

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Tabla de contenido.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
1 Introducción	1
1.1 Alcoholismo y sus consecuencias	1
1.2 Problemas de salud asociados al alcoholismo	2
1.3 Problemas socio-económicos asociados al alcoholismo	3
1.3.1 Factores que predisponen al alcoholismo	3
1.4 Enzimas metabolizadoras del alcohol y acetaldehído	4
1.4.1 Alcohol deshidrogenasa	5
1.4.2 Catalasa	8
1.4.3 Oxidación microsomal (citocromo P450)	8
1.4.4 Aldehído deshidrogenasa	9
1.5 Tratamientos para el alcoholismo	11
1.5.1 Acamprosato.....	11
1.5.2 Naltrexona	12
1.5.3 Disulfiram.....	12
1.5.4 Alternativas no farmacológicas	13
1.6 Terapia génica	14
1.6.1 Pre-requisitos de la terapia génica	15
1.6.2 Genes integrados en cromosomas	15
1.6.3 Genes episomales	15
1.7 Vehículos para transferencia génica	16
1.7.1 Vehículos basados en plasmidios.....	17
1.7.2 Vectores Virales.....	17
1.7.3 Biología del virus adeno-asociado	21
2 Hipótesis y objetivos	29
2.1 Hipótesis del trabajo	29
2.2 Objetivo general	29
2.3 Objetivos específicos	29
3 Materiales y Métodos.....	30
3.1 Diseño Experimental.....	30

3.2	 Materiales y Reactivos	33
3.2.1	Cepas bacterianas	33
3.2.2	Oligonucleótidos utilizados	33
3.2.3	Reactivos químicos generales	34
3.2.4	Medios de cultivo	35
3.3	 Métodos	35
3.3.1	Electroforesis de ADN	35
3.3.2	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	35
3.3.3	Purificación y concentración de fragmentos de ADN	35
3.3.4	Ligación de fragmentos de ADN	36
3.3.5	Transformación de células electrocompetentes	36
3.3.6	Minipreparación de ADN plasmidial	36
3.3.7	Construcción de plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2	36
3.3.8	Cultivo en adherencia	37
3.3.9	Transfección de células HEK-293	37
3.3.10	Producción y purificación de partículas virales en HEK-293	38
3.3.11	Cuantificación de genomas virales	39
3.3.12	Transducción líneas celulares	40
3.3.13	Western Blot	40
3.3.14	RT-PCR y RT-PCR cuantitativo	41
3.3.15	Determinación de etanol y acetaldehído mediante cromatografía de gases	41
3.3.16	Análisis estadísticos	41
4	 Resultados	42
4.1.1	Selección de una secuencia shRNA para silenciar la expresión de ALDH2	42
4.1.2	Construcción plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2	43
4.1.3	Generación de células HEK-293 que expresan ALDH2 en forma estable	44
4.1.4	Silenciamiento de ALDH2 en células HEK-293/ALDH2 mediante transfección	45
4.1.5	Producción, purificación y cuantificación de partículas virales	46
4.1.6	Silenciamiento de ALDH2 con partículas virales en células HEK-293/ALDH2	48
4.1.7	Silenciamiento de la expresión de ALDH2 en células de hepatoma humano	50
4.1.8	Medición de niveles de acetaldehído en células HepG2 metabolizadoras de etanol	52
5	 Discusión	54
6	 Conclusiones	58
7	 Bibliografía	60
8	 Anexos	67
8.1	Publicaciones realizadas durante el doctorado	67

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Metabolismo del etanol</i>	5
<i>Figura 2. Vectores usados en terapia génica</i>	16
<i>Figura 3. Adenovirus entran a la célula por endocitosis mediada por receptor</i>	19
<i>Figura 4. Mapa del genoma de AAV</i>	20
<i>Figura 5. Representación esquemática del ciclo de infección de AAV2</i>	22
<i>Figura 6. Genoma ssAAV y scAAV</i>	25
<i>Figura 7. Ciclo de replicación del virus Adeno-asociado (AAV) y formación de genomas diméricos (scAAV)</i>	27
<i>Figura 8. Diseño experimental del trabajo de tesis</i>	30
<i>Figura 9. Plasmidio pscAAV_shRNA_ALDH2</i>	32
<i>Figura 10. Mapa de los plasmidios pSC-TTRmvmFIX y pLKO.1_ALDH2</i>	37
<i>Figura 11. Mapa del plasmidio pLX304-V5-Blast-Empty</i>	38
<i>Figura 12. Plasmidios utilizados en la triple transfección</i>	39
<i>Figura 13. Expresión de ALDH2 en células HEK-293 para selección de shRNA</i>	43
<i>Figura 14. Digestión de plasmidios pLKO.1_shRNA2 y pSC-TTRmvmFIX</i>	44
<i>Figura 15. Expresión estable de ALDH2 en HEK-293</i>	45
<i>Figura 16. Silenciamiento de ALDH2 por plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2 en células HEK-293/ALDH2</i>	46
<i>Figura 17. Identificación de fracciones con partículas virales mediante microscopía de fluorescencia</i>	47
<i>Figura 18. Eficiencia de transducción en HEK-293/ALDH2</i>	49
<i>Figura 19. Expresión de ALDH2 en células HEK-293/ALDH2 tratadas con scAAV2/shRNA</i>	50
<i>Figura 20. Eficiencia de transducción en HepG2</i>	51
<i>Figura 21. Inhibición de la expresión de ALDH2 en células HepG2 tratadas con scAAV2/shRNA</i>	52
<i>Figura 22. Silenciamiento de ALDH2 en células VL17A HepG2 y acumulación de acetaldehído</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Constantes cinéticas de las isoenzimas humanas de ADH del hígado.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabla 2. Frecuencia de los alelos ADH en poblaciones de distintas razas.</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 3. Medicamentos para tratar la dependencia de alcohol.</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 5. Reactivos químicos utilizados</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 6.- Secuencia de los shRNA y sus sitios de acción</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 7. Concentraciones partículas virales (genomas virales/mL).....</i>	<i>48</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
AAV	Virus Adeno-asociado
ALDH2	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial (isoforma 2)
Amp	Ampicilina
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales
BSA	Seroalbúmina de bovino
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato ácido
g	Gramo
GFP	Proteína fluorescente verde
h	Hora
HEK-293	células embrionarias de riñón humano 293
HepG2	Células tumorales de hígado humano
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
ms	Milisegundos
NCBI	Centro Nacional (EE.UU.) de Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O.D.	Densidad óptica
o.n.	Toda la noche (<i>over night</i>)
°C	Grados Celsius
p.i.	Post infección
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retro transcripción seguida de un PCR convencional
RT-qPCR	Retro transcripción seguida de un PCR cuantitativo
s	Segundos
scAAV	Virus Adeno-asociado self complimentary
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
vg	Genomas virales
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
