



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**“Inhibición de la expresión del gen de la  
deshidrogenasa aldehídica:  
Evaluación del sistema de RNA de interferencia.”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
de los requisitos para optar al grado de:

Doctor en Bioquímica

Gabriel Cortínez Flores

Director de tesis: Dr. Yedy Israel Jacard

Santiago – Chile 2008

*“...crezcan y multipliquense; llenen la tierra y sométanla;  
dominen sobre los peces del mar, las aves del cielo  
y todos los animales que se mueven por ella”*

Génesis 1:28

## **Agradecimientos**

Estas primeras líneas son para dar gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de formar parte de un maravilloso grupo, humano y científico, y por todas aquellas señales y la fuerza que me ha dado, especialmente en los momentos más difíciles.

Al Doctor Yedy Israel mi eterno agradecimiento por haberme acogido para formar parte de su laboratorio y guiarme en este proceso de formación. Doc muchas gracias por las discusiones científicas y las no tanto, las que sin duda han hecho de mí un mejor científico y persona. Por su generosidad para conmigo estaré eternamente agradecido.

A la Dra. Amalia Sapag mi profundo agradecimiento, por haberme guiado cuando recién llegue al laboratorio, enseñándome su funcionamiento y por todo su apoyo a lo largo de esta tesis. Muchas gracias Doctora por todas las discusiones científicas, sus consejos y palabras de aliento cuando las cosas no iban bien.

Agradezco a los integrantes de la comisión doctores Catherine Connelly, Daniela Seelenfreund, Paulette Conget, Alejandro Venegas y Omar Orellana por sus valiosos comentarios y aportes, los que han enriquecido enormemente este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio quienes, más que compañeros, son mi segunda familia. Giugliana, Paula, Thergiory, Robel, Fernando, Gonzalo, Ginez, Mario, Javier y Benjamín muchas gracias por su amistad, compañerismo y por hacer de este laboratorio un lugar grato para trabajar.

A mis amados padres Silvia y Gonzalo y a mi hermana Alejandra, quienes siempre me han apoyado en mis decisiones. Gracias a su amor y cuidados me he convertido en la persona que soy hoy. Los amo mucho.

A mi amada esposa Adela mi más sincero agradecimiento por haberme acompañado, sin condiciones, en este proceso sin jamás haber perdido la fe en mí. Adelita muchas gracias por haber postergado tus sueños para que yo pudiera alcanzar los míos.

A mis amados hijos Fernando y Leonardo, gracias por estar aquí, ustedes son mi cable al cielo.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Farmacoterapia Génica perteneciente al 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, **Iniciativa Científica Milenio** P99-031F y **NIAAA** R01 015421 del Dr. Yedy Israel J.

Gabriel Cortínez recibió la beca **CONICYT** para estudiantes de doctorado, la beca del departamento de Postgrado y Postítulo de la **Universidad de Chile** PG/105/02 y la beca **CONICYT** AT-403111 de apoyo a la tesis doctoral.

## **PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

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

- **Manuscrito para una revista**

Gabriel Cortínez, Amalia Sapag y Yedy Israel

*“RNA interference (RNAi) against aldehyde dehydrogenase-2: Development of tools for alcohol research”*

Manuscrito enviado a: “Alcohol” (12 de mayo de 2008)

- **Publicaciones electrónicas**

Cortínez,G., Sapag, A. y Israel,Y.

Homo sapiens cell-line Hep G2 7SK RNA promoter region, complete sequence

(Código de acceso AY578684)

Cortínez,G., Sapag, A. y Israel,Y.

Homo sapiens cell-line HEK-293 7SK RNA promoter region, complete sequence

(Código de acceso AY578685)

Cortínez,G., Sapag, A. y Israel,Y.

Homo sapiens cell-line Caco-2 7SK RNA promoter region, complete sequence

(Código de acceso AY578686)

- **Congresos**

Sapag A, Ocaranza P, Karahanian E, Lobos L, Cortínez G, Quintanilla ME, Lutske T, Israel Y.

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

II Congreso Nacional de Medicina Genómica.

México D.F. México. Octubre 2006

Cortínez G, Sapag A, Israel Y.

“RNAi, interferencia por RNA, en la expresión del gen de la deshidrogenasa aldehídica de rata: Prueba del principio”

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.

Pucón, Chile. Octubre 2005.

Cortínez G, Sapag A, Israel Y.

“Disminución de la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) en células humanas transfectadas con un siRNA”

XLVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.

Pucón, Chile. Noviembre 2004

## **INDICE GENERAL**

	Pág.
<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>i</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Genética del alcoholismo .....	1
1.2 Metabolización del alcohol .....	2
1.2.1 Deshidrogenasa aldehídica .....	3
1.2.2 ALDH2*2: alelo protector del alcoholismo.....	5
1.3 Fármacos contra el alcoholismo .....	6
1.3.1 Naltrexona .....	7
1.3.2 Acamprosato .....	7
1.3.3 Disulfiram .....	7
1.4 Terapia génica contra la ALDH2 .....	8
1.5 Silenciamiento génico postranscriptional .....	9
1.5.1 RNAs interferentes pequeños (siRNAs).....	10
1.5.2 Interferencia por RNAs pequeños en células animales.....	12
1.5.3 Diseño racional de siRNAs .....	13
1.6 Síntesis endógena de horquillas de RNA (shRNAs).....	17
1.7 Promotores reconocidos por la RNA polimerasa III.....	17
1.8 Vectores virales .....	19
1.9 Recapitulación .....	21
<b>2 HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivo específico .....	23

	<b>Pág.</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Cultivo celular .....	24
4.1.1 Cultivo de células de riñón de embrión humano HEK-293 .....	24
4.1.2 Cultivo de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 .....	24
4.1.3 Traspaso de cultivos celulares.....	25
4.2 Experimentos con siRNAs .....	25
4.2.1 Diseño de siRNAs .....	25
4.2.2 Formación de siRNAs.....	26
4.2.3 Transfección de células HEK-293 con siRNA .....	27
4.2.4 Extracto celular crudo para medir la actividad de la ALDH2 .....	28
4.2.5 Medición de la actividad de la ALDH2 .....	28
4.3 Genes de shRNA precursores del siRNA2.....	30
4.3.1 Amplificación de promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III .....	30
4.3.2 Purificación de amplicones de los promotores humanos .....	34
4.3.3 Clonamiento de promotores de tipo III de la RNA polimerasa III humana y transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	35
4.3.4 Funcionalidad de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa III.....	35
4.3.5 Detección de un RNA de 116 nt expresado bajo el control de promotores humanos en células HEK-293 y H4-II-E-C3.....	38
4.3.6 Construcción de un gen codificante de una horquilla de RNA (shRNA) .....	38
4.3.7 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	39
4.4 Construcción de vectores adenovirales de 1 <sup>ra</sup> generación .....	42
4.4.1 Traspaso del gen interferente desde el plásmido pGEM-T Easy al plásmido transportador pAdTrack .....	42
4.4.2 Producción del genoma adenoviral: recombinación de pAdEasy-1 con pAdTrack.....	44

	<b>Pág.</b>
4.4.3 Producción de vectores adenovirales .....	47
4.4.4 Purificación de vectores adenovirales.....	49
4.4.5 Cuantificación de vectores adenovirales.....	50
4.4.6 Infección de células H4-II-E-C3 con vectores adenovirales y medición de la ALDH2 .....	50
4.4.7 Extracción de RNA total.....	51
4.4.8 Electroforesis de RNA .....	51
4.4.9 Transferencia del RNA a una membrana.....	51
4.4.10 Marcación de la sonda .....	52
4.4.11 Hibridación del RNA .....	52
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1 Modelo celular .....	53
5.1.1 Actividad de la ALDH2 de rata en células humanas HEK-293.....	53
5.2 Experimentos con siRNAs .....	56
5.2.1 Inhibición de la expresión de la ALDH2 de rata en células HEK-293 transfectadas con siRNAs .....	56
5.3 Experimentos con shRNA.....	60
5.3.1 Clonación de tres promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III .....	60
5.3.2 Funcionalidad de los promotores humanos en células de rata H4-II-E-C3 y humanas HEK-293.....	60
5.3.3 Construcción de genes que expresan horquillas de RNA bajo el control de promotores de la RNA polimerasa III humana .....	65
5.3.4 Disminución del mensajero de la ALDH2 de rata en células HEK-293.....	68
5.3.5 Transcripción del gen del shRNA y detección del siRNA.....	68

	<b>Pág.</b>
5.4 Experimentos con vectores adenovirales.....	70
5.4.1 Construcción de un vector adenoviral de 1 <sup>ra</sup> generación que codifica el shRNAc .....	70
5.4.2 Análisis de Northern para RNA total de hepatomas de rata (H4-II-E-C3).....	74
<b>6 DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
6.1 Expresión del gen de la ALDH2 de rata en células humanas HEK-293.....	77
6.2 Elección de las secuencias blanco contra la ALDH2 de rata.....	79
6.3 Potencialidad del siRNA2 como fármaco genético contra el alcoholismo .....	80
6.4 Construcción de genes que expresan un shRNA precursor del siRNA2 para inhibir la expresión de la ALDH2.....	81
6.5 Elección del promotor para expresar un shRNA .....	84
6.6 La estructura del shRNA determina su actividad inhibitoria .....	85
6.7 Entrega permanente del shRNA e inhibición de la ALDH2 de rata.....	86
6.8 Proyecciones de esta tesis .....	88
<b>7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>8 REFERENCIAS .....</b>	<b>91</b>

## **INDICE DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
Figura 1 : Esquema general del metabolismo del etanol en hígado.....	4
Figura 2 : Mecanismo de silenciamiento por RNAs interferentes pequeños .....	11
Figura 3 : Esquema general de un promotor de tipo III de la RNA polimerasa III.....	18
Figura 4 : Curso temporal del proceso de transfección.....	29
Figura 5 : Esquema de un RNA formador de horquilla transcrito por la RNA polimerasa III a partir del promotor del RNA U6+35 .....	33
Figura 6 : Esquema de ligación de un inserto reportero.....	37
Figura 7 : Construcción de genes codificantes de horquilla de RNA.....	40
Figura 8 : Ligación del gen interferente al plásmido transportador pAdTrack.....	43
Figura 9 : Plásmido pAdEasy-1 .....	45
Figura 10 : Recombinación homóloga del plásmido pAdEasy-1 y pAdTrack.....	46
Figura 11 : Plásmido recombinante que posee el genoma de un vector adenoviral de 1 <sup>ra</sup> generación .....	48
Figura 12 : Análisis por citometría de flujo de células H4-II-E-C3 transfectadas con un plásmido que codifica la eGFP .....	54
Figura 13 : Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con pACCMVpALDH2D y sin transfectar.....	55
Figura 14 : Secuencia y ubicación de los siRNAs sobre el mRNA de la ALDH2 de rata.....	57
Figura 15 : Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con siRNAs .....	59
Figura 16 : RT-PCR de un RNA de 116 nt expresado bajo el control de distintos promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III de rata.....	62
Figura 17 : Predicción de la estructura secundaria del RNA U6 humano.....	64

Figura 18 : Plegamiento predicho de los shRNAs obtenidos por transcripción de genes controlados por el promotor del RNA U6 humano .....	66
Figura 19 : Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con plásmidos que expresan un shRNA bajo el control del promotor del RNA U6+35 humano.....	67
Figura 20 : Reducción selectiva del mensajero de la ALDH2 de rata en células HEK-293 transfectadas con el plásmido pshRNAc .....	69
Figura 21 : Detección de siRNA2 y shRNAc en células HEK-293.....	71
Figura 22 : Eficiencia de transducción de las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 con AdV-shRNAc.....	72
Figura 23 : Actividad de la ALDH2 de células de hepatoma de rata transfectadas con vectores adenovirales interferente y control (AdV-shRNAc y AdV-Control) .....	73
Figura 24 : Análisis de Northern con RNA de células H4-II-E-C3 transducidas con AdV-shRNAc.....	75

## **INDICE DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1 : Criterios utilizados por Elbashir y <i>cols.</i> para diseñar siRNAs .....	15
Tabla 2 : Algoritmo empírico de Reynolds y <i>cols.</i> para diseñar siRNAs.....	16
Tabla 3 : Oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores de la RNA polimerasa III de humanos .....	31
Tabla 4 : Oligonucleótidos utilizados para formar, por apareamiento, los fragmentos A y B que originan la secuencia codificante de las horquillas de RNA.....	41
Tabla 5 : Diferencias nucleotídicas en el promotor del RNA 7SK de distintos tipos celulares humanos .....	61

## **ABREVIATURAS**

AdV-shRNA	:	Adenovirus que codifica una horquilla de RNA
ALDH2	:	Deshidrogenasa aldehídica mitocondrial
ALDH	:	Deshidrogenasa aldehídica
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eGFP	:	Proteína Fluorescente Verde intensificada
gDNA	:	DNA genómico
H4-II-E-C3	:	Células de hepatoma de rata
HEK-293	:	Células embrionarias de riñón humano
HepG2	:	Células de hepatoma humano
IFITM-1	:	Proteína de transmembrana inducida por interferón
miRNA	:	Micro RNA
pACCMVpALDH2D	:	Plásmido de expresión que codifica la ALDH2 de rata
pv/c	:	partículas virales por célula
RISC	:	Complejo ribonucleoproteico de silenciamiento
shRNA	:	Horquilla de RNA
siRNA	:	RNA interferente

## **RESUMEN**

El alcoholismo es una enfermedad multifactorial que genera una serie de trastornos personales, sociales y de salud pública. Según estimaciones del Ministerio de Salud de Chile el abuso en el consumo de alcohol y el alcoholismo causa pérdidas al país por US\$3.000 millones anuales.

