 1 hora. Esta etapa de acceso limitado consistió en ofrecer a los animales durante 1 hora determinada del día una solución de etanol 10% y agua. Transcurrida la hora, se retiró la botella graduada que contenía la solución de etanol y durante las 23 horas restantes, el animal continuó con acceso libre a la botella con agua. Los resultados obtenidos (Figura 7.11B) con esta metodología de acceso limitado muestran que al primer día de acceso limitado (día 11 del Estudio #1) el consumo de etanol fue alto (1,2 g/kg/h) tanto para los animales tratados con el vector AdV-AS como con el vector AdV-vacío. Durante los días 12 y 13 se observó un 66% de reducción en el consumo de alcohol en animales tratados con AdV-AS versus animales controles, consumo que se mantuvo bajo durante 2 días más (días 14 y 15). El experimento se finalizó el día 15 en que el promedio de inhibición del consumo de alcohol inducido por AdV-AS en la “condición acceso limitado de 1 h” fue de 60 – 70% ( $p < 0.02$  y  $p < 0.002$  respectivamente).



**Figura 7.11: Efecto de la administración de un vector adenoviral anti-*Aldh2* sobre el consumo de alcohol de ratas bebedoras de la Universidad de Chile.**

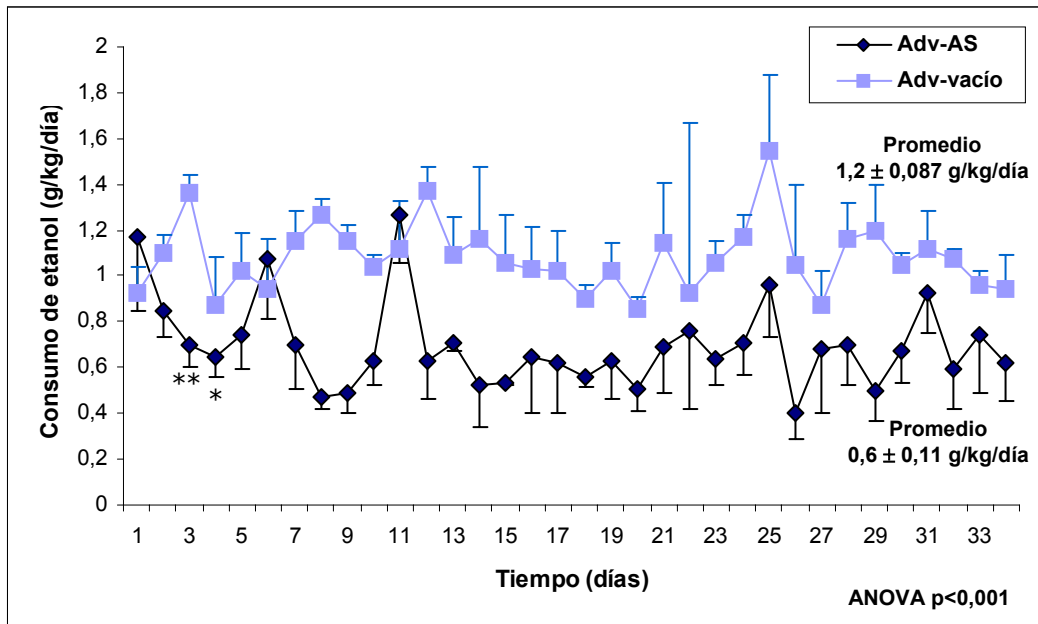
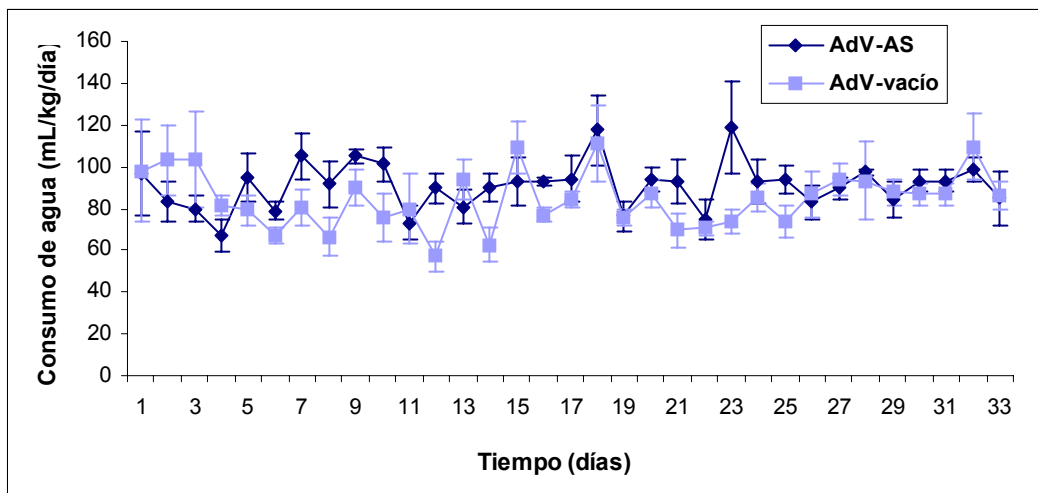
Ratas de la línea UChB se dividieron en dos grupos en que al primer grupo se les administró una dosis de  $3 \times 10^{11}$  pv /kg del vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido (AdV-AS) y al segundo grupo una dosis equivalente de un vector control (AdV-vacío). **A**) Se registró el consumo libre durante 24 h de una solución de etanol 10% (vol./vol.) a ambos grupos durante 10 días. (En el día 1, día en que el AdV-AS y AdV-vacío se administraron por vía venosa, problemas técnicos impidieron obtener datos confiables). Finalizado el día 10 y luego de 16 h de privación a la solución de etanol, **B**) se inició un régimen de consumo de acceso limitado en que la solución se presenta a los animales solamente durante 1 hora al día. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  SEM. AdV-AS días 4-5 vs AdV-AS días 2-3:§§  $p < 0,01$ . AdV-AS vs Adv-vacío días 12-13: \* $p < 0,02$ ; y 14-15 \*\* $p < 0,002$ .

#### **7.10 ESTUDIOS DE LARGA DURACIÓN: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL ANTI-*Aldh2* SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL EN RATAS DE LA LÍNEA UChB**

Los estudios realizados con vectores adenovirales de primera generación en murinos (Toietta y cols., 2005; Maione y cols., 2001; Ilan y cols., 1997; Wadsworth y cols., 1997; Kim y cols., 2001), han establecido una duración aproximada del transgen de 4 semanas. Con estos antecedentes y establecido el régimen de consumo de la solución de etanol al 10% en la condición de acceso limitado durante 1 hora, se determinó la duración del efecto del vector AdV-AS por un mes.

En el Estudio #2 se utilizaron ocho ratas hembras de la línea UChB que promediaron un consumo voluntario de alcohol de 24 horas de  $6,8 \pm 0,86$  g/kg/día durante los últimos 30 días. Estos animales se dividieron en 2 grupos, el primer grupo recibió una dosis por vía intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg del vector adenoviral AdV-AS y al segundo grupo una dosis igual del AdV-vacío. Inmediatamente después de la inyección con los vectores adenovirales, se retiraron las soluciones de etanol para iniciar 3 días de abstinencia. Al día 4 de haber aplicado el vector adenoviral (día 1 de la Figura 7.12A) se inició la condición de acceso limitado de 1 hora proceso que se repitió hasta el día 34 (Fig. 7.12A). Los resultados (Figura 7.12) muestran -como fuese esperado- que durante el primer día los dos grupos de animales consumieron cantidades similares e intoxicantes de etanol del orden de 1-1,2 g/kg/hora. Los animales que recibieron el vector control AdV-vacío aumentaron progresivamente su consumo hasta 1,35 g/kg/hora al día 3 mientras que a partir del día 2, el consumo de etanol en el grupo AdV-AS comenzó a disminuir gradualmente. A partir del día 5 el consumo de etanol (0,5-0,6 g/kg/hora) en los animales tratados con AdV-AS comenzó a aumentar

gradualmente volviendo a niveles similares a los iniciales al día 6 ( $1,07 \pm 0,26$  g/kg/h). Este comportamiento cíclico de consumo, disminución y aumento, se repitió una vez más, siendo cada ciclo de 6 días. A partir del día 12 los niveles de consumo de etanol de los animales que recibieron el vector AdV-AS se estabilizó a un consumo promedio de 0,6 g etanol por kilogramo de peso corporal. Durante los 34 días de acceso limitado de 1 hora, los animales controles tratados con el vector AdV-vacío promediaron un consumo de 1,2 g de etanol por kilogramo de peso corporal indicando que la presencia del vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido disminuyó en 50% el consumo de etanol (ANOVA  $p < 0.001$ ). En los mismos animales se registró el consumo de agua durante la condición de acceso limitado y durante las 23 horas de acceso libre a agua. Los resultados (total de 24 horas) en la Figura 7.12B muestran que la cantidad de fluidos totales consumidos por el grupo de animales tratados con el vector AdV-AS es igual a la consumida por los animales AdV-vacío, no mostrándose diferencias significativas. En el período acceso limitado, el consumo de agua en una hora es virtualmente cero.

**A****B**

**Figura 7.12: Duración (34 días) del efecto del vector AdV-AS anti-*Aldh2* sobre el consumo voluntario de una solución de etanol.**

Ratas de la línea UChB recibieron una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv /kg del vector AdV-AS o una dosis equivalente del vector control (AdV-vacío). **A) Determinación del consumo voluntario de alcohol en el régimen de acceso limitado de 1 hora.** Luego de un consumo de alcohol *ad-libitum* durante 60 días, se administraron los vectores virales y se implementó una abstinencia de 3 días. Comenzando al día 4 (día 1 en la Figura) se ofreció una solución de etanol (10% v/v) por una hora al día, midiéndose el consumo de cada animal en tal período. AdV-AS versus AdV-control: ANOVA =  $p < 0.001$ . Diferencias en el consumo de alcohol durante los días 3 y 4 en las ratas con antisentido respecto al consumo que ellas exhibieron el día 1 ( $*p < 0.05$ ). Diferencia significativa entre ratas con virus AdV-vacío y AdV-AS  $**p < 0,001$ . **B) Consumo de agua total en los animales tratados con los distintos vectores adenovirales.** El consumo total de agua (24 horas) no mostró diferencias entre los dos grupos (AdV-AS vs. AdV-vacío).



### **7.10.1 Duración del efecto de la administración del vector AdV-AS anti-*Aldh2* sobre la actividad de las ALDHs**

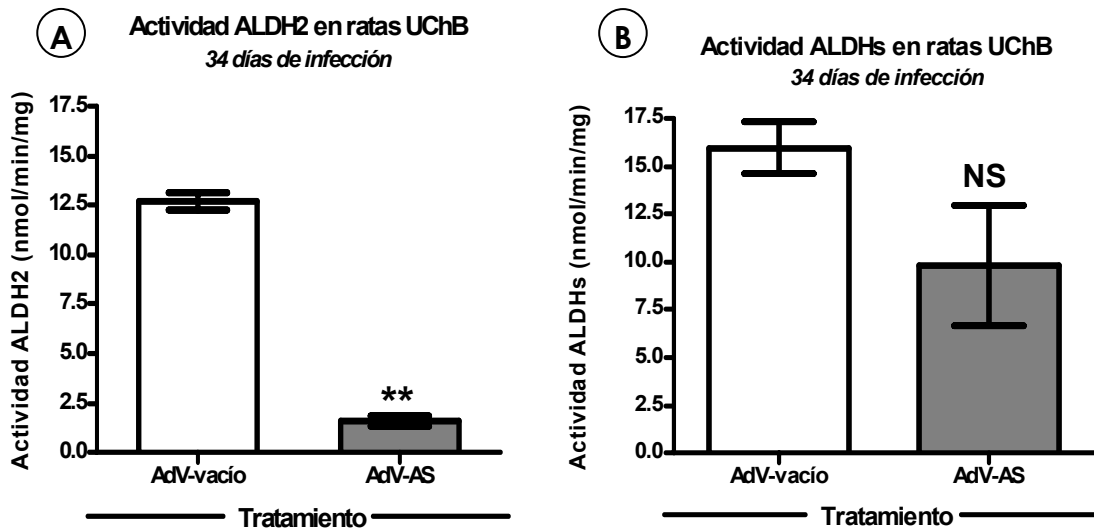
Finalizada la determinación del consumo voluntario de alcohol en el régimen de acceso limitado, a los 34 días se sacrificaron los animales. Se determinó la actividad ALDH total y la ALDH2 mitocondrial (Figura 7.13) a partir de las proteínas totales provenientes del homogenizado hepático. Para discriminar entre la ALDH2 y las ALDHs totales se utilizaron, basados en las  $K_m$  para estas enzimas, dos concentraciones saturantes del sustrato propionaldehído (21  $\mu$ M y 1 mM, respectivamente). Los resultados (Figura 7.13A) muestran una inhibición de la ALDH2 de 90% en animales tratados con el vector AdV-AS en comparación con la actividad de las ALDHs que recibieron el vector AdV-vacío. Sin embargo no se observó un efecto en la actividad total de las ALDHs (Figura 7.13B); [Figuras 7.13 en página 70].

### **7.10.2 Evaluación de una posible activación del sistema del interferón por dúplex RNA-RNA. Evaluación de 2´-5´A oligonucleótido sintetasa en el hígado de animales tratados con AdV-AS**

En los experimentos *in vitro* descritos previamente (Figura 7.6), se demostró que la expresión del gen antisentido anti-*Aldh2* no redujo el nivel de mRNA de la ALDH2 endógeno, sugiriendo la formación de un dúplex RNA sentido-RNA antisentido que bloquearía la traducción del mRNA de *Aldh2* (Figura 7.8).

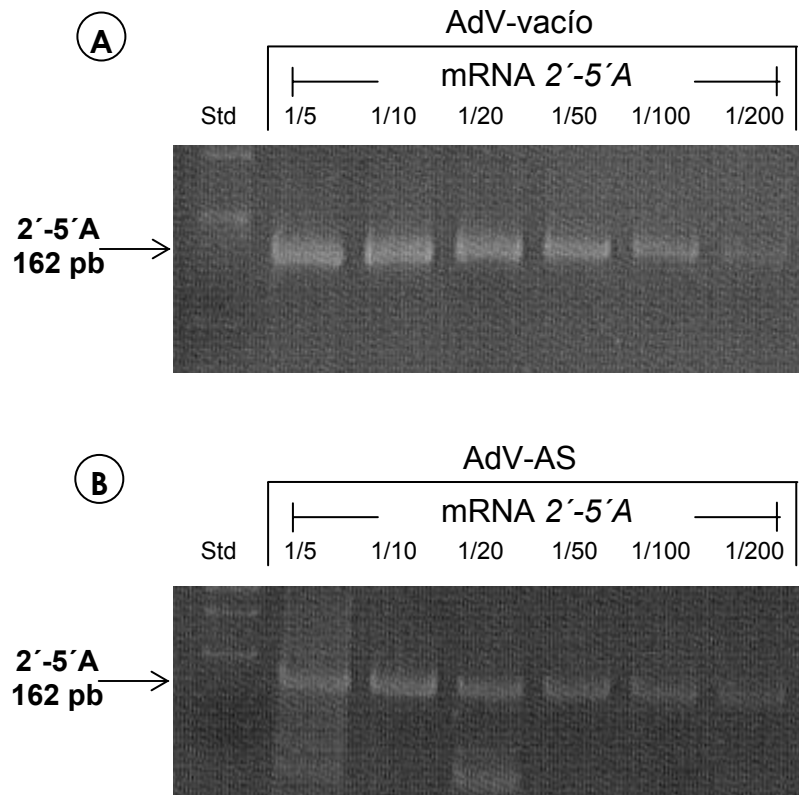
En base a estudios en 1975 con reticulocitos (Hunter y cols., 1975) se ha descrito que la presencia de RNAs de doble cadena de una longitud mayor de 30 pb en el interior de las células, puede activar mecanismos de toxicidad reminiscentes a los de defensa antiviral contra retrovirus de RNA de doble hebra (sistema de interferón) que conducen

a un bloqueo masivo de la síntesis de proteínas y a la degradación inespecífica del RNA (Stark y cols., 1998; Al-khatib y cols., 2004). En los estudios en esta tesis se determinó si el sistema del interferón es gatillado por la formación de un dúplex RNA-RNA (RNAs de *Aldh2* sentido hibridando con *Aldh2* antisentido). Para ello, se extrajo el RNA total de hígado de rata obtenido de animales infectados con el vector anti-*Aldh2* (AdV-AS) y el vector AdV-vacío (control). La expresión del gen *2'-5'A oligonucleótido sintetasa (2'-5'A)* se evaluó mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados de la Figura 7.14 muestran la cuantificación de la expresión del gen *2'-5'A oligonucleótido sintetasa*. En estos estudios, a partir del producto de una reacción de transcripción inversa (RT) se prepararon diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200) para luego efectuar las reacciones de PCR independientes. La Figura 7.14A muestra los productos de RT-PCR de la *2'-5'A* proveniente de ratas UChB infectadas con el vector AdV-vacío y la Figura 7.14B el producto proveniente de ratas UChB tratadas con el vector AdV-AS. Los resultados obtenidos muestran claramente que los animales infectados con el vector adenoviral de primera generación que porta el gen antisentido de la ALDH2 no muestran un incremento significativo en la expresión del gen marcador de activación de la vía de interferón respecto de los animales controles. La cantidad de molde utilizada se ajustó en todas las muestras en base a la amplificación del cDNA de  $\beta$ -actina de rata utilizada como control interno.



**Figura 7.13: Efecto de la administración de una dosis de un vector AdV que porta el gen *Aldh2* antisentido sobre la actividad ALDH después de 34 días de “condición acceso limitado”.**

Ratas de la línea UChB recibieron una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg del vector adenoviral anti-*Aldh2* (AdV-AS) o de un vector control vacío (AdV-vacio). Los animales se sacrificaron a los 38 días de la administración de los distintos vectores (y acceso limitado de alcohol durante 34 días) y se determinó la actividad de la ALDH hepática. Para discriminar entre la ALDH2 y las ALDHs totales se utilizaron dos concentraciones distintas del sustrato propionaldehído: 21  $\mu$ M y 1 mM, respectivamente. **A)** Actividad de la ALDH2 en ratas UChB tratadas con una sola dosis de los vectores AdV-AS o AdV-vacio. **B)** Actividad de las ALDHs totales en ratas UChB tratadas con los distintos vectores adenovirales: AdV-AS o AdV-vacio. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. En A) T-test AdV vs AdV-AS:  $**p < 0,002$ . En B) T-test: no significativo (NS).



**Figura 7.14: Cuantificación de la expresión del gen 2'-5'A oligonucleótido sintetasa mediante la técnica RT-PCR semicuantitativa después de 38 días de infección.**

Ratas de la línea UChB recibieron una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg de un vector adenoviral anti-*Alch2* (AdV-AS) o del vector control vacío (AdV-vacío). Los animales se sacrificaron a los 38 días de la administración de los distintos vectores y se les cuantificó la expresión del gen 2'-5'A oligonucleótido sintetasa a partir de RNA total hepática. Se realizaron diluciones seriadas de la reacción de transcripción inversa. La cantidad de molde se ajustó en todas las muestras en base a la amplificación del cDNA de  $\beta$ -actina de rata como control interno. Se muestran dos experimentos representativos. **A)** Expresión del gen 2'-5'A oligonucleótido sintetasa en ratas UChB tratadas con el vector AdV-vacío. **B)** Expresión del gen 2'-5'A oligonucleótido sintetasa en ratas UChB tratadas con el vector AdV-AS. Como puede observarse, la señal de 2'-5'A oligonucleótido no es aumentada por AdV-AS.

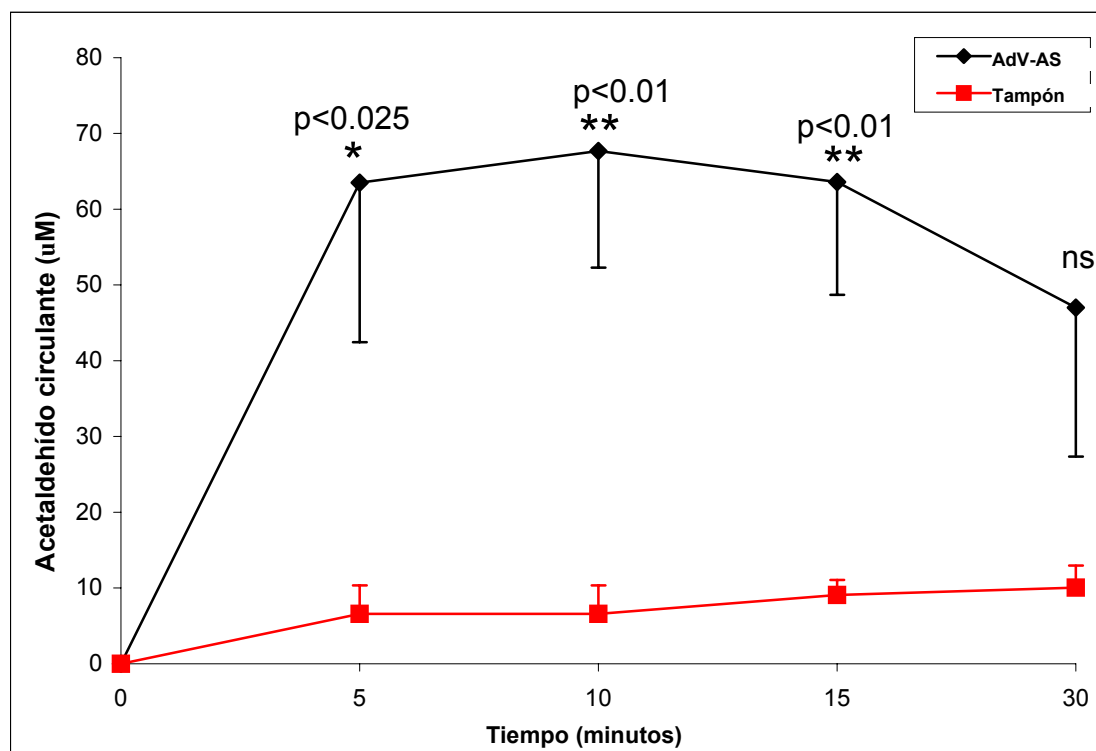
## **7.11 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL ANTI-*Aldh2* SOBRE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE ACETALDEHÍDO**