Luego de la oxidación hepática del etanol, el acetaldehído generado es metabolizado a acetato por la deshidrogenasa aldehídica 2 (ALDH2\*1). En la población Asiática existen individuos que poseen una variante de la ALDH2 con baja actividad (ALDH2\*2) los que experimentan un marcado aumento del acetaldehído sanguíneo después de una ingesta alcohólica. Este incremento del acetaldehído causa diversos efectos tales como el enrojecimiento facial, palpitaciones, hipotensión, cefaleas y náuseas (conocido como “fenotipo asiático”) los que producen un rechazo al consumo del alcohol. Los heterocigotos (*ALDH2\*1/ALDH2\*2*) beben moderadamente, mientras que los homocigotos (*ALDH2\*2/ALDH2\*2*) son abstemios.

El tratamiento farmacológico del alcoholismo se basa en el uso de diversos medicamentos como la naltrexona y el acamprosato que actúan en el sistema nervioso central bloqueando los receptores de endorfinas y NMDA, inhibiendo la sensación de placer asociada al alcohol o disminuyendo los síntomas de la abstinencia alcohólica. Otro fármaco utilizado es el disulfiram, un modificador químico de grupos sulfhidrilos, que inhibe la ALDH2 produciendo un aumento en el nivel de acetaldehído cuando el paciente bebe alcohol, emulando el fenotipo asiático. Estos fármacos requieren administración diaria lo que a causa de la baja adhesión a los tratamientos farmacológicos, reduce su eficacia terapéutica. Un nuevo fármaco de efecto

prolongado, que emule el fenotipo asiático sin los efectos secundarios del disulfiram, sería de gran ayuda en el campo del alcoholismo.

En esta tesis se evaluó la utilidad de dos algoritmos para diseñar racionalmente siRNAs eficientes que disminuyan la actividad de la ALDH2, mediante la degradación selectiva de su mensajero. El objetivo final fue generar un siRNA como herramienta genética en el campo del alcoholismo o como posible fármaco para su tratamiento.

Se diseñaron y estudiaron tres RNAs interferentes dirigidos a distintos sitios del RNA mensajero de la ALDH2 de rata. Dos de ellos disminuyen en 60-70% la actividad de la ALDH2 en células humanas HEK-293 que expresan el gen de la enzima de rata. Empleando la secuencia del RNA interferente más prometedor (siRNA2) se diseñaron y probaron tres genes que, estando bajo el control del promotor del RNA U6 humano, dan origen a horquillas de RNA (shRNA a, b y c) precursoras del siRNA2. El shRNAc, codificado en un plásmido, disminuyó en 50% la actividad de la ALDH2 en células HEK-293. La reducción de actividad concuerda con el 60% de disminución de su mensajero. Esta disminución es específica, puesto que el mensajero de la  $\beta$ -actina y el de IFITM-1 se mantuvieron constantes. La transducción de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 con un vector adenoviral de 1<sup>ra</sup> generación que codifica la misma horquilla (AdV-shRNAc) disminuyó en 10-15% la actividad de la ALDH2 endógena. La pérdida de eficiencia probablemente se debe a la inhibición de exportina 5 y Dicer, por acción del RNA VAI codificado en los adenovirus.

Finalmente, los algoritmos permitieron diseñar siRNAs que reducen la actividad de la ALDH2 por sobre el 50%. La transfección de células humanas (HEK-293) con dos de los tres siRNAs sintetizados químicamente o con un plásmido que codifica un shRNA,

redujeron significativamente la actividad de la ALDH2 en células humanas, estableciendo que la interferencia por RNA es una estrategia de silenciamiento génico de utilidad para disminuir la actividad de la ALDH2.

## **SUMMARY**

### **“INHIBITION OF THE EXPRESSION OF THE ALDEHYDE DEHYDROGENASE GENE: EVALUATION OF THE RNA INTERFERING SYSTEM”**

Alcoholism is a multifactorial disease that leads to a number of disorders in the personal, social and public health areas. According to the Department of Health of Chile, alcoholism and alcohol abuse cost three billion dollars per year.

Following the hepatic oxidation of ethanol, acetaldehyde generated is metabolized into acetate by aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2\*1). In the Asian population some individuals carry a low activity ALDH2 variant (ALDH2\*2) and display high acetaldehyde levels after alcohol consumption. The high levels of acetaldehyde are responsible for facial flushing, palpitations, hypotension, headaches and nausea that they experience (known as the “Asian alcohol phenotype”) which trigger an aversion to alcohol. Heterozygotes (ALDH2\*1/ALDH2\*2) are moderate drinkers, while homozygotes (ALDH2\*2/ALDH2\*2) are abstemious.

The pharmacological treatment against alcoholism uses medications such as naltrexone and acamprosate that block endorphin and glutamate (NMDA) receptors respectively in the central nervous system, inhibiting the pleasure associated with alcohol intake or diminishing alcohol withdrawal symptoms. Another medication in use is disulfiram, a chemical modifier of sulfhydryl groups that inhibits ALDH2, resulting in increases in blood acetaldehyde levels after alcohol consumption, mimicking the Asian phenotype. These treatments require daily administration that, in addition to low compliance for taking medication, reduce the therapeutic efficacy. A new drug with

prolonged effects, that would mimic the Asian phenotype, without the side effects of disulfiram, would be of value in the alcoholism field.

In this thesis the usefulness of two algorithms for the rational design of efficient siRNAs to reduce the ALDH2 activity were tested. The aim was to develop siRNAs as genetic tools for alcohol research or as a possible adjunct in the treatment of alcoholism.

Three siRNAs, targeted against different sites of the rat ALDH2 mRNA, were designed and studied. Two of them were active, diminishing by 60-70% the ALDH2 activity in human HEK-293 cells expressing the rat ALDH2 gene. Using the sequence of the most promising siRNA (siRNA2), three genes driven by the U6 RNA promoter were designed to generate short hairpin RNA precursors of siRNA2 (shRNAa, b and c). shRNAc, encoded in a plasmid, diminished the ALDH2 activity by 50% in HEK-293 cells. This activity reduction is in agreement with the 60% reduction of the ALDH2 mRNA levels. This reduction was specific, since the  $\beta$ -actin and IFITM-1 mRNA levels remained constant. However, the transduction of H4-II-E-C3 hepatoma cells with a first generation adenoviral vector encoding the same hairpin (AdV-shRNAc) reduced the ALDH2 activity by 10-15%. The drop in efficiency is probably due to the inhibition of exportin 5 and Dicer by the action of the VA I RNA encoded in the adenoviral vector.

Finally, the algorithms were useful to design active siRNAs that inhibit the ALDH2 activity over 50%. The transfection of human cells (HEK-293) with two of the three siRNAs chemically synthesized (*in vitro*) or with a plasmid coding for an shRNA significantly inhibits the ALDH2 activity, establishing that RNA interference is a useful gene-silencing strategy for reducing ALDH2 activity.

## **1 INTRODUCCIÓN**

Los efectos del consumo excesivo de alcohol son un grave problema de salud pública en Chile. En el año 2005, CONACE (Consejo Nacional para el Control de Estupefacientes) estimó que en Chile, cerca de 5 millones de personas consumían frecuentemente alcohol. De estos el 12,6% presentaban signos de dependencia alcohólica, siendo 2 a 3 veces mayor en hombres que en mujeres (17,4% *versus* 6,8%). El alcoholismo se asocia a distintas patologías hepáticas, principalmente cirrosis (Téllez y Santis, 1994). Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en Chile 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. En nuestro país la mortalidad por cirrosis alcohólica es la cuarta causa de muerte, siendo superados en Latinoamérica sólo por México (Alcohol and Health, 1997). Por tratarse de una enfermedad que se presenta en personas jóvenes, el alcoholismo causa la pérdida de un 25% de los años de sobrevida por muerte prematura, produce mermas asociadas a ausentismos, accidentes laborales y a gastos adicionales en salud producto de complicaciones en pacientes alcohólicos (Figuroa y *cols.*, 1998). El Ministerio de Salud de Chile ha estimado que anualmente el país pierde US\$ 3.000 millones por el abuso de alcohol.

### **1.1 GENÉTICA DEL ALCOHOLISMO**

La predisposición a desarrollar alcoholismo tiene factores medioambientales (sociales, culturales y económicos) y genéticos (Prescott y Kendler, 1999). Cerca del 50% de la predisposición es genética, como lo demuestran estudios con gemelos, mellizos y

hermanos gemelos entregados en adopción separadamente e hijos de padres alcohólicos (Heath y *cols.*, 1991; Prescott y Kendler, 1999; Schuckit, 2000). La influencia es multigénica (Thomasson y *cols.*, 1991) y algunos factores están relacionados directamente con las enzimas que metabolizan el alcohol. El gen que codifica la deshidrogenasa aldehídica 2 (*ALDH2\*1*), enzima involucrada en la metabolización del acetaldehído (un metabolito del etanol) esta relacionada con la posibilidad de consumir de alcohol (Couzigou y *cols.*, 1994; Takeshita y *cols.*, 2000). En la población asiática aproximadamente el 30% de los individuos poseen una variante del gen de la deshidrogenasa aldehídica ALDH2 (*ALDH2\*2*) que codifica una enzima poco activa, bloqueando el proceso normal de eliminación del acetaldehído, primer producto del metabolismo del etanol. Las personas que poseen esta variante (*ALDH2\*2*) generan altos niveles de acetaldehído, un producto aversivo, cuando ingieren alcohol. Como consecuencia, los portadores de esta variación sólo consumen bebidas alcohólicas con moderación o son abstemios (Yoshida y *cols.*, 1998).

## 1.2 METABOLIZACIÓN DEL ALCOHOL

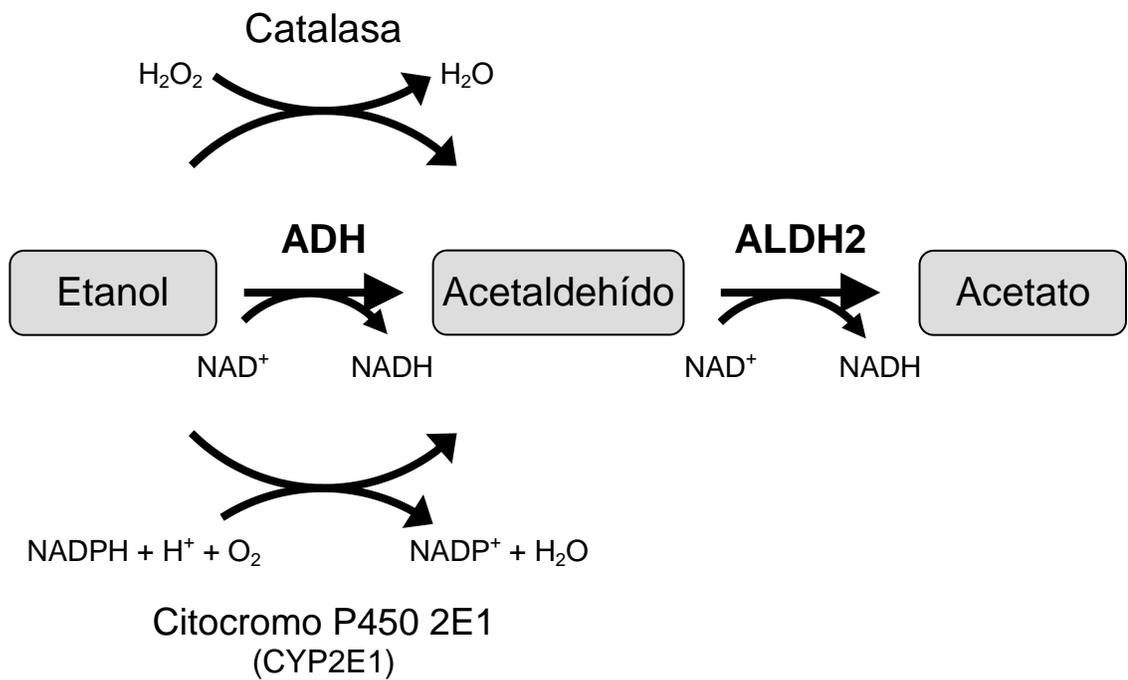
El etanol es ingerido por vía oral, absorbido parcialmente en el estómago y rápidamente en la primera parte del intestino (Umulis y *cols.*, 2005). El alcohol es 100% miscible en agua, con un coeficiente de partición de 2100/1 (agua/octanol), por lo que se distribuye ampliamente en el agua de todos los tejidos. El alcohol es metabolizado principalmente en el hígado, siendo sólo un 10% eliminado por vías alternativas como la respiración o la orina (Brecher y *cols.*, 1997; Lands, 1998; Umulis y *cols.*, 2005).

La metabolización hepática del etanol puede dividirse en 2 etapas. La primera constituye la oxidación del etanol a acetaldehído principalmente por acción de la deshidrogenasa alcohólica (ADH, EC 1.1.1.1) (Matsumoto y Fukui, 2002) y en menor grado por acción del citocromo CYP2E1 y de la catalasa (Lieber, 1999) (Figura 1). La segunda etapa la constituye la oxidación del acetaldehído a acetato por acción de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2, EC 1.2.1.3) (Farrés y cols., 1989; Huang y Lindahl, 1990; Svanas y Weiner, 1985; Thomasson y cols., 1991). Ambas enzimas utilizan nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) como cofactor en sus reacciones de oxidación (Svanas y Weiner, 1985; Sheikh y cols., 1997).

### 1.2.1 Deshidrogenasa aldehídica

La deshidrogenasa aldehídica 2 (ALDH2) pertenece a una familia de 12 genes, de los cuales 8 se expresan en hígado (Vasiliou y cols., 1999). Estas isoformas se diferencian principalmente en sus propiedades bioquímicas y en su distribución subcelular (Yoshida y cols., 1998) encontrándose en el citoplasma, mitocondria y en la fracción microsomal. La ALDH2 (mitocondrial) tiene una estructura cuaternaria tetramérica (Yoshida y cols., 1998) y cada subunidad tiene 500 aminoácidos (GenBank: NM\_000690)

Las ALDHs se han clasificado según su afinidad por el acetaldehído (Weiner, 1979). La ALDH2 tiene una gran afinidad por el acetaldehído con una  $K_M < 0,2 \mu\text{M}$  y es la principal responsable de la oxidación del acetaldehído a acetato (Feldman y Weiner, 1972; Tank y cols., 1981; Klyosov y cols., 1996; Zhou y Weiner, 2000), mientras que la



**Figura 1: Esquema general del metabolismo del etanol en el hígado**

En el hígado, el etanol es oxidado a acetaldehído en el citoplasma por acción de la deshidrogenasa alcohólica (ADH) y este es oxidado a acetato por la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2). Adicionalmente una pequeña fracción del etanol es oxidado por el citocromo P450 (CYP2E1) y la catalasa.

ALDH1 (citoplasmática) tiene una  $K_M$  de 180  $\mu\text{M}$  para el acetaldehído; en consecuencia sólo tiene importancia fisiológica cuando la actividad de la ALDH2 está inhibida, por acción de algún fármaco y en los portadores de la variante *ALDH2\*2*, el cual actúa como dominante negativo disminuyendo la actividad de la ALDH2.

### 1.2.2 *ALDH2\*2*: alelo protector del alcoholismo

En Asia se ha encontrado que una parte de la población posee la variante alélica (*ALDH2\*2*). El alelo *ALDH2\*2* posee el cambio de una guanina a una adenina en el nucleótido 1510, codifica un cambio de Glu a Lys en el aminoácido 487 (Farrés y cols., 1994). Este cambio disminuye la afinidad de la enzima por el cofactor  $\text{NAD}^+$  de modo que, a las concentraciones fisiológicas del cofactor, la enzima es virtualmente inactiva (Farrés y cols., 1994; Zhou y Weiner, 2000). La presencia de esta variante genera heterotetrámeros (*ALDH2\*1/ALDH2\*2*) que tienen cerca de un 15% de la actividad del homotetrámero *ALDH2\*1*, actuando como un dominante negativo. Después de beber alcohol, quienes portan la variante *ALDH2\*2*, presentan 5 a 10 veces más acetaldehído sanguíneo que quienes portan el alelo *ALDH2\*1*. En términos poblacionales, los portadores del alelo *ALDH2\*2* tienen una prevalencia de alcoholismo 75 a 99% menor que quienes portan solamente el alelo *ALDH2\*1* (Harada y cols., 1982; Thomasson y cols., 1991; Higuchi, 1994). Esta protección es genética, ya que los individuos heterocigotos para la ALDH2 (*ALDH2\*1/ALDH2\*2*) nacidos en una cultura que tolera el consumo excesivo de alcohol beben un 66% menos que los homocigotos (*ALDH2\*1/ALDH2\*1*) nacidos en la misma cultura (Tu e Israel, 1995).

La presencia de la  $ALDH2^{*2}$  disminuye la velocidad de oxidación del acetaldehído acumulándose éste en la sangre. Esta acumulación es responsable de los efectos desagradables como enrojecimiento facial, hipotensión, palpitaciones y náuseas que experimentan los portadores de la variante  $ALDH2^{*2}$  luego de ingerir alcohol (Mizoi y cols., 1983) y que condicionan una aversión a su consumo. Los individuos heterocigotos sólo beben con moderación y muestran entre un 66 y un 75% de protección frente al alcoholismo, mientras que los homocigotos son abstemios y tienen un 99% de protección (Goedde y cols., 1983; Harada y cols., 1982; Li, 2000; Thomasson y cols., 1991; Tu e Israel, 1995). Se demostró que poseer la variante inactiva ( $ALDH2^{*2}$ ) no representa una desventaja en relación a la longevidad, en cuanto que las frecuencias alélicas de las  $ALDH2$  en tres segmentos etarios (menores de 1 año; 25 a 35 años y mayores de 70 años) se mantienen sin diferencias significativas (Luo y cols., 2005).

### **1.3 FÁRMACOS CONTRA EL ALCOHOLISMO**

El alcoholismo es una enfermedad que tiene una manifestación muy variable en las distintas personas, por lo que el tratamiento a seguir es específico para cada caso, basándose en el historial de la persona, su decisión de recuperarse y su entorno (Pettinati y Rabinowitz, 2005). El tratamiento involucra en una primera etapa la privación y desintoxicación alcohólica y en la segunda, desarrollar una reducción substancial de su ingesta, lo que se acompaña con una intervención psicológica y farmacológica. Uno de los grandes problemas de todas las intervenciones farmacológicas es la poca adherencia al tratamiento, provocando en muchos casos que los pacientes vuelvan a los patrones de consumo previos a la terapia.

### **1.3.1 Naltrexona**

Entre los medicamentos utilizados en las terapias contra el alcoholismo se encuentra la naltrexona, un inhibidor de los receptores de endorfina. A mediados de la década de los 90, la FDA aprobó su uso en el tratamiento de pacientes alcohólicos. Actualmente se le utiliza en Canadá, Australia y algunos países de Europa (Pettinati y Rabinowitz, 2005). El consumo de alcohol aumenta la liberación de endorfinas desinhibiendo a las neuronas dopaminérgicas (Kenna y *cols.*, 2004). La naltrexona es un antagonista de los receptores de endorfinas, disminuyendo la liberación de dopamina. Dopamina que se estima sería responsable de los efectos placenteros del alcohol (Litten y *cols.*, 1996; Williams, 2005). Clínicamente se requiere una administración diaria de este fármaco.

### **1.3.2 Acamprosato**

Otro medicamento utilizado para tratar el alcoholismo es el acamprosato. Este fármaco bloquea el receptor glutaminérgico-N-metil-D-aspartato (NMDA), disminuyendo la hiperexcitabilidad producto de la ausencia del alcohol, reduciendo los síntomas de la privación alcohólica y junto con ello aumentando el período de abstinencia (Litten y *cols.*, 1996; Johnson y Ait-Daoud, 2000). Su vida media es cercana a las 12 h y requiere administraciones cada 8 h (Paille y *cols.*, 1995).

### **1.3.3 Disulfiram**

El disulfiram (1-[dietiltiocarbamoildisulfanil]-N,N-dietil-metanotioamida) ha sido utilizado desde el año 1954. Este fármaco ejerce su acción inhibiendo a la ALDH2. Como consecuencia, el acetaldehído es oxidado más lentamente y se acumula en la sangre cuando se ingiere alcohol (Garver y *cols.*, 2000; Quintanilla y *cols.*, 1993) emulando el fenotipo asiático, produciendo náuseas, vómitos y rubor facial. En estudios clínicos en

que se controla la ingesta diaria del disulfiram se ha demostrado su gran eficiencia en reducir el consumo de alcohol y aumentar el período de abstinencia (Chick y *cols.*, 1992), incluso cuando se lo compara con otros fármacos como la naltrexona y el acamprosato (Laaksonen y *cols.*, 2008). Lamentablemente, la vida media del disulfiram es de 7 h (Faiman y *cols.*, 1984; Yourick y Faiman, 1991) lo que obliga una administración periódica del fármaco para mantener inhibida a la ALDH2. Esto representa un inconveniente, pues los pacientes al experimentar los primeros efectos etanol/disulfiram suelen abandonar su uso (Fuller y *cols.*, 1986). Otra desventaja es que el disulfiram es un profármaco, requiere ser metabolizado a su forma biológicamente activa para ejercer su acción farmacológica (Madan y *cols.*, 1995; Mays y *cols.*, 1996). Este solo hecho produce fluctuaciones importantes del efecto farmacológico entre individuos. Este metabolito es un modificador químico de grupos sulfhidrilos que modifica otras proteínas además de la ALDH2 y produce efectos secundarios desagradables como alergias cutáneas, hipotensión postural, sabor metálico y neuropatías ópticas (Poulsen y *cols.*, 1992). Se ha intentado desarrollar un mecanismo de entrega prolongada del disulfiram utilizando “pellets”, sin embargo, estudios clínicos de su eficiencia han demostrado que no tiene mejor efecto que los placebos (Johnsen y *cols.*, 1990; Johnsen y Morland, 1991).

#### **1.4 TERAPIA GÉNICA CONTRA LA ALDH2**

En el año 2001 Garver y *cols.* reportaron la disminución del consumo de etanol de ratas luego de administrar un oligonucleótido fosforotioato de antisentido, complementario a una zona del mRNA de la ALDH2. Este estudio demostró por vez primera que una terapia génica basada en la inhibición de la expresión del gen de la

ALDH2 puede tener aplicaciones farmacológicas. Sin embargo, la vida media de los oligonucleótidos de fosforotioato es de dos días en rata y entre 6 y 14 días en humanos, obligando a administraciones periódicas para mantener disminuida la actividad de la ALDH2. Recientemente Ocaranza y *co/s.* (2008), mediante la administración de un vector adenoviral que genera un RNA de antisentido contra el mRNA de la ALDH2, demostraron una disminución del 50% del consumo voluntario de etanol en ratas dependientes al alcohol, que habían bebido grandes cantidades de alcohol durante 2 meses. Esta disminución tuvo una duración de 30 días con una sola dosis del fármaco génico. Debe hacerse notar que aunque una terapia génica con un RNA de antisentido sería más específica que aquella por la administración de disulfiram, la construcción no fue diseñada para distinguir entre los mensajeros de las diversas ALDHs existentes; lo que puede ocasionar que se inhiban otras ALDHs u otros genes que tengan zonas de complementariedad parcial con el antisentido de la ALDH2, produciendo efectos secundarios. Con el propósito de disminuir los posibles efectos secundarios sería deseable producir una disminución de la expresión del gen de la ALDH2 de manera más específica.