Los resultados indicados anteriormente (Estudio #2) demostraron que la administración del vector AdV-AS lleva a una marcada reducción en el consumo de alcohol, la que es constante 10-12 días después de la administración de AdV-AS y a una marcada disminución en la actividad ALDH2 a los 38 días. Los estudios siguientes (Estudio #3) determinaron si la reducción en el consumo de etanol en los días iniciales estaba asociada a un aumento en los niveles de acetaldehído y a una inhibición de la actividad de la ALDH2 hepática. Para ello, dos grupos de ratas hembras de la línea UChB con previo acceso *ad-libitum* a agua y a etanol 10% (vol./vol.) durante 60 días, recibieron una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg del vector adenoviral AdV-AS o un volumen equivalente del tampón de almacenamiento de los vectores adenovirales. Tras las inyecciones, los animales en jaulas individuales se sometieron a tres días de privación de la solución de etanol manteniendo el acceso libre al agua. Al cuarto día se inició la condición de acceso limitado de 10% etanol durante 1 hora al día, proceso que se repitió durante 10 días. Durante los 10 días de acceso limitado el consumo promedio de etanol en el grupo control (tampón) fue  $0,98 \pm 0,09$  g/kg/h mientras que el grupo de animales tratados con el vector AdV-AS promediaron un consumo de  $0,62 \pm 0,1$  g/kg/h equivalente a una inhibición del consumo de alcohol de 37% ( $p < 0,05$ ). Transcurridos los 10 días de acceso limitado, se procedió a determinar la concentración sanguínea de acetaldehído a distintos tiempos luego de administrar una dosis de etanol constante a ambos grupos (1 g/kg i.p. de etanol al 20% vol./vol.). Tales ratas, habiendo recibido el vector AdV-AS con anterioridad de 13 días (3 días de abstinencia más 10 días acceso limitado), se anestesiaron para administrarles la solución de etanol y extraerles sangre arterial para la determinación de acetaldehído a distintos tiempos después de la

administración de etanol. Los animales que recibieron el vector AdV-AS mostraron marcados aumentos en los niveles de acetaldehído sanguíneo a los 5 minutos de ser administrado el etanol, con valores cercanos a los 60  $\mu\text{M}$ , niveles que se mantuvieron elevados durante 10 a 15 minutos, llegando a 40  $\mu\text{M}$  a los 30 minutos. Los animales controles mostraron niveles de acetaldehído del orden de 6-14  $\mu\text{M}$  y no mostraron diferencias significativas (Figura 7.15), a los diferentes tiempos medidos. Estos experimentos sugieren que un aumento en los niveles de acetaldehído plasmático es responsable de la reducción en el consumo de alcohol en animales tratados con AdV-AS.

#### **7.11.1 Medición de la alcoholemia en animales tratados con el vector anti-*Aldh2***

El día anterior a la determinación de los niveles plasmáticos de acetaldehído en las ratas UChB, se midió la concentración sanguínea de etanol que presentan los animales al beber alcohol. Este procedimiento se realizó inmediatamente después de transcurrida la hora de la “condición acceso limitado” en 1 mL de sangre obtenida de la cola del animal. El promedio del consumo de etanol en los animales el día de la medición de la alcoholemia (día 9) fue de  $1,09 \pm 0,38$  g/kg/hora y  $0,62 \pm 0,27$  g/kg/h para los animales controles y tratados con el vector AdV-AS, respectivamente. Los niveles de alcohol sanguíneo (Tabla 7.1) obtenidos para el grupo control fueron de  $39,0 \pm 3,0$  (mg/100mL) mientras que para los animales tratados con el vector AdV-AS, la alcoholemia fue de  $21,7 \pm 8$  (mg/100mL) lo que concuerda con los datos de ingesta de alcohol. La diferencia entre las alcoholemias obtenidas entre el grupo control y el grupo AdV-AS es de 44% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.15: Niveles de acetaldehído generados por la administración de etanol en ratas de la línea UChB tratadas con una sola dosis del vector AdV-AS durante 13 días.**

A ratas de la línea UChB tratadas con una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg de un vector adenoviral anti-*Aldh2* (AdV-AS) o con un volumen equivalente de tampón, se les administró 1 g/kg i.p. (etanol 20% vol./vol.). Los niveles de acetaldehído arterial se determinaron a los 5, 10, 15 y 30 minutos. Los niveles de acetaldehído en los animales AdV-AS, aumentaron 8 veces por sobre los niveles de animales controles a los 5 minutos, los que se mantuvieron elevados hasta los 15 minutos. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM (\*p<0,025; \*\*p<0,01; ns = no significativo).

**Tabla 7.1.**

**Niveles de etanol sanguíneo en ratas UChB tratadas con el vector que porta el gen *Aldh2*-antisentido al finalizar el acceso de 1 hora**

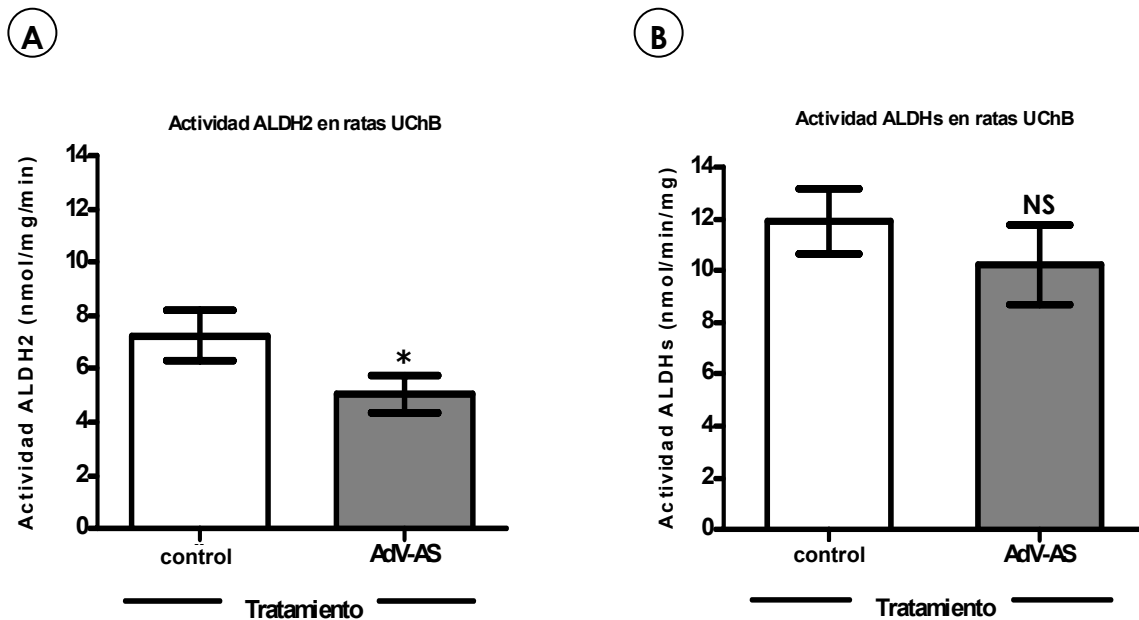
| Concentración Sanguínea de Etanol (mg/100 mL) |                |
|---|----------------|
| Grupo control                                 | Grupo AdV-AS   |
| 33,34   | 35,5           |
| 39,44   | 21,8           |
| 43,88   | 8,0            |
| (3) 39,0 ± 3,0                                | (3) 21,7 ± 7,6 |

La concentración sanguínea de etanol se determinó al finalizar el período de 1 hora de acceso al etanol en 0,1 mL de sangre obtenida de la cola del animal. El etanol se cuantificó mediante cromatografía de gases. Los grupos analizados corresponden a animales tratados con el vector que porta el gen antisentido anti-*Aldh2* (grupo AdV-AS) o animales que recibieron un volumen equivalente de tampón de almacenamiento del vector (grupo control). Los resultados se expresaron como promedio ± SEM (n=3) p<0,05. La diferencia entre las alcoholemias corresponde a un 44%.



### **7.11.2 Efecto de la administración del vector AdV-AS anti-*Aldh2* sobre la actividad de las ALDHs de las ratas UChB**

Transcurridos los 10 días de acceso limitado en el Estudio #3, los animales se sacrificaron y sus hígados fueron homogeneizados para determinar la actividad de las ALDHs y de la ALDH2. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad ALDH2 proveniente de los animales tratados con AdV-AS (Figura 7.16A) es 37,5% menor que la actividad ALDH2 en los animales que recibieron el tampón ( $10,4 \pm 3,1$  g/kg/h disminuyó a un  $6,5 \pm 0,25$  g/kg/h;  $p < 0.05$ ). La actividad de las ALDHs totales no mostró un cambio significativo (Figura 7.16B). Estos datos fuertemente apoyan la hipótesis que la disminución en el consumo de la solución de etanol en ratas bebedoras tratadas con el vector adenoviral que porta el gen *Aldh2* antisentido se debe a una reducción en la actividad de la ALDH2 hepática y que esta reducción en la actividad enzimática sería la causante de los niveles plasmáticos de acetaldehído circulante elevados (Figura 7.15).



**Figura 7.16: Efecto del vector anti-*Aldh2* en ratas de la línea UChB sobre la actividad ALDH.**

Ratas de la línea UChB recibieron una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv/kg de un vector adenoviral anti-*Aldh2* (AdV-AS) o de tampón de almacenamiento (control). Los animales se sacrificaron a los 13 días de la administración de los distintos vectores y se les determinó la actividad de la ALDH hepática. Para discriminar entre la ALDH2 y las ALDHs totales se utilizaron dos concentraciones distintas del sustrato propionaldehído que está basado en la  $K_m$  para cada una:  $21 \mu\text{M}$  y  $1 \text{mM}$ , respectivamente. **A)** Actividad de la ALDH2 en ratas UChB tratadas con una sola dosis del vector AdV-AS o tampón. **B)** Actividad de las ALDHs totales en ratas UChB tratadas con el vector AdV-AS o con un volumen equivalente de tampón. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM. T-test, AdV-AS vs control \* $p < 0,05$ ; NS = no significativo.

## 8. DISCUSIÓN

La deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2), una de las enzimas que participa en la metabolización del acetaldehído generado en la oxidación del etanol, constituye un buen blanco farmacológico en el tratamiento del alcoholismo. Los individuos normales que presentan una actividad disminuida de esta enzima padecen efectos como náuseas, vómitos y malestar generalizado al consumir bebidas alcohólicas, lo que los lleva a desarrollar una aversión a la ingesta de alcohol. Tal condición es la que se trata de producir por el uso de fármacos que reducen la actividad de la ALDH2.

La protección contra el abuso del alcohol y el alcoholismo generada por el polimorfismo Glu487Lys de la ALDH2 (ALDH2\*2), que resulta en una enzima virtualmente inactiva, es de 66-75% en los individuos heterocigotos, y cercana al 100% en los individuos que portan la mutación en ambos alelos (Chen y cols., 1999; Goedde y cols., 1983; Harada y cols., 1982; Li, 2000; Thomasson y cols., 1991; Tu e Israel, 1995). Consistente con tal protección contra el alcoholismo, se ha descrito que la cirrosis alcohólica disminuye en 70% en la población que porta el alelo *ALDH2\*2* (Chao y cols., 1994; Nagata y cols., 2002). Un estudio reciente realizado en 640 niños y adultos mayores en China mostró que la prevalencia del alelo *ALDH2\*2* es constante a las distintas edades, indicando que la ALDH2\*2 no tiene un efecto adverso sobre la sobrevida del individuo en la población general (Luo y cols., 2005).

Hasta muy recientemente, el tratamiento farmacológico del alcoholismo se ha basado principalmente en el uso del disulfiram, un fármaco poco específico que inhibe a la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial y otras deshidrogenasas, que produce un marcado aumento en los niveles de acetaldehído cuando el alcohol es consumido. Sin

embargo, existe poco compromiso por parte del paciente alcohólico con la ingesta diaria del fármaco. Además una marcada toxicidad y efectos secundarios llevan a discontinuar su uso.

Una marcada elevación en los niveles de acetaldehído sanguíneo al consumir alcohol, debido a la presencia de un medicamento como el disulfiram o a una mutación inactivante en el gen *ALDH2*, da como resultado efectos disfóricos indicados anteriormente que incluyen mareo, náuseas, hipotensión, neuropatías y palpitaciones cardíacas (Mizoi y cols., 1983), los que generan una aversión al alcohol. Aunque el 50 al 60 % de la susceptibilidad a desarrollar alcoholismo es genética, ésta es multigénica no pudiendo atribuirse a un solo gen. Por otra parte, imitar la marcada protección contra el alcoholismo que se observa en individuos asiáticos por la mutación inactivante de un solo gen, es una estrategia factible para desarrollar una terapia en contra del alcoholismo.

Debe, sin embargo, indicarse que una terapia de este tipo comenzaría sólo en individuos que ya son bebedores problema o incluso en individuos dependientes al alcohol, a diferencia de la protección contra el alcoholismo en asiáticos que presentan el alelo *ALDH2\*2*. Como se discute más adelante, los estudios en que Garver y cols. (2001) demostraron que oligonucleótidos de antisentido anti-*Aldh2* inhiben el consumo de alcohol en ratas fueron hechos en animales “naive”, es decir analogando la protección contra el alcoholismo en asiáticos y no una protección terapéutica.

## 8.1 LA CÉLULA DE HEPATOMA DE RATA COMO UN MODELO DE ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Aldh2*

La presencia de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) en las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 fue descrita por Huang y Lindahl en 1990. En 2001, Garver y colaboradores utilizaron las células H4-II-E-C3 como modelo para estudiar la inhibición génica de la ALDH2. Los estudios demostraron que la transfección a tales células de un oligonucleótido fosforotioato de antisentido de 21 nucleótidos (nt) dirigido contra el mRNA de la ALDH2, redujo su actividad en 80%. La medición de la actividad de la ALDH2 en estos estudios necesitó del aislamiento de las mitocondrias de los cultivos celulares los que: i) tienen una recuperación y pureza variables y ii) requiere de un número considerable de células de hepatoma de rata (Garver y cols., 2001).

En el año 2003, Moncada y colaboradores determinaron la actividad de la ALDH2 en cultivos de células H4-II-E-C3 con distinto grado de confluencia. La actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial ALDH2 fue menor en células que se dividían activamente y aumentó en un 150% después de 48 horas postconfluencia, condición en que se detiene la división celular, lo que concuerda con lo observado en una condición *in vivo* en posthepatectomía parcial (Watanabe y cols., 1985). Con estos antecedentes, se optó por medir la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial en células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 a las 48 horas de postconfluencia (Figura 7.1A) utilizando un método espectrofotométrico (Tank y cols., 1981; Cao y cols., 1989). Este método consiste en determinar la actividad de la ALDH2 desde un lisado total de células mediante la incubación con el sustrato y medir la formación de NADH que se registra a 340 nm.

Una de las desventajas de la utilización de esta metodología según lo descrito por Moncada y cols., (2003) consistiría en la baja absorbancia espectrofotométrica para el NADH al utilizar una concentración de sustrato en el rango de 15 a 25  $\mu\text{M}$ . Por lo mostrado en la Figura 7.1A y utilizando una concentración de sustrato de 21  $\mu\text{M}$  final, las diferencias obtenidas en las lecturas de densidad óptica son lo suficientemente nítidas para los propósitos requeridos. Se puede claramente discriminar entre una muestra que contiene un lisado de células H4 control sin tratar y una muestra cuyas células se incubaron previamente a la lisis con cianamida, un inhibidor químico de las deshidrogenasas aldehídicas (Pruñonosa y cols., 1991).

#### **PRODUCCIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL DE PRIMERA GENERACIÓN QUE CODIFICA EL GEN *Aldh2*-ANTISENTIDO**

En estudios *in vivo* se ha demostrado que luego de la administración de un vector adenoviral por vía intravenosa, éstos son principalmente captados por el hígado, donde su DNA permanece de manera episomal (Le Gal La Salle y cols., 1993; Kuzmin y cols., 1997; Schiedner y cols., 2003), por lo que no hay riesgos de inserción al genoma celular. En esta tesis se usó un vector adenoviral AdV que porta un gen que codifica un RNA de antisentido de 1800 pares de bases dirigido contra el mRNA de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial ALDH2 (Karahanian y cols., 2005).

La producción de los vectores adenovirales en el laboratorio (Figura 7.2) consta de 3 grandes etapas: i) transfección de células (HEK) 293 con dos plasmidios (40 kb y 8.8 kb) que por recombinación homóloga resultan en una molécula de DNA de 36 kb siendo éste el tamaño requerido para su empaquetamiento óptimo en la cápside viral, ii) lisis celular y, iii) purificación de los virus por gradiente de cloruro de cesio. Se ha

descrito que para utilizar esta técnica de purificación (Mittereder y cols., 1996), se necesita como mínimo una producción de  $3 \times 10^8$  partículas virales por mL para obtener una banda viral nítida y visible a simple vista. Estos niveles de producción de partículas virales infectivas son suficientes para realizar experimentos con cultivos celulares sin embargo, son insuficientes para realizar experimentos *in vivo*. Los experimentos *in vivo* descritos en la literatura en que se han utilizado vectores adenovirales de primera o tercera generación, infectan con una dosis correspondiente a  $10^{12}$  pfu/kg de peso corporal (O'Neal y cols., 2000; Toietta y cols., 2005). La técnica utilizada actualmente en el laboratorio para alcanzar este nivel de producción de vectores viables implica el uso de aproximadamente 100 placas de células (HEK) 293 de 100 mm de diámetro solamente para inyectar tres animales de un peso aproximado de 200 gramos. Debe hacerse notar que ésta es la técnica preferida por investigadores con extensa trayectoria en la preparación de vectores adenovirales (Ng y Graham, 2002).

Como se indicara, la eficiencia de la producción de un vector adenoviral se relaciona directamente con el tamaño del DNA viral, esto implica que si el DNA viral es de 36 kb (tamaño del DNA viral de un vector silvestre) la producción es eficiente, si el vector adenoviral presenta un tamaño menor o mayor a los 36 kb, la encapsidación y por consiguiente la producción de ese vector es menos eficiente (Fallaux y cols., 1998; Ng y cols., 1999). Esto se observó claramente al propagar a gran escala los vectores adenovirales AdV-AS y el vector AdV-vacío en que al infectar, lisar y purificar los vectores desde un mismo número de placas con células (HEK) 293, la cantidad de cápsides vacías generadas eran considerablemente mayores en las células 293

infectadas con el vector AdV-vacío en comparación con las células infectadas con el vector que porta el gen *Aldh2*-antisentido (datos no mostrados).

### **8.3 EFECTO DEL VECTOR ADENOVIRAL ANTI-*Aldh2* SOBRE LA ACTIVIDAD ALDH2 PROVENIENTE DE CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATA**

Los estudios de Garver y colaboradores del año 2001, indican que la vida media de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial en células de hepatoma de rata es de 22 horas. Con estos antecedentes se probaron a diferentes tiempos dos dosis infectivas de los vectores adenovirales que portan el gen *Aldh2*-antisentido (AdV-AS), equivalentes a una cantidad relativa de adenovirus (PVC) de 5 y 15. Los datos mostrados en la Figura 7.3 indican que las diferencias en la reducción de la actividad de la ALDH2 al utilizar ambas dosis infectivas muestran una correlación entre el tiempo y la dosis estudiada.

### **8.4 EFECTO DE LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATA CON EL VECTOR ADENOVIRAL QUE PORTA EL GEN *Aldh2*-ANTISENTIDO**

En este estudio, se demostró que células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 presentan una producción de acetaldehído (Figura 7.9) en niveles significativos (10  $\mu$ M) cuando son incubadas con etanol 10 mM. Los niveles de acetaldehído generados por las células H4-II-E-C3 (Figura 7.10), aumentaron 8 veces (80-90  $\mu$ M) luego de transducir las células con el vector adenoviral que codifica la deshidrogenasa aldehídica antisentido a dos dosis infectivas equivalentes a una cantidad relativa de adenovirus de 5 y 15 (PVC = 5 y PVC = 15). Estos niveles similares de acumulación de acetaldehído a ambas PVCs fue inesperado, porque la actividad de la ALDH2 mostró diferencias cuando las células se expusieron a estas dosis infectivas (Figura 7.3A y



Figura 7.4). Una posible explicación a la acumulación de niveles similares de acetaldehído a pesar de una mayor reducción en la actividad de la ALDH2 a la dosis infectiva más alta, es que las células de hepatoma de rata presentan también otras deshidrogenasas con valores de  $K_m$  altos, como por ejemplo la ALDH microsomal (Huang y Lindahl, 1990). Una de las formas en que actuaría este ALDH microsomal es remover el acetaldehído a concentraciones mayores, y por lo tanto el acetaldehído no se acumularía más. A partir de estos estudios, queda claro que una inhibición de un 50-65% de la actividad de la ALDH2 conduce a un aumento marcado (8 veces) en los niveles de acetaldehído. Tales estudios concuerdan con lo reportado por Garver y cols. (2001) *in vivo* en que una inhibición de 40% de la actividad ALDH2 resultó en un aumento de 3 a 4 veces en los niveles de acetaldehído.

En los estudios en esta tesis, la determinación de la ALDH2 en las células de hepatoma de rata, se hizo a una baja concentración del aldehído (21  $\mu$ M) para asegurar la medición de la deshidrogenasa mitocondrial de  $K_m$  baja y no de otras deshidrogenasas. Cianamida un inhibidor no específico, dio como resultado un incremento aún mayor en los niveles de acetaldehído, debido probablemente a la inhibición de la ALDH microsomal de  $K_m$  alta (mM) (Pruñonosa y cols., 1991).

Debe notarse que en estos estudios, el mRNA sentido (Figura 7.6) mostró valores aumentados en las células infectadas, sugiriendo una protección de su degradación mediante ocupación con el mRNA antisentido, al mismo tiempo que una inhibición en la traducción de la enzima. Sin embargo, los niveles de mRNA sentido no cambiaron a una PVC mayor a pesar de una inhibición mayor de la actividad enzimática, sugiriendo que la correlación entre los niveles de mRNA y la síntesis proteica no es 1:1. Los estudios también muestran que a una PVC de 5, la célula alcanza su máxima

capacidad de sintetizar el RNA antisentido, indicando que una mayor dosis infectiva no lleva a una mayor inhibición.

## **MODELO ANIMAL EN RATAS DEPENDIENTES PARA EL ESTUDIO DE UNA NUEVA MODALIDAD TERAPÉUTICA CONTRA EL ALCOHOLISMO**

El modelo animal para nuestro estudio del alcoholismo debe cumplir con la característica de consumir cantidades intoxicantes de etanol (Le e Israel, 1994) en un período corto de tiempo, e idealmente en animales dependientes al alcohol. Éstos, al ser tratados con los vectores virales, deben evitar el consumo de alcohol después de haber experimentado el efecto de altos niveles de acetaldehído. A partir de estos antecedentes, se utilizó a la rata como modelo porque en este animal el acetaldehído generado de la oxidación del etanol es metabolizado por la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de alta afinidad, tal como en el hombre. Se ha demostrado que la rata presenta una delección en su promotor de la *Aldh1* citosólica por lo que esta enzima virtualmente no se expresa en los tejidos o en el hepatoma de esta especie (Chen y cols., 1996; Huang y Lindahl, 1990) asemejándose a una baja participación de la deshidrogenasa aldehídica citosólica en la metabolización del acetaldehído en humanos (Klyosov y cols., 1996).