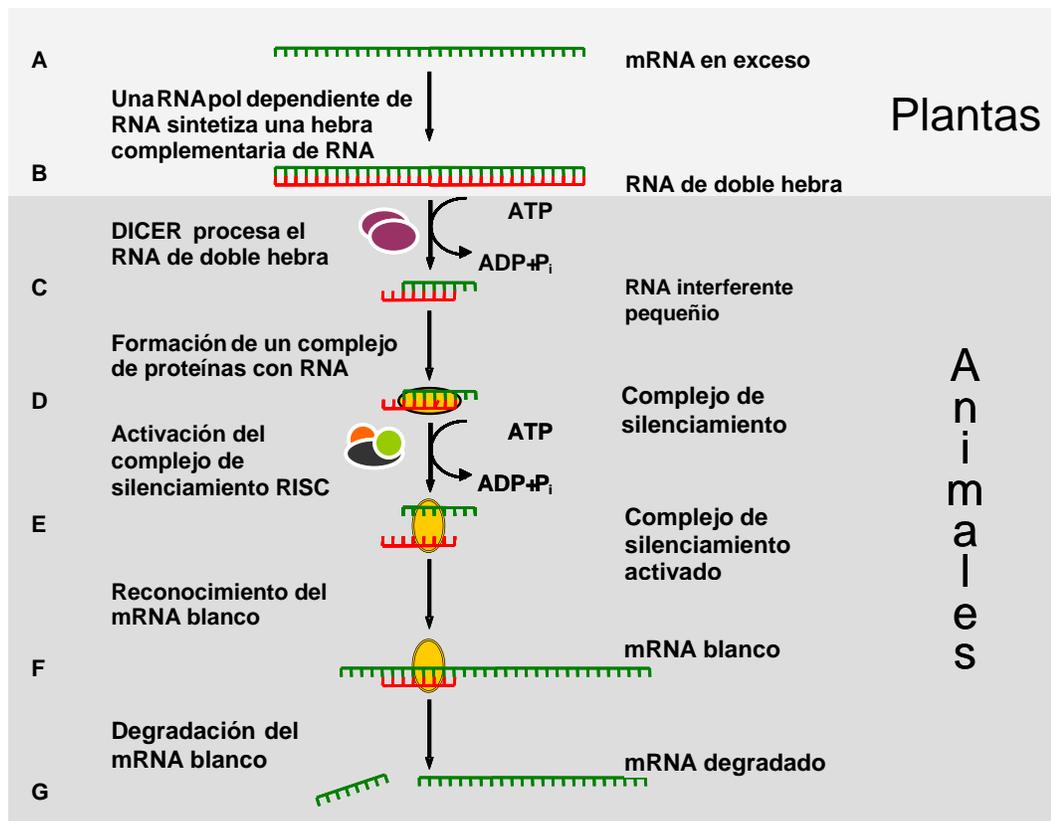
## **1.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO POSTRANSCRIPCIONAL**

En el proceso de desarrollo y diferenciación celular se activan e inhiben una gran cantidad de genes. Se postula que este proceso es consecuencia de cambios en el grado de metilación y acetilación de los promotores que comandan la expresión de los distintos genes (Lewin, 1997), modificando la disponibilidad de las secuencias promotoras para que sean reconocidas por factores de transcripción. Esto determina finalmente que ciertos genes se expresen o no en un momento determinado del

desarrollo. Lamentablemente no sabemos como controlar estas metilaciones y acetilaciones para apagar un gen a voluntad. Hoy conocemos un nuevo mecanismo de control postranscripcional, que permite inhibir la expresión de un gen de manera muy específica: la interferencia por RNAs pequeños.

### **1.5.1 RNAs interferentes pequeños (siRNA)**

La interferencia por RNAs pequeños es un mecanismo natural, propio de las células eucariontes, destinado a inhibir la expresión de genes. Este fenómeno fue inicialmente observado en plantas cuando se realizaban experimentos para incrementar el color violeta de las petunias (Napoli y *cols.*, 1990). Al sobreexpresar bajo el control de un promotor fuerte el gen que codifica para el pigmento, encontraron que las plantas, al contrario de lo que se esperaba, adquirirían un fenotipo variegado e incluso blanco. Se bautizó el fenómeno como “cosupresión”, debido a que ambos genes, el endógeno y el sobre expresado, fueron silenciados. Posteriormente, se describieron inhibiciones similares en gusanos (Fire y *cols.*, 1998; Montgomery y *cols.*, 1998), insectos (Hammond y *cols.*, 2000) y mamíferos (Harborth y *cols.*, 2001; Paddison y *cols.*, 2002). En plantas, la interferencia por RNAs pequeños comienza con la formación de un RNA de doble hebra (dsRNA) el cual es procesado por la enzima Dicer en fragmentos cortos de 21 pb, los cuales guían a un complejo proteico de silenciamiento (RISC) para producir la degradación específica de RNAs que tengan complementariedad de base con ellos (Figura 2).



**Figura 2: Mecanismo de silenciamiento por RNA interferente pequeño**

En plantas, la producción de mRNA en exceso (A) es detectada por la célula activando una RNA polimerasa dependiente de RNA que sintetiza una hebra complementaria (B). En todas las especies, un RNA de doble hebra es procesado por la enzima Dicer liberando RNAs de doble hebra de 21 nt (C). Estos RNA pequeños son incorporados al complejo de silenciamiento *RISC* (D) que al activarse (E) puede reconocer RNAs que tengan complementariedad de bases con el RNA guía (F) produciendo el corte de un RNA complementario (G), impidiendo que se traduzca dicho mRNA.

### 1.5.2 Interferencia por RNAs pequeños en células animales

La primera demostración de la relevancia fisiológica de este mecanismo de control genético postranscripcional proviene de las investigaciones de Fire y cols. (1998), quienes inyectaron directamente en el intestino del gusano *Caenorhabditis elegans* una mezcla de RNAs sentido y antisentido, complementarios entre sí y con el mensajero de un gen blanco, logrando inhibir la expresión de este último. Posteriormente Kamath y cols. (2000) inhibieron la expresión de un gen en *C. elegans* alimentándolos con bacterias que expresaban una horquilla de RNA con una secuencia complementaria al gen blanco.

Estudios en *Drosophila melanogaster* han sido de utilidad para dilucidar los mecanismos involucrados en este fenómeno. Tuschl y cols. (1999) demostraron en un lisado de células embrionarias de *D. melanogaster*, que la presencia de un RNA de doble hebra (dsRNA), y no la presencia de un RNA sentido o antisentido, inhibe específicamente la expresión de un gen cuyo mRNA tiene complementariedad de secuencia con la doble hebra de RNA. Posteriormente, Zamore y cols. (2000) demostraron que el dsRNA es cortado en fragmentos de 21-23 pb (siRNA) en un proceso que requiere ATP, pero no del RNA blanco. También descubrieron que el RNA blanco sólo es cortado en la zona de complementariedad con los siRNAs; sugiriendo que este último es utilizado como guía en el proceso de corte del mRNA (Hammond y cols., 2000).

La interferencia por RNAs pequeños también ocurre en células de mamíferos superiores. Los primeros informes corresponden a experimentos en células de rata que fueron transfectadas con RNAs de doble hebra de aproximadamente 500 pb (Billy y cols., 2001). Inhibiciones equivalentes se producen cuando las células son transfectadas con un gen que codifica una horquilla de RNA de similares dimensiones (Paddison y cols., 2002; Svodoba y cols., 2001). Sin embargo, no hace falta tener un RNA de doble hebra muy largo para lograr el silenciamiento de un gen, puesto que RNAs de 21 a 27 pb son suficientes para silenciar un gen reportero (Caplen y cols., 2001). Hoy sabemos que las células humanas también experimentan este tipo de inhibición postranscriptional específica sin afectar la expresión de otros genes (Elbashir y cols., 2001; Harborth y cols., 2001). Actualmente, los RNAs interferentes pequeños son una herramienta utilizada para producir una inhibición muy específica de ciertos genes, ejemplo de ello es su uso como estrategia antiviral contra el virus de la hepatitis C y el VIH entre otros (Arbuthnot y cols., 2007; Li y cols., 2006b; Rossi, 2006; Scherer y cols., 2007 y Watanabe y cols., 2007).

### **1.5.3 Diseño racional de siRNAs**

La inhibición de la expresión de un gen en plantas o en animales inferiores puede lograrse con la introducción de un RNA de doble hebra largo o de un gen que se transcriba originando un RNA de doble hebra largo (complementario al mensajero que se desea degradar) el cual es procesado por Dicer liberando cientos de siRNAs distintos. Con este tipo de aproximación cada siRNA formado puede, en teoría, ser incorporado en un complejo de silenciamiento y la inhibición final será la suma de las inhibiciones parciales de cada uno de los siRNAs generados. Los animales superiores

poseen mecanismos antivirales que, en presencia de algunos RNAs de doble hebra de más de 60 pares de bases de largo, inhiben la transcripción de genes por activación de la proteína quinasa R (Robertson y Mathews, 1996) y activan la degradación inespecífica del RNA por acción de la RNAsa-L (Minks y cols., 1979), lo que resulta en muerte celular por activación de la vía del interferón. Para evitar la activación de esta vía pueden utilizarse RNAs más cortos que 60 nt, ya sea como una batería de siRNAs (RNAs de 21 nt) sintetizados *in vitro* o con un siRNA, que sea capaz de inhibir la expresión del gen blanco en magnitud suficiente para producir un cambio fenotípico.

En los últimos 5 años se han realizado esfuerzos por establecer criterios que faciliten el diseño de siRNA eficientes contra un mRNA blanco. En el año 2002, Elbashir y cols. diseñaron siRNAs basándose en 6 criterios para elegir una secuencia blanco (Tabla 1). Estos criterios están orientados a seleccionar secuencias que se encuentren presente en el mRNA maduro evitando, en la medida de lo posible, las regiones que suelen estar más escondidas por estar asociadas a proteínas.

Posteriormente, Reynolds y cols. (2004) cuantificaron la eficiencia de 180 siRNAs sobre 2 genes (90 siRNAs en cada gen). Se analizó la eficiencia de los siRNAs de acuerdo a distintos parámetros y finalmente se establecieron 8 criterios que afectan la eficiencia de los siRNAs; estos criterios se condensaron en un algoritmo (Tabla 2) que fue probado prospectivamente en otros 6 genes, estableciéndose que una secuencia con un puntaje igual o mayor a 6 tiene más de un 90% de probabilidad de inhibir más del 50% la expresión del gen de interés.

**Tabla 1: Criterios utilizados por Elbashir y *co/s.* para diseñar siRNAs**

<b>Criterio</b>	<b>Justificación</b>
Elegir una secuencia ubicada 50 a 100 nt río abajo del codón de inicio.	Las secuencias cercanas al codón de inicio suelen tener secuencias de unión a proteína.
Evitar las regiones 5' y 3' no traducidas.	Estas regiones suelen ser ricas en secuencias de unión para proteínas reguladoras.
Prescindir de las secuencias intrónicas	Los RNAs parcialmente procesados son retenidos en el núcleo
Preferir secuencias que tengan la estructura general AA(N <sub>19</sub> )UU	Esto permite que los siRNA sean sintetizados con 2 timinas en el extremo 3', lo que les brinda una mayor resistencia a la degradación por exonucleasas.
Preferir secuencias que tengan una composición de G/C cercana al 50%	Las secuencias con gran contenido de G/C suelen ser muy estructuradas
Preferir secuencias que comiencen con G.	Esto facilita la síntesis de RNAs a partir de promotores reconocidos por la RNA polimerasa III.

Estos criterios tienen por objetivo elegir secuencias del mRNA maduro y que tengan pocas posibilidades de estar bloqueadas con proteínas que se asocien al RNA (Elbashir y *co/s.* 2002).

**Tabla 2: Algoritmo empírico de Reynolds y cols. para diseñar siRNAs**

<b>Criterio</b>	<b>Puntaje</b>
Porcentaje de G/C 30-52%	1
A ó U entre las posiciones 15 y 19	Máximo 5 (1 punto c/ nucleótido)
Secuencias repetidas	1
A en la posición 3	1
U en la posición 10	1
A en la posición 19	1
G en la posición 13	-1
C ó G en la posición 19	-1

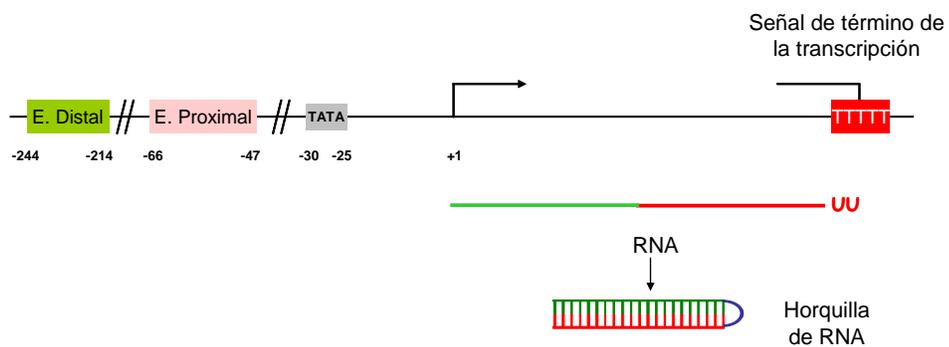
Criterios propuestos para predecir la eficiencia de un siRNA. Estos deben ser aplicados a la secuencia de la hebra sentido del siRNA. Si el puntaje obtenido por el siRNA es igual o mayor a 6 dicho siRNA tiene más de un 90% de probabilidad de inhibir en más de 50% la expresión del gen blanco (Reynolds y cols., 2004).