En cinco laboratorios en el mundo se han desarrollado, por cruzamiento selectivo, líneas de ratas que presentan un fenotipo de alto consumo de alcohol (en libre acceso de etanol al 10% vol./vol.), igual o mayor a 5 g de etanol por kilogramo de peso corporal en 24 horas (Lumeng y cols., 1995; Le y cols., 2001). Entre estas líneas están las ratas UChB desarrolladas en la Facultad de Medicina Norte (Mardones y Segovia-Riquelme, 1983). La ventaja que presenta tal tipo de ratas es que no es necesario

entrenar al animal para consumir cantidades intoxicantes de una solución de etanol. Luego de ofrecer por varias semanas etanol (10%) y agua durante 24 horas al día, las ratas son sometidas a un síndrome de privación durante 1 a 3 días. Luego, por tan sólo una hora diaria se ofrece a los animales el re-acceso a la solución de etanol, lo que lleva a un alto consumo de alcohol en este tiempo (aprox. 1,2 g/kg; equivalente a 84 g/70 kg). A diferencia de las ratas comercialmente disponibles que deben entrenarse para consumir cantidades moderadas de etanol en soluciones conteniendo sacarosa o sacarina durante 20-30 días (Samson y cols., 1996; Sinclair y cols., 1992), ratas UChB consumen altos niveles de alcohol sin un endulzante. En los estudios presentes se demostró por primera vez que ratas UChB muestran altos consumos de etanol en la hora de re-acceso al alcohol (postsíndrome de privación), que son 6 veces mayores al promedio horario observado cuando el etanol está disponible durante 24 horas.

#### **8.5.1 Asociación del efecto disfórico del acetaldehído con la ingesta de una solución de etanol**

El mecanismo de la aversión al alcohol de un medicamento como el disulfiram depende del reconocimiento, por animales o humanos tratados con tal medicamento, que el etanol es el causante de la disforia al ser consumido, lo que reduce su posterior ingesta. Para producir el efecto terapéutico deseado (abstinencia o reducción del consumo) debe primeramente ingerirse alcohol y generarse un aumento en los niveles circulantes de acetaldehído, la causa primaria del efecto disfórico. Los alcohólicos que son tratados con disulfiram son informados de la disforia experimentada al ocurrir la reacción disulfiram-etanol y del malestar desencadenado. Es decir, la información misma precede (y posiblemente potencia) al efecto disfórico propiamente tal. Es poco probable que animales entrenados a consumir etanol por períodos prolongados, y

luego tratados con disulfiram o el vector AdV-AS, asocian rápidamente la disforia generada al continuar el consumo de etanol, un fluido que anteriormente han bebido sin experimentar efectos negativos. Una aversión inducida por la reacción etanol-disulfiram en un modelo animal se obtuvo por Garver y cols. (2000) quien utilizó ratas comerciales de la cepa Lewis previamente pretratadas con disulfiram y sin experiencia de consumo de alcohol. Estas ratas se privaron de agua durante 16 horas por lo que al re-hidratarse consumieron grandes volúmenes de agua que contenía etanol al 6% (primera bebida presentada en el día). El gran consumo de la solución de etanol 6%, generó niveles de acetaldehído plasmático elevados. Los animales pretratados con disulfiram sólo consumieron la solución conteniendo alcohol durante una hora. Animales controles siguieron consumiéndolo ávidamente hasta por 5 horas (Garver y cols., 2000).

#### **8.5.2 Establecimiento de una condición de acceso limitado de 1 hora**

Las ratas de la línea UChB presentan en promedio un consumo de 7 g de etanol por kilogramo de peso corporal por día luego de una exposición a la solución de alcohol durante 30 a 60 días. A tales animales se les administró AdV-AS y AdV-vacío (día 1) por vía intravenosa. En animales que continuaron en un régimen de libre acceso a dos botellas durante 24 h (una de agua y otra de una solución de etanol 10% vol./vol.) la administración del vector AdV-AS (Figura 7.11A) llevó a una disminución significativa del consumo de alcohol en los días 4 y 5, para luego volver a los niveles normales de consumo. Ello puede deberse al tiempo necesario para la expresión del gen antisentido y a la vida media de la ALDH2. Estos datos sugieren que durante los tres primeros días, las ratas aún no relacionan (o no desarrollan) un malestar físico con el consumo de alcohol, relación que se manifiesta a los días 4 y 5. Sin embargo, los niveles de

consumo aumentan nuevamente alcanzando los mismos valores obtenidos en los animales controles tratados con el vector AdV-vacío. Estudios recientes (Quintanilla y cols., 2005) han indicado que en ratas virtualmente abstemias (UChA), que poseen una ALDH2 lenta, los niveles de acetaldehído se elevan principalmente en los primeros 15 minutos de la ingesta alcohólica y que tal efecto es que resulta en gran parte en una marcada aversión al etanol. Por consiguiente, es posible esperar que una asociación entre la disforia causada por el alcohol en animales a los que se ha administrado AdV-AS sea aprendida con mayor éxito en animales que aparean el efecto del alcohol sólo en momentos en que se genera la mayor disforia y no en 24 horas de consumo. Este razonamiento llevó al uso del paradigma de “acceso limitado”.

El modelo de “acceso limitado” es preferido en el campo del alcoholismo (Murphy y cols., 1986; Sinclair y cols., 1992) por presentar características similares al consumo y la intoxicación en humanos dependientes al alcohol. Las ratas UChB en condiciones de libre acceso a una solución de etanol consumen un promedio de 0,3 g etanol por hora, evitando intoxicaciones masivas. Para obtener un consumo elevado de una solución de etanol en un tiempo corto, que el animal pudiese aparear conductualmente con una reacción putativamente disfórica de etanol-AdV-AS, los animales así tratados se sometieron a un período de privación de etanol durante 3 días y luego se les restringió el acceso a la solución de etanol a sólo 1 h diaria (día 1 en la condición de “acceso limitado”, o día 11 experimental). Al readministrar la solución de etanol (Figura 7.11B) el consumo de etanol en ambos grupos fue de 1-1,2 g de etanol a diferencia de los 0,3 g de etanol en una condición de acceso libre. Sólo a partir del segundo día de acceso limitado (día 12) el consumo de la solución de etanol disminuyó marcadamente (82%) en animales tratados con AdV-AS, que es interpretado como un apareamiento

entre el efecto disfórico de la reacción AdV-AS y el consumo de etanol después de la primera experiencia; un comportamiento similar a los estudios durante una hora descritos por Garver y cols. (2000).

Al restringir el acceso a la solución de etanol a 1 hora diaria, la generación de acetaldehído es mayor, dado a que existe un bajo nivel de NADH hepático (Wahid y cols.,1981), metabolito generado en la oxidación del etanol que inhibe la producción de acetaldehído por la deshidrogenasa alcohólica (Crabb y cols., 1983). Adicionalmente, una reducción terapéutica de la actividad de la ALDH2 por el AdV-AS favorece la acumulación de acetaldehído en la circulación, generando efectos disfóricos y aversivos, efectos que no se obtienen si el animal consume solamente 0,3 gramos de etanol por hora en forma continuada.

## **8.6 DURACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CONSUMO DE ALCOHOL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DEL VECTOR ANTI-*Aldh2***

En los estudios iniciales, se demostró que la relación malestar-rechazo al consumo de alcohol se podía establecer en una línea de ratas seleccionadas por su consumo de alcohol y que este rechazo se veía magnificado al existir un período de abstinencia previo a un acceso limitado a la solución de etanol. Durante 34 días de acceso limitado (Figura 7.12A), la administración única del vector AdV-AS ( $1 \times 10^{12}$  pv/kg) disminuyó en 50% el consumo de alcohol de ratas UChB, en comparación con el grupo control AdV-vacío, que no alteró el consumo de alcohol en el tiempo. Pudo además observarse que en los primeros 12 días de acceso limitado los animales muestran un consumo cíclico en el cual cada 6 días vuelven a un alto consumo. Después del tal período los animales tratados con AdV-AS parecen haber “aprendido” que el beber

grandes *cantidades* de alcohol genera un efecto disfórico. Transcurrido los 34 días de “acceso limitado” al etanol, se determinó que la reducción de un 50% del consumo de etanol se acompañaba con una inhibición de la actividad de ALDH2 de 90% (Figura 7.13B). Debe notarse sin embargo que los animales comenzaron a sostener un consumo reducido y constante de etanol a partir de una inhibición de 30% de la ALDH2 (*vide infra*).

En un estudio de 10 días de “acceso limitado” al etanol en el cual los animales recibieron una dosis del vector AdV-AS ( $1 \times 10^{12}$  pv/kg) en el día -3, los niveles de acetaldehído sanguíneo (Figura 7.15), luego de la administración de etanol, aumentaron en 80% versus los niveles en animales control, la actividad ALDH2 disminuyó en 37,5% (Figura 7.16) y el consumo voluntario de alcohol se redujo en 37%. Tales valores son consistentes con un 90% de reducción en la actividad ALDH2 con la misma dosis viral al día 34 y una disminución en el consumo de etanol en el período total de 50%.

Estos estudios son también consistentes con los descritos por Garver y cols. (2001) indicando que una marcada inhibición (62%) en el consumo de alcohol en animales “*naive*” se obtiene con un 39% de inhibición de la ALDH2 hepática. Debe notarse que los animales usados en el estudio de Garver y cols. no eran dependientes al alcohol. Ratas UChB del genotipo *Aldh2<sup>3</sup>/Aldh2<sup>3</sup>* que presentan una actividad ALDH2 hepática 30% menor a la de ratas UChB *Aldh2<sup>1</sup>/Aldh2<sup>1</sup>* muestran también una reducción del consumo de alcohol de 33% (Quintanilla y cols., 2006). Las ratas UChB usadas en los estudios en esta tesis fueron siempre *Aldh2<sup>1</sup>/Aldh2<sup>1</sup>*. En general, estos estudios demuestran que no es necesario inhibir en un 100% la actividad de la enzima ALDH2

para generar el efecto malestar-rechazo que lleva a una aversión al consumo de alcohol.

## **8.7 TERAPIA GÉNICA MEDIADA POR EL VECTOR ADENOVIRAL QUE PORTA EL GEN *Aldh2*-ANTISENTIDO**

La terapia génica utilizada en este estudio, está basada en la entrega del cDNA de la ALDH2 en orientación invertida mediante un vector adenoviral de primera generación (AdV-AS), que genera una molécula de antisentido de más de 1500 pares de bases (Figura 7.5). Mediante la técnica de RT-PCR (Figura 7.6 y 7.7) se demostró que el mecanismo de acción más probable del AdV-AS es la formación de un dúplex RNA-sentido/RNA-antisentido entre la ALDH2 endógena proveniente de las células H4 y la expresada por el vector adenoviral (Figura 7.8).

En mamíferos (Sen, 2001), se ha descrito que la presencia de un RNA de doble cadena de tamaño elevado, como el formado por la unión del RNA sentido con el RNA antisentido, induce al sistema de defensa del interferón contra infecciones virales (que contienen o generan RNAs de doble cadena). Si este dúplex RNA-RNA es de más de 30 pares de bases (pb) (Hunter y cols., 1975) gatillaría la respuesta del sistema de interferón que involucra la activación de dos enzimas: i) la proteína kinasa activada por el dúplex RNA-RNA (PKR) y ii) 2'-5' oligonucleótido sintetasa/RNasa L. La acción de PKR produce una inhibición general de la síntesis proteica que finalmente bloquea la replicación viral (Langland y cols., 2006) mientras que la molécula RNasa L degrada los mRNA de una manera inespecífica (Silverman y cols., 1999), conduciendo finalmente a la muerte de la célula por apoptosis (Hunter y cols., 1975; Tran y cols., 2004). Debe indicarse, sin embargo, que los híbridos RNA-RNA no son exclusivamente



productos de los virus, encontrándose más de 20% de transcritos humanos formando un dúplex con su homólogo antisentido (Chen y cols., 2004; Yelin y cols., 2003), por lo que las células de mamífero deben poseer un mecanismo para discriminar entre los híbridos de RNA sentido-RNA antisentido endógenos de los exógenos (*vide infra*). Por otra parte, los adenovirus de primera generación, como el usado en estos estudios eluden la activación de la PKR, aunque su efecto sobre la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa /RNAsaL no ha sido reportado.

#### **8.7.1 Proteína kinasa R dependiente de RNA de doble cadena**

Se ha reportado que los vectores adenovirales silvestres (Langland y cols., 2006) presentan su propio mecanismo de defensa que evade el sistema antiviral del interferón. Este mecanismo de defensa antiviral radica en la codificación de los RNAs virales que se transcriben luego de ocurrir la infección viral (Kitajewski y cols., 1986; Evans y Hearing, 2002) por la RNA polimerasa III del hospedero (Langland y cols., 2006). Al ocurrir la infección con un vector silvestre, la proteína PKR se activa debido a la presencia de RNAs de doble cadena que son productos naturales del proceso de transcripción simétrica del genoma adenoviral (Mathews y Shenk, 1991). Al activarse PKR, éste fosforila -y con ello inactiva- al factor de iniciación de la transcripción eucariótico 2-alfa (eIF-2 $\alpha$ ), inhibiendo la síntesis proteica de manera general. El mecanismo por el cual se mantiene una transcripción eficiente de las células infectadas, se debe al secuestro de la proteína PKR por la producción de grandes cantidades de RNA adenoviral por lo que la activación de PKR no es una limitante para futuros experimentos *in vivo*. Es importante destacar que los vectores adenovirales de última generación denominados vectores dependientes de ayudantes o "gutless" no presentan esta ventaja defensiva como los vectores de primera generación, de modo

que en etapas siguientes a los estudios presentados en esta tesis el RNA antisentido generado debe sólo tener múltiples segmentos de homología que son menores de 30 bases.

### **8.7.2 Proteína inducida por interferon: 2'-5'A oligonucleótido sintetasa**

La respuesta 2'-5'A inducido por interferón conduce a la degradación de RNA de manera inespecífica (Silverman y cols., 1999). Este sistema depende de la presencia de dos enzimas: la 2'-5'A oligonucleótido sintetasa y la RNAsa L. La 2'-5'A oligonucleótido sintetasa, cataliza la síntesis de oligoadenilatos (2'-5'A) de distintos largos que activa la endoribonucleasa RNAsa L (Sen y Lengyel, 1992; Silverman y cols., 1999; Sen, 2001). En diversos estudios en los que se generan híbridos de RNA-RNA, la expresión del gen 2'-5'A oligonucleótido sintetasa aumenta de 50 a 500 veces al producirse la activación de esta vía (Bridge y cols.,2003; Sledz y cols., 2003). En este trabajo, se evaluó la expresión del gen 2'-5'A *oligonucleótido sintetasa* en los animales UChB (Figura 7.14) tratados durante 38 días con el vector adenoviral de primera generación que porta el gen anti-*Aldh2*. En nuestros estudios, no aumentó la expresión de este gen, indicando que no existen posibles efectos tóxicos producidos por la activación de esta vía o, alternativamente, que los virus de primera generación son también capaces de evitar este mecanismo. Según los estudios de Marques y colaboradores (2006), la presencia de un extremo cohesivo (“*overhang*”) con una protuberancia en el extremo 3' en un híbrido RNA-RNA permite discriminar entre un producto endógeno de uno exógeno, por lo que la ausencia de esta estructura es un factor determinante en activar la respuesta al interferón. Este antecedente podría explicar la ausencia de la respuesta 2'-5'A oligonucleótido sintetasa con el vector viral AdV-AS, puesto que el RNA antisentido generado tendría 2337 nucleótidos (nt) de las

cuales solamente 1862 nt corresponden al mRNA de la ALDH2 precursora (nt 30 al 1891 del archivo GenBank X14977). De los nucleótidos restantes, 71 nt se encuentran entre el promotor de citomegalovirus (CMV) y el cDNA de la ALDH2 invertida y 404 nucleótidos entre el cDNA del inserto hasta la señal de poliadenilación del SV40. Es decir en la unión RNA-RNA generada por la expresión del gen antisentido para ALDH2, en estos estudios existen extremos protuberantes ambos en 3' como 5', lo que según los estudios de Marques y cols. (2006) este híbrido sería reconocido como una unidad normal en la célula.

#### **8.8 TRATAMIENTO CONTRA EL ALCOHOLISMO A LARGO PLAZO MEDIADO POR UN VECTOR ADENOVIRAL QUE PORTA EL GEN *Aldh2*-ANTISENTIDO**

Los datos presentados en esta tesis han mostrado una reducción en el consumo de alcohol en un 50% en un modelo animal en comparación con un grupo control. Tal efecto se obtuvo con una sola dosis del vector AdV-AS, efecto que perduró 1 mes. El efecto generado por este vector AdV-AS es similar al fármaco disulfiram, que también eleva el acetaldehído sanguíneo pero que reduce el consumo del alcohol sólo en 34% en comparación al grupo control (Fuller y cols., 1986). Tal valor es en parte debido a una baja adherencia con la ingesta del disulfiram, un medicamento con marcados efectos tóxicos que puede producir neuropatías y que genera hipotensión postural. Siendo un profármaco, también requiere dosis elevadas para generar en forma consistente una aversión al consumo de etanol (Balakirev y Zimmer, 2001; Vaccari y cols., 1998). Se ha descrito (Mizoi y cols., 1983) que la aversión luego de un consumo moderado en la población asiática que porta el alelo *ALDH2\*2*, ocurre a tiempos cortos (30 minutos). Estos datos indican que solamente es necesario un aumento inicial de los

niveles de acetaldehído circulante para generar el rechazo al consumo de alcohol y no un aumento sostenido en los niveles de acetaldehído circulante.

En algunos estudios, se ha relacionado un aumento sostenido de acetaldehído con el desarrollo de cáncer en el tracto respiratorio (Yokoyama y cols., 1999), posiblemente potenciando al efecto del cigarrillo. El sólo hecho de presentar una ALDH2 inactiva por una mutación o mediante una terapia, los individuos consumen menos alcohol por lo que el aumento en los niveles de acetaldehído también están reducidos.

La eficacia de los tratamientos farmacológicos descritos para abordar el problema del alcoholismo a nivel mundial, son bajas. Esta baja eficiencia se debe a que la mayoría de los pacientes en un período de 1 año, vuelven a un alto consumo de bebidas alcohólicas. Los tres medicamentos descritos como los más eficaces son: el disulfiram, el acamprosato y la naltrexona. Sin embargo el paciente debe auto-administrarse el medicamento una o varias veces al día, lo que favorece una discontinuación del tratamiento. Con estos antecedentes, la idea de un tratamiento eficaz de larga duración es un objetivo primordial. Recientemente en Abril del 2006, la FDA de los EE.UU. aprobó la formulación inyectable de liberación prolongada de naltrexona (Vivitron®). La formulación Vivitron® de 1 mes de durabilidad, redujo el consumo de alcohol en 25% en comparación con un grupo control (Garbutt y cols., 2005). La terapia propuesta con el vector adenoviral, al igual que el Vivitron®, es inyectable por lo que la falta de compromiso al tratamiento es inexistente y que favorecería el aumento de los días de sobriedad del paciente alcohólico.

Un vector adenoviral de tercera generación, con un mecanismo similar al vector AdV-AS de primera generación utilizados en estos estudios, podría expresarse en hepatocitos por períodos de hasta 2 años luego de una sola administración del vector (Morral y cols., 1999). Al aumentar la duración del efecto del antisentido dirigido en contra de la ALDH2 mitocondrial, favorecería aún más el aumento de los días de sobriedad del paciente alcohólico. La utilización de un vector de estas características en combinación con un promotor hepático específico, limitaría la expresión de la anti-*Aldh2* al hígado disminuyendo los riesgos y toxicidad en otros tejidos. Un meta-análisis reciente (Zintzaras y cols., 2006) indica que una baja actividad de la ALDH2 hepática no lleva a la generación de neoplasias en este órgano, aun en individuos que siguen consumiendo alcohol.

A partir de los estudios presentados en esta tesis, el uso de una terapia génica con vectores adenovirales seguros que portan genes que codifican RNAs de antisentido anti-*Aldh2*, precedidos de promotores hepáticos que aumentan su especificidad y son además de larga duración (uno a dos años), tendría un efecto significativo en un problema nacional como el alcoholismo.

## 9. CONCLUSIONES

### Estudios “in vitro”

- La transducción a células de hepatoma de rata con un vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido contra el mRNA de *ALDH2*<sup>1</sup>:
  - I) redujo la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (*ALDH2*<sup>1</sup>),
  - II) aumentó los niveles de acetaldehído en células de hepatoma de rata incubadas con alcohol y,
  - III) es acompañado por niveles constantes de mRNA de la *ALDH2*<sup>1</sup>, lo cual concuerda con un mecanismo de antisentido.

### Estudios “in vivo”

- La administración de una sola dosis de un vector adenoviral de primera generación que expresa el gen antisentido de la *ALDH2*<sup>1</sup> a ratas de la línea UChB:
  - I) redujo durante un mes el consumo voluntario de etanol de los animales y la actividad de la *ALDH2*<sup>1</sup> hepática y,
  - II) resulta en un aumento en los niveles de acetaldehído plasmático luego de la administración de alcohol.
- Los animales que recibieron el vector que expresa el gen *Aldh2*-antisentido, no desarrollaron una tolerancia frente a la aversión inducida por la presencia del gen antisentido.
- Los efectos inhibitorios sobre el consumo voluntario de etanol, se observaron a la semana de haber administrado el vector adenoviral.

- Una reducción superior a un 40% de la actividad de la ALDH2 produce una disminución significativa en el consumo de etanol indicando que no es necesario inhibir completamente a la enzima para obtener éste efecto.

## 10. REFERENCIAS

Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Imamichi H. Comparative study on ethanol elimination and blood acetaldehyde between alcoholics and control subjects. *Alcohol Clin Exp Res* 13: 601-604 (1989)

Al-khatib K, Williams BRG, Silverman RH, Halford W, Carr DJJ. Distinctive roles for 2', 5'-oligoadenylate synthetases and double-stranded RNA-dependent protein kinase R in the in vivo antiviral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN- $\beta$ . *J Immunol* 172: 5638-5647 (2004)

American Psychiatric Association. *DSM-IV, Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales*. Valdés A, Tr M (editores). Masson S. A., Barcelona, España (2001)

Balakirev MY, Zimmer G. Mitochondrial injury by disulfiram: two different mechanisms of the mitochondrial permeability transition. *Chem Biol Interact* 138: 299-311 (2001)

Bayever E, Iversen PL, Bishop MR, Sharp JG, Tewary HK, Arneson MA, Pirruccello SJ, Ruddon RW, Kessinger A, Zon G. Systemic administration of a phosphorothioate oligonucleotide with a sequence complementary to p53 for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: initial results of a phase I trial. *Antisense Res Dev* 3: 383-390 (1993)

Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gomex-Foix AM, Alam T, Gerard RD, Newgard CB. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Method Cell Biol* 43: 161-189 (1994)

Brecher AS, Hellman K, Basista MH. A perspective on acetaldehyde concentrations and toxicity in man and animals. *Alcohol* 14: 493-496 (1997)

Brenner M. Reports of adenovector "death" are greatly exaggerated. *Mol Ther* 1: 205 (2000)

Brewer C, Meyers RJ, Johnsen J. Does disulfiram help to prevent relapse in alcohol abuse? *Cns Drugs* 14: 329-34 (2000)

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34: 263-264 (2003)

Cao QN, Tu GC, Weiner H. Presence of cytosolic aldehyde dehydrogenase isozymes in adult and fetal rat liver. *Biochem Pharmacol* 38: 77-83 (1989)



Chambers GK, Marshall SJ, Robinson GM, Maguire S, Newton-Howes J, Chong NL. The genetics of alcoholism in Polynesians: alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes in young men.