## **1.6 SÍNTESIS ENDÓGENA DE HORQUILLAS DE RNA (shRNAS)**

Para una aplicación terapéutica es posible construir un gen que sintetice en la célula un RNA que se pliegue sobre sí mismo para formar una horquilla (cuyo tallo constituye el RNA de doble hebra), alternativamente se pueden construir dos genes independientes, cuyos RNAs sean complementarios el uno con el otro, de modo que al asociarse en la célula origine un siRNA. Al comienzo de esta tesis, en el año 2002, Brummelkamp y *cols.* publicaron sobre la inhibición de un gen mediante la expresión de una horquilla de RNA en células humanas MCF-7. Esta horquilla, sintetizada por la RNA polimerasa III bajo el control del promotor del RNA U6 humano, expresa un RNA carente de Cap y poli A, produciendo una molécula muy similar a un RNA de doble hebra que puede ser sustrato de Dicer y liberar un siRNA.

## **1.7 PROMOTORES RECONOCIDOS POR LA RNA POLIMERASA III**

La RNA polimerasa III transcribe normalmente RNAs cortos, no traducidos como los RNAs 7SK, 7SL, M, U6, H1, tRNAs y RNAs de 4,5 y 5S, que participan en distintos procesos celulares como la traducción, el corte y empalme del RNA y la edición del RNA. Los RNAs transcritos por la RNA polimerasa III carecen de la estructura del Cap y del poli A característicos de los transcritos de la RNA polimerasa II. Esta polimerasa reconoce tres tipos de promotores (I, II, III). Los promotores de tipo III (Figura 3), entre los que se incluyen los promotores de los RNAs U6, H1 y 7SK, poseen todos los elementos necesarios y suficientes para promover la transcripción de los genes (secuencias promotoras y potenciadoras) dentro de las primeras 300 pb río arriba del



**Figura 3: Esquema general de un promotor de tipo III de la RNA polimerasa III.**

En verde y rosado se esquematizan los elementos distal y proximal del promotor respectivamente y en gris la caja TATA. El sitio de inicio de la transcripción se denota con una flecha (+1) y en rojo se esquematiza la señal de término de la transcripción (TTTTT). Este tipo de promotor sintetiza RNAs pequeños carentes de Cap y poli A; se utilizará para sintetizar un RNA que se plegará formando una horquilla.

sitio de inicio de la transcripción (Baer y *cols.*, 1990; Hannon y *cols.*, 1991; Murphy y *cols.*, 1987 y Myslinski y *cols.*, 2001). Adicionalmente la RNA polimerasa III reconoce una secuencia de cuatro o más timinas seguidas como una potente señal de término de la transcripción, la cual sólo es ignorada cuando está precedida por 2 o más adeninas. Mutaciones que originan secuencias de 4 o más timinas seguidas dentro de los genes transcritos por la RNA polimerasa III producen el término prematuro de su transcripción (Geiduschek y Tocchini-Valentini, 1988 y Paule y White, 2000).

Estas características únicas de la RNA polimerasa III son muy favorables para sintetizar RNAs que posean semejanza estructural con los siRNAs y que pueden ser utilizados por la maquinaria celular para participar en el proceso de silenciamiento. En esta tesis se utilizará este tipo de promotor para construir un gen que exprese una horquilla de RNA para interferir la expresión del gen de la ALDH2 y disminuir la actividad celular de la ALDH2. Dicho gen puede ser introducido a células de manera muy eficiente utilizando un vector viral que los porte.

## **1.8 VECTORES VIRALES**

Los genes deseados pueden ser introducidos a células utilizando métodos de entrega no virales, que neutralizan las cargas negativas del DNA, como liposomas (lipofectamina), dendrímeros o polisacáridos (quitosano) o por métodos virales que lo encapsidan como adenovirus, virus adenoasociado o lentivirus. Los virus poseen una serie de características que les permiten expresar eficientemente su información genética en las células huésped. El reemplazo de los genes nocivos por genes terapéuticos permite utilizar los virus como vehículos para introducir dichos genes a

células blanco. Entre los virus más estudiados se encuentran los adenovirus, estos presentan una serie de ventajas: no están asociados a enfermedades graves en el humano (sólo al resfriado común), no integran su DNA al genoma del huésped por lo que no pueden producir mutaciones por interrupción de genes del huésped, se mantienen episomales de modo que su efecto se va diluyendo con las sucesivas divisiones celulares. Sin embargo, en tejidos con una baja tasa de proliferación, como es el hígado, su expresión se mantiene por mayor tiempo (Gómez-Foix y cols., 1992). Los primeros vectores adenovirales utilizados carecían del gen E1, un factor de transcripción que se expresa en las primeras etapas de la infección viral (Becker y cols., 1994), y en su lugar se incorpora el gen terapéutico. Experimentos *in vitro* demostraron que son muy eficientes en producir la expresión de un gen reportero. Sin embargo, su utilización *in vivo* está limitada debido a su gran inmunogenicidad (Morsy y Caskey, 1999), produciendo efectos transitorios cortos (3 a 6 semanas) como consecuencia de que las células infectadas son destruidas rápidamente por el sistema inmune del huésped. Esto se debe a que el resto de los genes virales poseen una transcripción basal que es suficiente para que el huésped monte una respuesta inmune contra las proteínas virales. Además, durante el desarrollo de esta tesis se ha reportado que el RNA VA I de los adenovirus, codificado por los vectores adenovirales de 1<sup>ra</sup> generación, bloquea la actividad de exportina 5 y de Dicer, bloqueando el proceso de interferencia (Andersson y cols., 2005; Lu y Cullen, 2004), resultados que se contraponen a publicaciones en las que se han utilizado con éxito este tipo de vectores para producir interferencia (Chen y cols., 2006; Carmona y cols., 2006; Ro y cols., 2005; Krom y cols., 2006).

## 1.9 RECAPITULACIÓN Y PROPUESTA EXPERIMENTAL

Una variante alélica de la *ALDH2* (*ALDH2\*2*), existente en algunos individuos de la población asiática, tiene un marcado efecto protector del alcoholismo. El disulfiram, una prodroga cuyo metabolito activo se une covalentemente a los grupos sulfidrilos de distintas enzimas, inhibe varias deshidrogenasas aldehídicas incluyendo la *ALDH2*, emulando el fenotipo asiático cuando los pacientes beben alcohol. Además de su baja especificidad, el disulfiram debe ser ingerido diariamente, régimen que no es seguido por los pacientes dependientes al alcohol. Estudios en el laboratorio donde se realizó esta tesis se han orientado a generar fármacos génicos de larga duración y alta especificidad que, de manera análoga a la variante *ALDH2\*2* asiática, disminuyan específicamente la actividad de la *ALDH2* en el hígado.

En estudios anteriores de “prueba del principio”, la reducción de la actividad celular de la *ALDH2* por la administración de un gen de antisentido contra la *ALDH2*, llevó a una marcada disminución en el consumo de alcohol en ratas alcohólicas. Esta metodología reduce la actividad celular de la *ALDH2* más específicamente que el disulfiram, sin embargo, esta estrategia no fue diseñada para tener una alta especificidad respecto de los mensajeros de otras deshidrogenasas aldehídicas celulares, cuyos genes tienen gran identidad nucleotídica entre ellos.

Con posterioridad al inicio de los estudios con moléculas y genes de antisentido se describió un nuevo mecanismo de silenciamiento génico que es altamente específico: el RNA de interferencia. Actualmente existen algoritmos que se han propuesto que permitirían diseñar siRNAs eficientes y construir genes que codifiquen horquillas de RNA que sean procesadas originando siRNAs. La actividad anti *ALDH2* de estos genes

debe ser demostrada antes de construir un vector adenoviral con el fin de combinar una expresión prolongada y específica del sistema de interferencia de RNA con la especificidad y eficiencia que poseen los adenovirus para infectar mayoritariamente las células del hígado. Para ello se propone proceder en tres etapas (i) diseñar siRNAs y probarlas en células HEK-293 (ii) construir, y probar en células HEK-293, el gen de una horquilla de RNA (shRNA) precursora de un siRNA activo y, (iii) incorporar el gen de dicho shRNA en un vector adenoviral para luego probarlo en células de rata en cultivo.

## **2 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

*El uso de los algoritmos existentes son útiles para el diseño racional de siRNAs y de genes que expresen moléculas precursoras de siRNAs (shRNA) lo que permite reducir la actividad celular de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial de rata a niveles potencialmente terapéuticos.*

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

*Diseñar, construir y poner a prueba un mecanismo molecular que permita disminuir la actividad celular de la ALDH2 utilizando la regulación postranscripcional de su expresión génica.*

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar un sistema celular fácilmente transfectable que exprese la ALDH2 de rata y utilizarlo como modelo celular para inhibir la ALDH2 de rata.
2. Utilizando los algoritmos existentes, diseñar y sintetizar siRNAs que tengan complementariedad de secuencia con el mRNA de la ALDH2 de rata y probar su eficiencia para inhibir la actividad enzimática celular.
3. Construir un gen que exprese una horquilla de RNA (shRNA) precursora de un siRNA activo y probar su eficiencia para inhibir la actividad celular de la ALDH2.
4. Construir un vector adenoviral que lleve el gen que codifica el shRNA precursor del siRNA activo y probar su eficiencia para inhibir la actividad celular de la ALDH2.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 CULTIVO CELULAR**

#### **4.1.1 Cultivo de células de riñón de embrión humano HEK-293**

La línea celular HEK-293 (ATCC CRL-1573) se compró a American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU). Se cultivó en medio DMEM Gibco™ (Invitrogen Corporation. Grand Island, NY, EE.UU.) el cual contiene glucosa, L-glutamina, clorhidrato de piridoxina y 110 mg/L de piruvato de sodio, además se suplementó con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma®. St Louis, MO, EE.UU). El medio DMEM se esterilizó mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm (Sartorius. Goettingen, Alemania) y se complementó con 10% de suero fetal de bovino (Hyclone. Logan, UT, EE.UU.). Las células se cultivaron en placas de 35 mm y en botellas de poliestireno de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (Sarsted. Newton, NC, EE.UU.) con 2, 5 y 12 mL de DMEM con suero respectivamente, en un incubador Napco® 6101F-1 (Precision Scientific, inc. Chicago, IL, EE.UU.) a 37°C y una atmósfera con aire y 5% de CO<sub>2</sub> (Indura. Santiago, Chile). Las células se mantuvieron rutinariamente subconfluentes y en ausencia de antibióticos a menos que se indique lo contrario. El medio de cultivo se renovó 2 o más veces por semana.

#### **4.1.2 Cultivo de células de hepatoma de rata H4-II-E-C3**

La línea celular H4-II-E-C3 (ATCC CRL-1600) se compró a American Type Culture Collection. Se cultivó en medio DMEM Gibco™ (Invitrogen) y se suplementó con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma®). El medio DMEM se esterilizó mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm (Sartorius) y se suplementó con 5% de suero fetal de bovino (Hyclone) y 10% de suero de equino (Hyclone. Logan, UT, EE.UU.).

Las células se cultivaron en placas de poliestireno de 35 mm (Falcon®. Becton Dickinson Labware. Franklin Lakes, NJ, EE.UU. ó Corning®. Corning, NY, EE.UU.) y en botellas de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (Sarsted. Newton, NC, EEUU) con 2, 5 y 12 mL de DMEM con suero respectivamente, en un incubador Napco® 6101F-1 (Precision Scientific, Inc. Chicago, IL, EE.UU.) a 37°C y una atmósfera con aire y 5% de CO<sub>2</sub> (Indura. Santiago, Chile). Las células se mantuvieron rutinariamente subconfluentes y en ausencia de antibióticos, a menos que se indique lo contrario. El medio de cultivo se renovó al menos 2 veces por semana. Las células se mantuvieron subconfluentes y se utilizaron hasta el pasaje 30.

#### **4.1.3 Traspaso de cultivos celulares**

Las células se mantuvieron subconfluentes realizando traspasos 1 ó 2 veces por semana (según fuese necesario). Para ello a un frasco de 75 cm<sup>2</sup> se le extrajo la totalidad del medio de cultivo, se les agregó 1 mL de Tripsina-EDTA 1X (Gibco™. Grand Island, NY, EE.UU.) y luego de 2 min a 37°C se le agregó 3 mL de DMEM con suero para neutralizar la enzima. Las células se resuspendieron y se sembró 1/10 del volumen en un botella de 75 cm<sup>2</sup> con 12 mL de medio de cultivo fresco con suero.