*Alcohol Clin Exp Res* 26: 949-955 (2002)

Chang C, Yoshida A. Cloning and characterization of the gene encoding mouse mitochondrial aldehyde dehydrogenase.

*Gene* 148: 331-336 (1994)

Chao YC, Liou SR, Chung YY, Tang HS, Hsu CT, Li TK, Yin SJ. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients.

*Hepatology* 19: 360-366 (1994)

Chen CC, Lu RB, Chen YC, Wang MF, Chang YC, Li TK, Yin SJ. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism in protection against alcoholism.

*Am J Hum Genet* 65: 795-807 (1999)

Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes.

*Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1645-1650 (1997)

Chen J, Yanagawa Y, Yoshida A. Molecular mechanism of null expression of aldehyde dehydrogenase-1 in rat liver.

*Biochem Genet* 34: 109-116 (1996)

Chen J, Sun M, Kent WJ, Huang X, Xie H, Wang W, Zhou G, Zhang Shi R, Rowley JD. Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs.

*Nucleic Acids Res* 32: 4812-4820 (2004)

Clarke PA, Mathews MB. Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA.

*RNA* 1: 7-20 (1995)

CONACE. Resultados del cuarto estudio nacional de consumo de drogas en población urbana de Chile, 2000. Consumo precoz de alcohol y su relación con consumo de marihuana y cocaína.

*Área de estudios del CONACE*, Gobierno de Chile (2001)

CONACE. Informe sobre uso, abuso y dependencia al alcohol. Quinto estudio nacional de drogas en población general de Chile, 2002.

*Área evaluación y estudios*, Gobierno de Chile (2003)

Crabb DW, Bosron WF, Li TK. Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: Application to predicting alcohol elimination rates *in vivo*.

*Arch Biochem Biophys* 224: 299-309 (1983)

Crabb DW, Edenberg HJ, Bosron WF, Li TK. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2<sup>2</sup> allele is dominant. *J Clin Invest* 83: 314-316 (1989)

Croop RS, Faulkner EB, Labriola DF. The safety profile of naltrexone in the treatment of alcoholism. Results from a multicenter usage study. The naltrexone usage study group. *Arch Gen Psychiatry* 54: 1130-1135 (1997)

Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang WW, Sarvetnick N. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1401-1405 (1995)

Duester G, Farres J, Felder MR, Holmes RS, Hoog JO, Pares X, Plapp BV, Yin SJ, Jornvall H. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem Pharmacol* 58: 389-395 (1999)

Engelhardt JF, Ye XH, Doranz B, Wilson JM. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse-liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6196-6200 (1994)

Enomoto N, Takase S, Yasunara M, Takada A. Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 15: 141-144 (1991)

Eriksson CJ, Sippel HW, Forsander OA. The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography. *Anal Biochem* 80: 116-124 (1977)

Evans JD, Hearing P. Adenovirus replication. En: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Curiel DT, Douglas JT (editors). Academic Press, New York, U.S.A. pp. 39-70 (2002)

Fallaux FJ, Bout A, Van Der Velde I, Van Den Wollenberg DJM, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, Van Ormondt H, Van Der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9: 1909-1917 (1998)

Farres J, Guan KL, Weiner H. Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences. *Eur J Biochem* 180: 67-74 (1989)

Farres J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H. Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: A model to study human (oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 269: 13854-13860 (1994)

Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity.  
*J Biol Chem* 247: 267-272 (1972)

Figueroa L, Minoletti A, Monreal M, Pemjeam A, Dominguez R, Marconi J. Impacto socio económico del abuso del alcohol en Chile.  
*Ministerio de Salud y Universidad de Chile* (1998)

Fuller RK, Branchey L, Brightwell DR, Derman RM, Emrick CD, Iber FL, James KE, Lacoursiere RB, Lee KK, Lowenstam I, Maany I, Neiderhiser D, Nocks JJ, Shaw S. Disulfiram treatment of alcoholism: A veterans administration cooperative study.  
*JAMA* 256: 1449-1455 (1986)

Fuller RK, Gordis E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today?  
*Addiction* 99: 21-24 (2004)

Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duester G, Olson L. Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain.  
*Eur J Biochem* 270: 1316-1326 (2003)

Gao GP, Engdahl RK, Wilson JM. A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus.  
*Hum Gen Ther* 11: 213-219 (2000)

Garbutt JC, West SL, Carey TS, Lohr KN, Crews FT. Pharmacological treatment of alcohol dependence: A review of the evidence.  
*JAMA* 281: 1318-1325 (1999)

Garbutt JC, Kranzler HR, O'Malley SS, Gastfriend DR, Pettinati HM, Silverman BL, Loewy JW, Ehrich EW. Efficacy and tolerability of long-acting injectable for alcohol dependence - A randomized controlled trial.  
*JAMA* 293: 1617-1625 (2005)

Garver E, Ross AD, Tu GC, Cao QN, Zhou F, Israel Y. Paradigm to test a drug-induced aversion to ethanol.  
*Alcohol Alcohol* 35: 435-438 (2000)

Garver E, Tu GC, Cao QN, Aini M, Zhou F, Israel Y. Eliciting the low-activity aldehyde dehydrogenase Asian phenotype by an antisense mechanism results in an aversion to ethanol.  
*J Exp Med* 194:571-580 (2001)

Goate AM, Edenberg HJ. The genetics of alcoholism.  
*Curr Opin Genet Dev* 8: 282-286 (1998)

Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations.  
*Hum Genet* 88: 344-346 (1992)

Goedde HW, Agarwal DP, Harada S. The role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes in alcohol metabolism, alcohol sensitivity, and alcoholism. *Isozymes: Curr Top Biol Med Res* 8: 175-193 (1983)

Guan KL, Pak YK, Tu GC, Cao QN, Weiner H. Purification and characterization of beef and pig liver aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 713-719 (1988)

Harada S, Agarwal DP, Goedde HW, Tagaki S, Ishikawa B. Possible protective role against alcoholism for aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency in Japan. *Lancet* 2: 827 (1982)

Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML. construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 71: 1842-1849 (1997)

He TC, Zhou S, Da Costa LT Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514 (1998)

Heath AC, Meyer J, Jardine R, Martin NG. The inheritance of alcohol consumption patterns in a general population twin sample: II. Determinants of consumption frequency and quantity consumed. *J Stud Alcohol* 52: 425-433 (1991)

Heath AC, Whitfield JB, Madden PAF, Bucholz KK, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DB, Martin NG. Towards a molecular epidemiology of alcohol dependence: analyzing the interplay of genetic and environmental risk factors. *Brit J Psych* 178: S33-S40 (2001)

Higuchi S. Polymorphisms of ethanol metabolizing enzyme genes and alcoholism. *Alcohol Alcohol* 2: 29-34 (1994)

Huang M, Lindahl R. Aldehyde dehydrogenase heterogeneity in rat hepatic cells. *Arch Biochem Biophys* 277: 296-300 (1990)

Hunter T, Hunt T, Jackson RJ. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 250: 409-417 (1975)

Ilan Y, Droguett G, Chowdhury NR, Li Y, Sengupta K, Thummala NR, Davidson A, Chowdhury JR, Horwitz MS. Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2587-2592 (1997)

Jeng J-J, Weiner H. Purification and characterization of catalytically active precursor of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 289: 214-222 (1991)

Johnson BA, Ait-Daoud N. Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings.  
*Psychopharm* 149: 327-344 (2000)

Johnson BA, Ait-Daoud N, Aubin HJ, Brink W, Guzzetta R, Loewy J, Silverman B, Ehrich E. A pilot evaluation of the safety and tolerability of repeat dose administration of long-acting injectable naltrexone (Vivitrex®) in patients with alcohol dependence.  
*Alcohol Clin Exp Res* 28: 1356-1361 (2004)

Karahanian E, Ocaranza P, Israel Y. Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity in hepatoma cells is reduced by an adenoviral vector coding for an ALDH2 antisense mRNA.  
*Alcohol Clin Exp Res* 29: 1384-1389 (2005)

Kenna GA, McGeary JE, Swift RM. Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 1.  
*Am J Health-Syst Pharm* 61: 2272-2279 (2004)

Kim I, Józkwicz A, Piedra PA, Oka K, Chan L. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13282-13287 (2001)

Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, Munemitsu SM, Samuel CE, Thimmappaya B, Shenk T. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of the interferon-induced eIF-2 $\alpha$  kinase.  
*Cell* 45: 195-200 (1986)

Klysov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM. Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism.  
*Biochem* 35: 4445-4456 (1996)

Krasnykh V, Dmitriev I, Navarro JG, Belousova N, Kashentseva E, Xiang J, Douglas JT, Curiel DT. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity.  
*Cancer Res* 60: 6784-6787 (2000)

Krystal JH, Cramer JA, Krol WF, Kirk GF, Rosenheck RA: Veterans affairs naltrexone cooperative study 425 group. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence.  
*N Engl J Med* 345: 1734-1739 (2001)

Kuzmin AI, Finegold MJ, Eisensmith RC. Macrophage depletion increases the safety, efficacy and persistence of adenovirus-mediated gene transfer in vivo.  
*Gene Ther* 4: 309-316 (1997)

Lands WE. A review of alcohol clearance in humans.  
*Alcohol* 15: 147-160 (1998)

- Langland JO, Cameron JM, Heck MC, Jancovich JK, Jacobs BL. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses.  
*Virus Res* 119: 100-110 (2006)
- Le AD, Israel Y. A simple technique for quantifying intoxication-induced by low doses of ethanol.  
*Pharmacol Biochem Behav* 48: 229-234 (1994)
- Le AD, Israel Y, Juzytsch W, Quan B, Harding S. Genetic selection for high and low alcohol consumption in a limited-access paradigm.  
*Alcohol Clin Exp Res* 25: 1613-1620 (2001)
- Li TK. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking.  
*J Stud Alcohol* 61: 5-12 (2000)
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain.  
*Science* 259: 988-990 (1993)
- Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system: the first 30 years (1968-1998) – a review.  
*Alcohol Clin Exp Res* 23: 991-1007 (1999)
- Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, Kay MA. The role of kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors.  
*J Virol* 71: 8798-8807 (1997)
- Litten RZ, Allen J, Fertig J. Pharmacotherapies for alcohol problems: A review of research with focus on developments since 1991.  
*Alcohol Clin Exp Res* 20: 859-876 (1996)
- Lucas D, Menez JF, Berthou F, Pennec Y, Floch HH. Determination of free acetaldehyde in blood as the dinitrophenylhydrazone derivative by high-performance liquid chromatography.  
*J Chromatogr* 382: 57-66 (1986)
- Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ, Li TK. Genetic influences on alcohol preference in animals. En: *The Genetics of Alcoholism*. Begleiter H, Kissin B (editores) Oxford University Press New York pp 165-201 (1995)
- Luo H, Israel Y, Tu G, Eriksson CPJ, Zhang Y. Genetic polymorphism of aldehyde dehydrogenase in Chinese: Sex, age, culture and genotypes of ALDH2.  
*Biochem Genet* 43: 223-227 (2005)

Madan A, Parkinson A, Faiman MD. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram.

*Drug Metab Dispos* 23: 1153-1162 (1995)

Maione D, Rocca CD, Giannetti P, D'Arrigo R, Liberatoscioli L, Franlin LL, Sandig V, Ciliberto G, La Monica N, Savino R. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus.

*Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5986-5991 (2001)

Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains.

*Neurobehav Toxicol Teratol* 5: 171-178 (1983)

Marques JT, Devosse T, Wang D, Zamanian-Daryoush M, Serbinowski P, Hartmann R, Fujita T, Behlke MA, Williams BRG. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells.

*Nat Biotechnol* 24: 559-565 (2006)

Mathews MB, Shenk T. Adenovirus virus-associated RNA and translation control.

*J Virol* 65: 5657-5662 (1991)

Matsumoto H, Fukui Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology.

*Addict Biol* 7: 5-14 (2002)

Matsuo Y, Yokoyama R, Yokoyama S. The genes for human alcohol dehydrogenases beta 1 and beta 2 differ by only one nucleotide.

*Eur J Biochem* 183: 317-320 (1989)

Mays DC, Nelson AN, Lam-Holt J, Fauq AH, Lipsky JJ. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram.

*Alcohol Clin Exp Res* 20: 595-600 (1996)

Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy.

*J Virol* 70: 7498-7509 (1996)

Mizoi Y, Tatsuno Y, Adachi J, Kogame M, Fukunaga T, Fujiwara S, Hishida S, Ijiri I. Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese.

*Pharmacol Biochem Behav* 18: 127-133 (1983)

Moncada C, Fuentes N, Lladser A, Encina G, Sapag A, Karahanian E, Israel Y. Use of an "acetaldehyde clamp" in the determination of low- $K_M$  aldehyde dehydrogenase activity in H4-II-E-C3 rat hepatoma cells.

*Alcohol* 31: 19-24 (2003)

Morral N, O'Neal W, Rice K, Leland M, Kaplan J, Piedra PA, Zhou H, Parks RJ, Velji R, Aguilar-Cordova E, Wadsworth S, Graham FL, Kochanek S, Carey KD, Beaudet AL. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12816-12821 (1999)

Morsy MA, Caskey CT. Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol Med Today* 5: 18-24 (1999)

Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7866-7871 (1998)

Murphy JM, Gatto GJ, Waller MB, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Effects of scheduled access on ethanol intake by the alcohol-preferring (P) line of rats. *Alcohol* 3: 331-336 (1986)

Nagata N, Hiyoshi M, Shiozawa H, Shiraishi K, Watanabe N, Tsuda M, Matsuzaki S. Assessment of a difference in ALDH2 heterozygotes and alcoholic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 11S-14S (2002)

Ng P, Parks RJ, Cummings DT, Eveleigh CM, Sankar U, Graham FL. A high-efficiency Cre/loxP-based system for construction of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 10: 2667-2672 (1999)

Ng P, Graham FL. Adenoviral vector construction I: mammalian systems. En: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Curiel DT, Douglas JT (editors). Academic Press, New York, U.S.A. pp. 71-104 (2002)

O'Neal WK, Zhou H, Morral N, Langston C, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Beaudet AL. Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector. *Mol Med* 6: 179-195 (2000)

Paille FM, Guelfi JD, Perkins AC, Royer RJ, Steru L, Parot P. Double-blind randomized multicentre trial of acamprosate in maintaining abstinence from alcohol. *Alcohol Alcohol* 30: 239-247 (1995)

Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93: 13565-13570 (1996)

Pettinati HM, Rabinowitz AR. Recent advances in the treatment of alcoholism. *Clin Neuro Res* 5: 151-159 (2005)



Prescott CA, Kendler KS. Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins.  
*Am J Psychiatry* 156: 34-40 (1999)

Pruñonosa J, Sagristá ML, Bozal J. Inactivation mechanism of low Km rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by cyanamide in vitro.  
*Drug Metabol Dispos* 19: 787-792 (1991)

Quintanilla ME, Tampier L, Sapag A, Israel Y. Polymorphisms in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (Aldh2) determine peak blood acetaldehyde levels and voluntary ethanol consumption in rats.  
*Pharmacogen Genom* 15: 427-431 (2005)

Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, Tampier L. The UChA and UChB: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake.  
*Addict Biol* In press (2006)

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors.  
*J Gen Virol* 81: 2573-2604 (2000)

Samson HH, Files F, Brice G. Patterns of ethanol consumption in a continuous access situation: the effect of adding a sweetener to the ethanol solution.  
*Alcohol Clin Exp Res* 20: 101-109 (1996)

Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R, Caskey RT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1002-1007 (2000)

Schiedner G, Bloch W, Hertel S, Johnston M, Molojavyi A, Dries V, Varga G, Van Rooijen N, Kochanek S. Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors.  
*Mol Ther* 7: 35-43 (2003)

Schuckit MA, Smith TL, Kalmijn J, Tsuang J, Hesselbrock V, Bucholz K. Response to alcohol in daughters of alcoholics: a pilot study and a comparison with sons of alcoholics.  
*Alcohol Alcohol* 35: 242-248 (2000)

Schuckit MA. Genetics of the risk for alcoholism.  
*Am J Addict* 9: 103-112 (2000)

Sen GC. Viruses and interferons.  
*Annu Rev Microbiol* 55: 255-281 (2001)

Sen GC, Lengyel P. The interferon system: A bird's eye view of its biochemistry.  
*J Biol Chem* 267: 5017-5020 (1992)

Sheikh S, Ni L, Hurley TD, Weiner H. The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem* 272: 18817-18822 (1997)

Silverman RH, Dong B, Maitra RK, Player MR, Torrence PF. Selective RNA cleavage by isolated Rnase L activated 2-5A antisense chimeric oligonucleotides.  
*Method Enzymol* 313: 522-533 (1999)

Sinclair JD, Kampov-Polevoy A, Stewart R, Li TK. Taste preferences in rat lines selected for low and high alcohol consumption.  
*Alcohol* 9: 155-160 (1992)

Sledz CA, Holko M, De Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs.  
*Nat Cell Biol* 5: 834-839 (2003)

Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons.  
*Annu Rev Biochem* 67: 227-264 (1998)

Stephenson J. Studies illuminate cause of fatal reaction in gene-therapy trial.  
*JAMA* 285: 2570 (2001)

Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues.  
*J Invest Med* 44: 42-46 (1996)

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics II*. John Wiley & Sons Inc., BIOS Scientific Publishers Ltd, pp. 515-543 (1999)

Svanas GW, Weiner H. Aldehyde dehydrogenase activity as the rate-limiting factor for acetaldehyde metabolism in rat liver.  
*Arch Biochem Biophys* 236: 36-46 (1985)

Tanaka T, Shiratori Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tsukada Y, Omata M. High incidence of ADH2\*1/ALDH2\*1 genes among Japanese alcohol dependents and patients with alcoholic liver disease.  
*Hepatology* 23: 234-239 (1996)

Tank AW, Weiner H, Thurman JA. Enzymology and subcellular localization of aldehyde oxidation in rat liver: oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde derived from dopamine to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid.  
*Biochem Pharmacol* 30: 3265-3275 (1981)

Télliez C, Santis R. Impacto médico –social del alcoholismo y su prevención.  
*Centro de estudios públicos*. Documento de trabajo n°215, Santiago-Chile (1994)

Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, Mai XL, Jerome RE, Li TK, Wang SP, Lin YT, Lu RB, Yin SJ. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men.

*Am J Hum Genet* 48: 677-681 (1991)

Toietta G, Mane VP, Norona WS, Finegold MJ, Ng Q, McDonagh AF, Beaudet AL, Lee B. Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector.

*Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3930-3935 (2005)

Tran N, Raponi M, Dawes IW, Arndt GM. Control of specific gene expression in mammalian cells by co-expression of long complementary RNAs.

*FEBS Lett* 573: 127-134 (2004)

Tu GC, Israel Y. Alcohol consumption by orientals in North America is predicted largely by a single gene.

*Behav Genet* 25: 59-65 (1995)

Umulis DM, Gurmen NM, Singh P, Fogler HS. A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings.

*Alcohol* 35: 3-12 (2005)

Vaccari A, Ferraro L, Saba P, Ruiu S, Mocci I, Antonelli T, Tanganelli S. Differential mechanisms in the effects of disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication on striatal release and vesicular transport of glutamate.

*J Pharmacol Exp Ther* 285: 961-967 (1998)

Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, Nebert DW. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping.

*Pharmacogen* 9: 421-434 (1999)

Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects.

*Nature* 389: 239-242 (1997)

Wadsworth SC, Zhou H, Smith AE, Kaplan JM. Adenovirus vector-infected cells can escape adenovirus antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte killing in vivo.

*J Virol* 71: 5189-5196 (1997)

Wahid S, Khanna JM, Carmichael FJ, Lindros KO, Rachamin G, Israel Y. Alcohol-induced redox changes in the liver of the spontaneously hypertensive rat: effect of chronic ethanol treatment.

*Biochem Pharmacol* 30: 1277-1282 (1981)

Watanabe A, Hobara N, Nakatsukasa H, Shiota T, Kobayashi M, Nagashima H. Impaired acetaldehyde metabolism in partially hepatectomized rats.

*Res Exp Med* 185: 13-20 (1985)

Wang Y, Huang S. Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies.

*DDT* 5: 10-16 (2000)

Weiner H. Aldehyde dehydrogenase: mechanism of action and possible physiological roles. En: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. Volume 1. Majchrowicz E & Noble EP (editores.) Plenum Press, New York, pp. 107-122 (1979)

Williams ML, Hata JA, Schroder J, Rampersaud E, Petrofski J, Jakoi A, Milano CA, Koch WJ. Targeted  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ ARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts.  
*Circulation* 109: 1590-1593 (2004)

Williams SH. Medications for treating alcohol dependence.  
*Am Fam Physician* 72: 1775-1780 (2005)

Wolf G, Worgall S, Rooijen N, Song WR, Harvey BG, Crystal RG. Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ.  
*J Virol* 71: 624-629 (1997)

Xiao Q, Weiner H, Crabb DW. The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion.  
*J Clin Invest* 98: 2027-2032 (1996)

Yang YP, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4407-4411 (1994)

Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, Nemzer S, Pinner E, Walach S, Bernstein J, Savitsky K, Rotman G. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome.  
*Nat Biotechnol* 21: 379-386 (2003)

Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Matsushita S, Yoshimizu H, Higuchi S, Yokoyama T, Maruyama K, Ishii H. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms influence susceptibility to esophageal cancer in Japanese alcoholics.  
*Alcohol Clin Exp Res* 23: 1705-1710 (1999)

Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family.  
*Eur J Biochem* 25: 549-557 (1998)

Yoshida A, Huang IY, Ikawa M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 81: 258-261 (1984)

Zhang R, Iyer RP, Yu D, Tan W, Zhang X, Lu Z, Zhao H, Agrawal S. Pharmacokinetics and tissue disposition of a chimeric oligodeoxynucleoside phosphorothioate in rats after intravenous administration.  
*J Pharmacol Exp Ther* 278: 971-979 (1996)

Zhou J, Weiner H. Basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase.

*Biochem* 39: 12019-12024 (2000)

Zintzaras E, Stefanidis I, Santos M, Vidal F. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease?

*Hepato*l 43: 352-361 (2006)