## **4.2 EXPERIMENTOS CON siRNAs**

### **4.2.1 Diseño de siRNAs**

Se diseñaron 3 siRNAs contra el mensajero de la ALDH2 de rata. Los siRNAs 1 y 2 se diseñaron en base a la secuencia del mRNA de la ALDH2 aplicando los criterios de Elbashir y *cols.* (2002) ver Tabla 1 (pág. 15). A continuación se realizó un alineamiento con las secuencias blancos de los siRNAs diseñados (siRNA1: AACTTGATCAAGGAG

GCAGGCTT y siRNA2: AACCAGCAGCCCGAGGTCTTCTG) contra todas las secuencias de genes publicadas en GenBank, para descartar que tuvieran identidad nucleotídica con otros genes; ello es importante para reducir la posibilidad de una inhibición inespecífica de otro gen. Cabe destacar que la secuencia blanco del siRNA2 es compartida exclusivamente con el mRNA de la ALDH2 humana.

El siRNA3 (CTGCAACCAGATCTTCATTAA) se diseñó aplicando las reglas de Reynolds y *cols.* (2004) ver Tabla 2 (pág. 16) sobre la secuencia del mensajero de la ALDH2 de rata. Esta secuencia también se analizó por alineamiento para descartar que tuviese identidad nucleotídica con otros genes de rata.

#### **4.2.2 Formación de siRNAs**

Los siRNAs se formaron por apareamiento de dos oligonucleótidos de RNA de 21 mer de largo cada uno. Los dos nucleótidos del extremo 3' de cada hebra corresponden a timinas, las cuales quedan expuestas luego del apareamiento. Los oligonucleótidos se compraron, desalinizados y liofilizados en tubos independientes, a EUROGENTEC (Liege Science Park. Seraing, Bélgica). Se disolvieron a 100 mM en agua tratada con DEPC y las soluciones madres se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El siRNA se formó combinando 1,5 nmoles de cada oligonucleótido en 75  $\mu\text{L}$  de una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y NaCl 100 mM. Esta solución se calentó a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 2 min, se enfrió a  $78^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo durante 5 min. Luego se enfrió a  $65^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo otros 5 min antes de enfriar hasta los  $20^{\circ}\text{C}$ . Todas las transiciones de temperatura se realizaron a una velocidad constante de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en un termociclador

utilizando un programa de apareamiento de hebras. Las soluciones de siRNAs se manipularon en hielo para mantener la asociación entre las hebras.

#### **4.2.3 Transfección de células HEK-293 con siRNA**

Las células HEK-293 se eligieron debido a su gran capacidad para incorporar ácidos nucleicos formando complejo con lipofectamina. Estas células se transfectaron simultáneamente con el plásmido pACCMVpALDH2D, que codifica la enzima ALDH2 de rata, y con las moléculas de RNA (siRNA, hebra sentido y hebra antisentido).

El proceso de transfección comenzó con la tripsinación de las células HEK-293, se contaron en cámara de Neubauer (HBG. Giessen-Luetzellinden, Alemania) y sembraron a razón de  $1,2 \times 10^6$  células por placa de 35 mm (Falcon<sup>®</sup> Becton Dickinson Labware ó Corning<sup>®</sup>) con 2 mL de medio DMEM con suero y sin antibiótico y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h, cuando las células alcanzaron una confluencia de 70-80%, se reemplazó el medio de cultivo por 1 mL de DMEM sin suero y sin antibiótico, luego de 20 min en el incubador, necesario para equilibrar el medio, se transfectaron con el complejo Lipofectamina 2000- ácido nucleico.

Para transfectar una placa de 35 mm se diluyó, en 250 µL de DMEM sin suero y sin antibiótico, 2 µg del plásmido pACCMVpALDH2D y 0,7 µg de RNA (siRNAs, oligonucleótido sentido o antisentido). La dilución se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. En el intertanto, en un tubo aparte, se diluyó 5 µL de Lipofectamina 2000 en 245 µL de DMEM sin suero y sin antibiótico, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones (DNA y Lipofectamina 2000) y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 10 min. El complejo de

DNA-Lipofectamina se adicionó gota a gota a las células en cultivo. Las células se incubaron durante 5 h, en un volumen de 1,5 mL en ausencia de suero. Finalmente se cambió el medio de transfección por 2 mL de DMEM con suero, y se continuó el cultivo de las células a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% por otras 67 h. Las células se cosecharon 72 h postransfección. La Figura 4 esquematiza el proceso de transfección.

#### **4.2.4 Extracto celular crudo para medir la actividad de la ALDH2**

Las células HEK-293 transfectadas con el plásmido pACCMVpALDH2D (codificante de la ALDH2 de rata) se lisaron con 500 µL de una solución de Tritón X-100 1% y EDTA 1 mM. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en una plataforma de agitación orbital durante 10 min para romper todas las células, luego se recuperó el lisado y se guardó a -80°C. Antes de medir la actividad los lisados se descongelaron lentamente, se centrifugaron a 21.000 x g y 4°C durante 10 min. Se rescató el sobrenadante y se utilizó inmediatamente para medir la actividad de la ALDH2. Se utilizaron células no transfectadas para medir la actividad de la ALDH2 endógena.

#### **4.2.5 Medición de la actividad enzimática de la ALDH2**

La actividad de la ALDH2 se midió en un extracto crudo de células HEK-293 transfectadas con un plásmido que codifica para la ALDH2 de rata. Se utilizó entre 200 y 400 µg de proteína total. El medio de reacción constituido por fosfato de sodio 34 mM (pH 8,5), NAD<sup>+</sup> 800 µM, DTT 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 4-metilpirazol 1,4 mM se incubó con la muestra durante 10 min a 35°C hasta que la lectura espectrofotométrica se estabilizó. La reacción se inició con la adición de propionaldehído a 14 µM (debido a que el acetaldehído es muy volátil a temperatura ambiente, ebulle a 21°C versus 50°C



**Figura 4: Curso temporal del proceso de transfección.**

Las células HEK-293 se sembraron a una concentración de  $1,2 \times 10^6$  células por placa de 35 mm, 24 h antes de la transfección. La transfección se realizó en ausencia de suero durante 5 h, luego se renovó el medio DMEM con suero. Las células se incubaron hasta completar 72 h, se lisaron y guardaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

el propionaldehído). La formación de NADH se registró a 340 nm cada 30 seg durante 10 min con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 (Shimadzu. Kyoto, Japón). Los datos se corrigieron de acuerdo a los mg de proteínas en el ensayo. Se graficó la absorbancia versus tiempo y la actividad de la ALDH2 se calculó a partir de la pendiente.

### **4.3 GENES DE shRNA PRECURSORES DEL siRNA2**

#### **4.3.1 Amplificación de promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III**

La secuencia de los promotores de los RNAs H1, U6 y 7SK humanos se obtuvo de la base de datos del NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>). Estos RNAs son transcritos por la RNA polimerasa III (Myslinski y *cols.*, 2001; Murphy y *cols.*, 1987; Reddy, 1988) y se escogieron porque sus secuencias promotoras están ubicadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción (códigos de acceso GenBank X16612, X59362 y X05490, respectivamente). Con estas secuencias se sintetizaron partidores específicos, los que se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores de la RNA polimerasa III humanos**

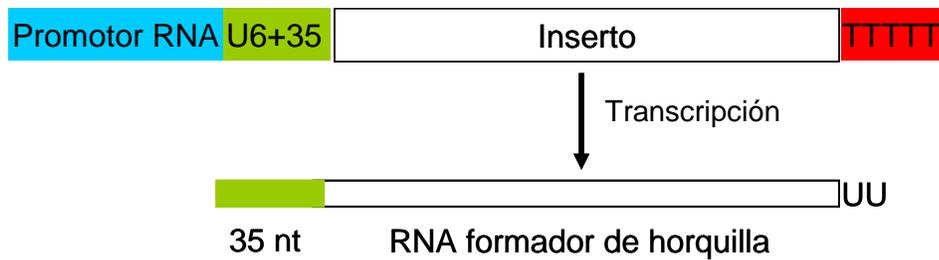
<b>Partidor / Dirección</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>	<b>Amplicón</b>
TG-203 / Directo	TTATAGGGAGCTGAAGGGAA	RNA H1+6
TG-204 / Inverso	<u>CCAAAA</u> CCCTATGGGAAAGAGTGGTC	RNA H1+6
TG-205 / Directo	AAGGTCGGGCAGGAAGAGG	RNA U6+6 y +35
TG-206 / Inverso	<u>CCAAAA</u> CAGAATGGTGTTCGTCCTTTCCACA	RNA U6+6
TG-207 / Inverso	<u>CCAAAA</u> CCCAATGGTAGTATATGTGCTGCCGAAG	RNA U6+35
TG-208 / Directo	CTGCAGTATTTAGCATGCCC	RNA 7SK+7
TG-209 / Inverso	<u>CCAAAA</u> CACATTGGAGGTACCCAGGCGGCGC	RNA 7SK+7

Los oligonucleótidos inversos TG-204, TG-206, TG-207 y TG-209, poseen la secuencia de restricción de la enzima *Xcm* I (CCANNNNN/NNNNTGG). Los amplicones se nombraron de acuerdo al RNA que transcribe el promotor más un número que indica la cantidad de nucleótidos presentes entre el 1<sup>er</sup> nucleótido transcrito y el sitio de corte de *Xcm* I. (*vide infra*).

Los partidores inversos se diseñaron con una secuencia de restricción de 15 nt en el extremo 5', que es reconocida por la enzima *Xcm* I (CCANNNNN/NNNNTGG). El sitio de restricción se diseñó con 5 adeninas consecutivas (CCAAAAAN/NNNNTGG), de modo que el amplicón obtenido con este partidor incorpora, río abajo del sitio de corte de *Xcm* I, la secuencia "TTTTT" que es reconocida por la RNA polimerasa III como señal de término de la transcripción. Esta estrategia permite expresar un fragmento de DNA que no tenga la señal de término de la transcripción.

Los promotores clonados se nombraron de acuerdo al RNA que transcriben naturalmente, seguidos de un número que indica la cantidad de nucleótidos existentes entre el primer nucleótido transcrito y el sitio de corte de la enzima *Xcm* I. Estos corresponden a nucleótidos del RNA natural y del sitio de restricción, los que finalmente se ubican en el extremo 5' del RNA transcrito (Figura 5).

Los promotores se amplificaron a partir de gDNA de células de hepatoma humano (HepG2) en presencia de  $MgCl_2$  2,4 mM, dNTPs 0,2 mM, partidores cada uno a 2  $\mu$ M, polimerasa de DNA *Taq* 0,04 U/ $\mu$ L y gDNA 2,72 ng/ $\mu$ L. El programa de amplificación de 30 ciclos incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, un apareamiento de 15 seg a 58°C y una elongación de 30 seg a 72°C. Cada promotor se amplificó en un volumen total de 150  $\mu$ L (6 tubos con 25  $\mu$ L cada uno).



**Figura 5: Esquema de un RNA formador de horquilla transcrito por la RNA polimerasa III a partir del promotor del RNA U6+35**

En celeste se representa el promotor del RNA U6, en verde los nucleótidos que se transcriben antes de la secuencia del RNA formador de horquilla, en blanco se grafican los nucleótidos codificante del RNA formador de horquilla y en rojo la señal de término de la transcripción. El RNA transcrito posee los 35 nt iniciales en el extremo 5' y 2 uridinas finales en el extremo 3', las que corresponden a los nucleótidos con que termina la transcripción.

#### **4.3.2 Purificación de amplicones de los promotores humanos**

Los amplicones se precipitaron por centrifugación a 21.000 x *g* en presencia de etanol y acetato de sodio (Sambrook y *co/s.*, 1989). El precipitado se lavó con 200  $\mu$ L de etanol al 70% para eliminar el exceso de sal, y se secó con vacío 10 min. Cada amplicón se resuspendió en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

El amplicón de interés se separó de los productos inespecíficos de la reacción en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X. Luego de la electroforesis se cortó el trozo de agarosa que contenía la banda del tamaño adecuado para cada promotor amplificado (H1+6 387 pb; 7SK+7 258 pb; U6+6 278 pb y RNA U6+35 307 pb) procurando arrastrar la menor cantidad de agarosa, para facilitar la purificación del DNA. La agarosa que contiene el fragmento de interés se guardó a -20°C hasta el momento de su utilización.

El DNA se purificó con el sistema comercial GeneClean<sup>®</sup>III (Bio 101. Carlsbad, CA, EE.UU.). La agarosa se calentó 10 min a 60°C para disolverla, a continuación se agregaron 300  $\mu$ L de NaI (aproximadamente 3 veces el volumen de agarosa) y se mantuvo a 60°C otros 10 min para disolver completamente la agarosa. Luego se agregó 3  $\mu$ L de sílica (“Glass Milk”) y se mezcló por inversión suave a temperatura ambiente durante 15 min. La sílica se decantó por centrifugación a 21.000 x *g* (1 min). Se descartó el sobrenadante y la sílica se lavó 3 veces con 500  $\mu$ L de la solución de lavado del sistema comercial. La sílica se secó con vacío en desecador durante 10 min. El DNA se eluyó incubando la sílica con 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O 2 veces. Los amplicones purificados se utilizaron directamente en las reacciones de ligación.

#### **4.3.3 Clonamiento de promotores tipo III de la RNA polimerasa III humana y transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$**

Los amplicones purificados se ligaron directamente al plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega Corporation. Madison, WI, EE.UU.). Esto es posible porque en la reacción de amplificación con la polimerasa de DNA *Taq* un porcentaje de los amplicones poseen una adenina 3' protuberante, la cual aparee con la timina 3' no apareada presente en el plásmido pGEM-T Easy.

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ L utilizando 50 ng de amplicón purificado y 50 ng de plásmido (relación molar inserto:vector de 10:1) y 3 U de ligasa (Fermentas. Ontario, Canada). La mezcla de ligación se incubó a 4<sup>o</sup>C durante 18 h. Las células bacterianas *E. coli* DH5 $\alpha$ , competentes con el método del CaCl<sub>2</sub>, se incubaron con 2  $\mu$ L de mezcla de ligación durante 30 min en hielo, a continuación se les dió un golpe térmico a 42<sup>o</sup>C durante 2 min, luego se recuperaron en 1 mL de LB sin antibiótico a 37<sup>o</sup>C en un agitador de bacterias a 200 RPM durante 1 h. Finalmente se sembraron las células en placas de agar ampicilina (50  $\mu$ g/mL) y se cultivaron a 37<sup>o</sup>C durante 16 h para obtener colonias.

La identificación de las células que incorporaron el inserto se realizó mediante PCR con los partidores descritos en la Tabla 3 (*vide supra*, pág. 31).

#### **4.3.4 Funcionalidad de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa III**

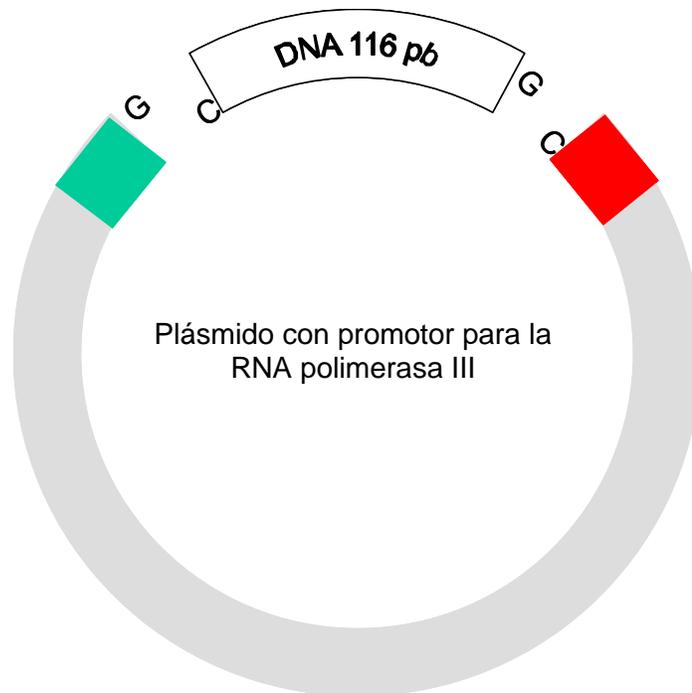
Los promotores clonados tienen un sitio de restricción *Xcm* I ubicado río abajo del inicio de la transcripción. Este sitio de restricción se diseñó para dejar una guanina 3' desapareada en el extremo del promotor y una citosina 3' desapareada en el extremo

próximo a la señal de término de la transcripción (Figura 6), lo que permite dar dirección a la ligación.

Para determinar la funcionalidad de los promotores se ligó a estos un DNA de 116 pb (inserto \*), el que se transcribirá sólo si el promotor es reconocido por la maquinaria celular. La ligación se realizó con 100 ng de vector (el que contiene el promotor y la señal de término de la transcripción) en una relación molar 5:1 de inserto a vector, utilizando 10 U de ligasa de DNA de fago T4 (Fermentas) en 10 µL de reacción. Las células bacterianas *E. coli* DH5α se transformaron con 2 µL de ligación y se seleccionaron en placa de agar ampicilina 100 µg/mL. La identificación de las colonias que poseen el inserto se realizó mediante PCR. Para las colonias que poseen el promotor U6+35 se utilizaron los partidores TG-18 (GTTTTCCCAGTCACGAC, se une al vector) y TG-28 (CTGCAGAGCTTGGGACAGG, se une al inserto); mientras que para las colonias que poseen los promotores U6+6 y 7SK+7, se utilizaron los partidores TG-19 (CAGGAAACAGCTATGAC, se ancla en el vector) y TG-28.

---

(\*) El hecho que este fragmento reportero haya sido generado utilizando la ALDH2 como base, no es relevante ya que sólo se utilizó para determinar si los promotores son funcionales. El inserto se obtuvo por digestión con *Xcm*I de un amplicón de la ALDH2 generado con los partidores TG-27 (ACTCAGTTTAAGAAGATCCTGG) y TG-33 (CACTTCCGTGTAGGCCTGC) sobre un plásmido que tiene clonado el cDNA de la ALDH2 de rata (pNS19ALDH2). Se utilizó este inserto debido a que existe en el laboratorio diversos partidores que permitían su amplificación y a que la digestión con *Xcm*I originaba los extremos adecuados.



**Figura 6: Esquema de ligación de un inserto reportero.**

Se ligó río abajo de la secuencia promotora (verde) una secuencia de 116 pb que se utilizará como reportero de la transcripción (blanco). El inserto se generó mediante PCR y posterior digestión con *Xcm* I del amplicón. La identidad de los nucleótidos no apareados, resultantes del corte con *Xcm* I, sólo permite la ligación en una orientación. El promotor y la señal de término de la transcripción (T<sub>5</sub>, representada por una caja roja), reconocido por la RNA polimerasa III, son aportados por el plásmido (gris).

#### **4.3.5 Detección de un RNA de 116 nt expresado bajo el control de promotores humanos en células HEK-293 y H4-II-E-C3**

La detección de un RNA expresado bajo el control de distintos promotores se realizó mediante RT-PCR. A partir de una placa de 35 mm confluyente, que contiene células transfectadas con las distintas construcciones, se extrajo RNA total utilizando 1 mL de TRIzol® (Invitrogen Corporation. Carlsbad, CA, EE.UU.) y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se digirió 1,2 µg de RNA total con 5 U de DNAsa RQ1 a 37°C durante 90 min (volumen final de 10 µL). A continuación se agregó 1 µL de solución de detención y se incubó a 65°C durante 10 min.

La transcripción inversa se realizó a 42°C a partir de 0,6 µg de RNA tratado con DNAsa RQ1, 31 pmol de partidor TG-249 (CGGGCTGGCTGCCGCTGTCTT) y 240 U de M-MLV (Promega. Madison, WI, EE.UU.) en 8,6 µL de una solución que contiene dNTPs 0,5 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y DTT 10 mM. La amplificación se realizó a partir de 1,5 µL de transcripción inversa en presencia de MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, dNTPs 0,2 µM, cada partidor a 0,2 µM (TG-249 y TG-250 GGGACTGG GCCCAAACACAT) y la polimerasa de DNA *Taq* a 0,04 U/µL. El programa de amplificación de 35 ciclos incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, un apareamiento de 15 seg a 58°C y una elongación de 30 seg a 72°C.

#### **4.3.6 Construcción de un gen codificante de una horquilla de RNA (shRNA)**

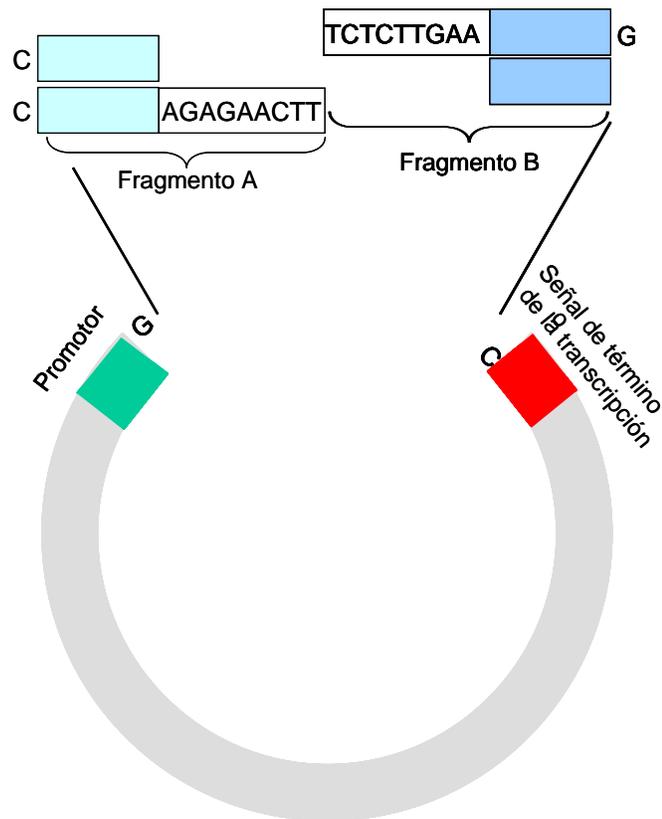
Se ligó río abajo de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa III secuencias diseñadas para codificar horquillas de RNA. Las secuencias codificantes de las horquillas se formaron con dos fragmentos distintos de DNA (fragmentos A y B) los cuales se diseñaron para que sólo puedan ligarse en pares “mixtos” como muestra la

Figura 7. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de 3 horquillas de RNA distintas (shRNAa, b y c) se muestran en la Tabla 4.

Inicialmente se fosforiló 1 ng de cada oligonucleótido que constituyen los fragmentos; ello es necesario ya que los oligonucleótidos sintetizados químicamente carecen del fosfato en el extremo 5'. La ligación se realizó con 16 U de polinucleótido quinasa del fago T4 en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, espermidina 100 µM y EDTA 100 µM (Invitrogen. Corporation. Carlsbad CA, EE.UU) además, el medio se suplementó con rATP 50 µM incubando a 37°C durante 2 h. Los oligonucleótidos se decantaron por centrifugación a 21.000 x g durante 30 min en presencia de acetato de sodio 100 mM y 66% de etanol. Los oligonucleótidos se resuspendieron en 50 µL de una solución de tampón de PCR 1X y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. El apareamiento se realizó en termociclador utilizando el mismo programa con que se aparearon los siRNAs (*vide supra*, pág 25).

#### **4.3.7 Transformación de células *E. coli* DH5α**

Las células *E. coli* DH5α competentes con CaCl<sub>2</sub> se transformaron con plásmidos de tamaño reducido (3~9 kpb). Se transformó 100 µL de células competentes con 10 pg de un plásmido circular o 10 ng de una mezcla de ligación. Las células se incubaron con el DNA durante 30 min en hielo, se les dió un golpe térmico a 42°C durante 2 min y luego se recuperaron en 1 mL de LB sin antibiótico a 37°C en un agitador de bacterias a 200 RPM durante 1 h. Todas las células de la transformación se sembraron en placa



**Figura 7: Construcción de genes codificantes de horquilla de RNA**

Estrategia empleada para construir y ligar a los promotores una secuencia que codifica una horquilla de RNA. Los fragmentos (A y B) se forman por apareamiento, en tubos independientes, de 2 oligonucleótidos cada uno. La secuencia de conexión entre la hebra sentido (celeste) y antisentido (azul), se genera por el apareamiento y ligación de las secuencias en blanco. Se representa la secuencia de la horquilla c (shRNAc).

**Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para formar, por apareamiento, los fragmentos A y B que originan la secuencia codificante de las horquillas de RNA.**

Construcción	Fragmento A	Fragmento B
shRNAa	TG-226→ CAGCAGCCCCGAGGTCTTCCGA GGTCGTCGGGCTCCAGAAGGCTTCTT TG-232←	TG-227→ AGAAGACCTCGGGCTGCTGGC CTGGAGCCCCGACGACC TG-231←
shRNAb	TG-259→ GAAGACCTCGGGCTGCTGG GCTTCTGGAGCCCCGACGACCGCTT TG-258←	TG-258→ CGAACCAGCAGCCCCGAGGTCTTCC GGTCGTCGGGCTCCAGAAG TG-259←
shRNAc	TG-317→ CAGCAGCCCCGAGGTCTTC GGTCGTCGGGCTCCAGAAGAGAGAACTT TG-316←	TG-318→ TCTCTTGAAGAAGACCTCGGGCTGCTGGC CTTCTGGAGCCCCGACGACC TG-165←

Las parejas de oligonucleótidos constituyentes de los fragmentos A y B (Figura 7) se aparearon en reacciones independientes. Los fragmentos A y B ya formados se ligaron al promotor del RNA U6+35. Los fragmentos tienen restricciones geométricas y de secuencia, de modo que sólo es posible la ligación de ambos fragmentos y en una dirección. Las flechas indican la orientación 5'→3' en que están representados los oligonucleótidos.

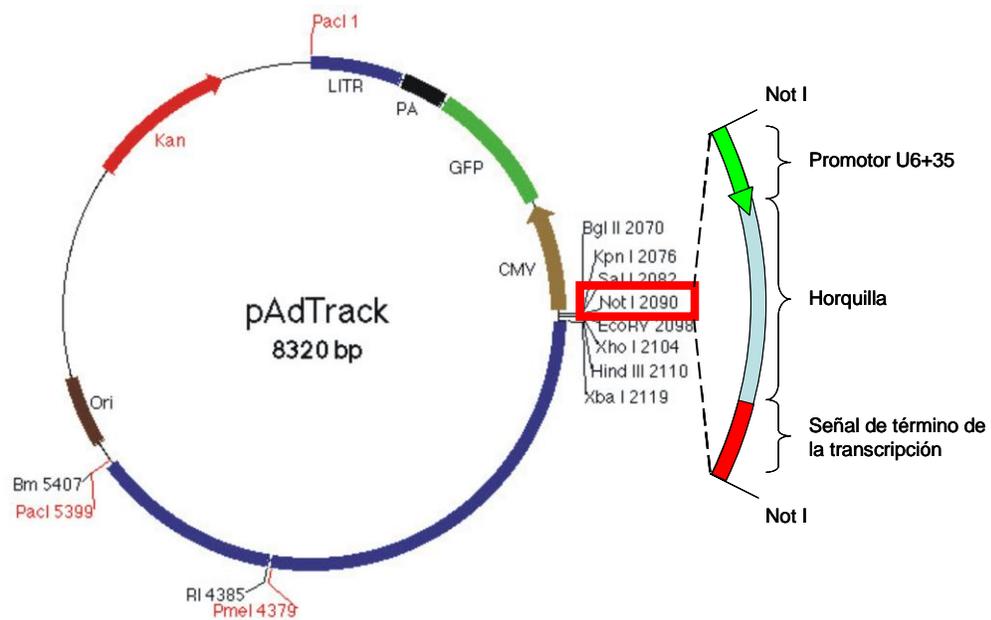
agar/ampicilina (ampicilina 100 µg/mL ó kanamicina 50 µg/mL, según corresponda en cada caso) y se cultivaron a 37°C durante 16 h.

#### **4.4 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES DE 1<sup>ra</sup> GENERACIÓN**

La construcción de los vectores adenovirales se realizó mediante el sistema AdEasy (Stratagene, La Jolla, CA. EE.UU). Este sistema se basa en la recombinación homóloga de dos plásmidos (adenoviral y transportador) para producir el genoma de un vector adenoviral no replicativo de 1<sup>ra</sup> generación. La recombinación se realizó en bacterias *E. coli* DH5α (cepa BJ5183-AD-1, Stratagene) las cuales son muy eficientes en recombinar estos plásmidos. Los vectores adenovirales de 1<sup>ra</sup> generación no se replican en células eucariontes porque carecen de los genes E1 y E3 los que, en el adenovirus silvestre, generan proteínas transactivadoras de la expresión de otros genes virales. Sólo pueden hacerlo en células especiales (HEK-293) en cuyo genoma se han insertado estos genes y aportan las proteínas necesarias en trans.

##### **4.4.1 Traspaso del gen interferente desde el plásmido pGEM-T Easy al plásmido transportador pAdTrack**

El gen interferente (promotor, secuencia codificante y señal de término de la transcripción) se encontraba en el plásmido pGEM-T Easy, el cual posee el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección. El gen interferente se escindió por digestión con la enzima *Not* I y se ligó al plásmido pAdTrack en el sitio *Not* I (Figura 8).



**Figura 8: Ligación del gen interferente al plásmido transportador pAdTrack**

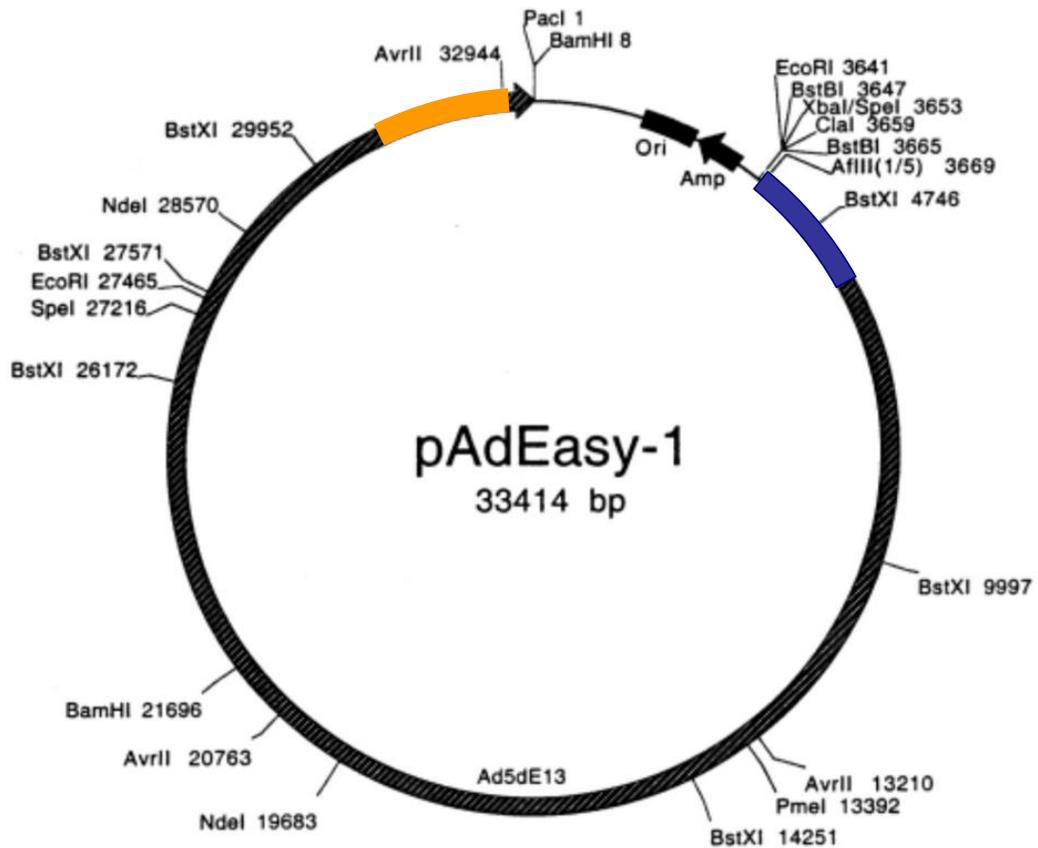
El gen interferente se extrajo por digestión con *Not*I desde el plásmido pshRNAC y se ligó al plásmido pAdTrack digerido con *Not*I. La identificación de las colonias que incorporaron el inserto se realizó por amplificación con partidores que se anclan en el promotor y en la horquilla.

Se ligó 100 ng de pAdTrack con 100 ng de pGEM-T Easy, ambos digeridos con *Not* I, usando 3 U de ligasa del fago T4. Se incubó 16 h a 4°C y se transformó células *E. coli* DH5α con 2 µL de mezcla de ligación. La identificación del plásmido que tiene el gen de la horquilla se realizó mediante PCR de los plásmidos (partidores TG-205 y TG-316) aislados de las colonias resistentes a kanamicina (marcador de selección de pAdTrack).

#### **4.4.2 Producción del genoma adenoviral: recombinación de pAdEasy-1 con pAdTrack**

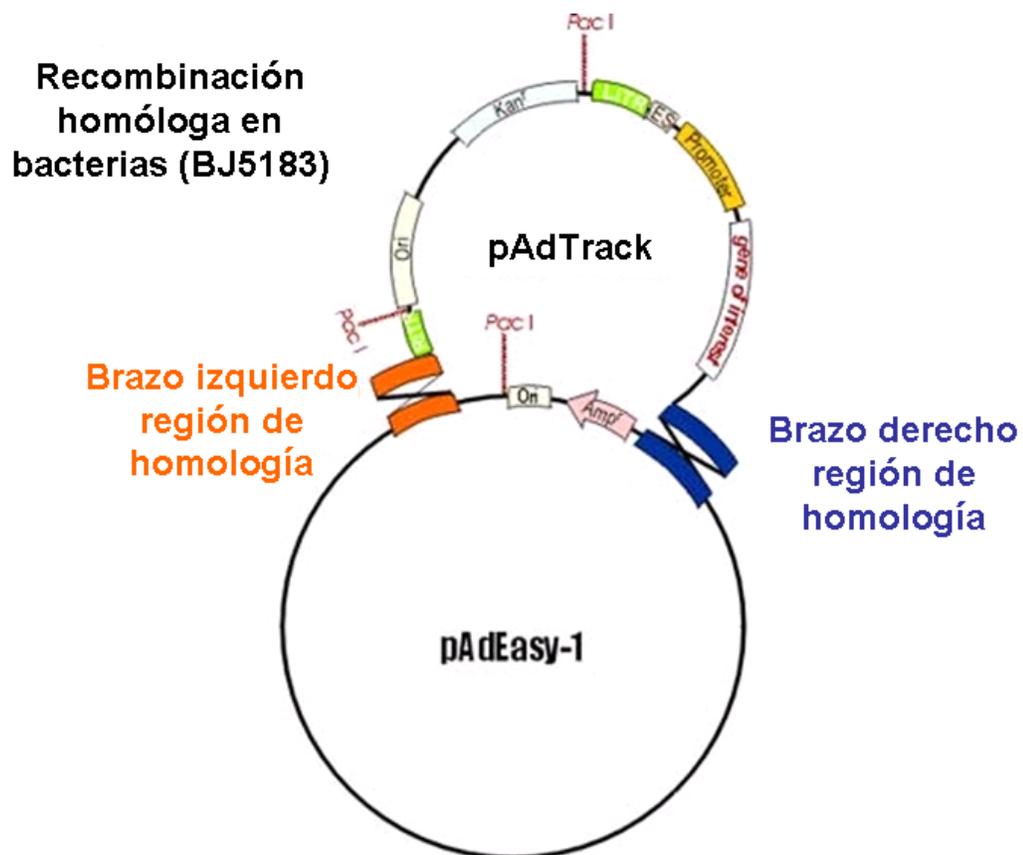
El genoma adenoviral se construyó con el plásmido pAdTrack (Figura 8), que lleva los genes de la eGFP y el shRNAc, y con el plásmido pAdEasy-1 (Figura 9), que lleva los genes virales. Ambos plásmidos al recombinar (Figura 10) en las bacterias *E. coli* DH5α cepa BJ5183-AD-1 generan un nuevo plásmido que posee el genoma de un vector adenoviral.

Se electroporaron 100 µL de bacterias *E. coli* DH5α cepa BJ5183-AD-1, las cuales ya poseen el plásmido pAdEasy-1 (~35 kpb, que confiere resistencia a ampicilina) con 1 µg de pAdTrack (~9 kpb, que confiere resistencia a kanamicina) linearizado con *Pme* I para liberar las zonas de recombinación con pAdEasy-1. El pulso eléctrico de 2500 V se aplicó en cubeta Eppendorf (2 mm de espaciamento entre los electrodos) enfriada en hielo, previo al pulso eléctrico, para evitar que en el proceso de electroporación el aumento de temperatura matara las bacterias. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 mL de LB sin antibiótico, las bacterias se recuperaron a 37°C durante 60 min y sin agitación. Se sembró la totalidad de las bacterias en placas de agar kanamicina (50 µg/mL) y se cultivaron a 37°C durante 16 h.



**Figura 9: Plásmido pAdEasy-1**

Este plásmido posee todos los genes del adenovirus a excepción de E1 y E3, en cuyo lugar se inserta el gen de interés terapéutico. Las zonas en naranja y azul corresponden a secuencias compartidas con el plásmido transportador, necesarias para que ocurra la recombinación.



**Figura 10: Recombinación homóloga del plásmido pAdEasy-1 y pAdTrack**

La recombinación de los plásmidos ocurre en los brazos de homología izquierdo (naranja) y derecho (azul); sin embargo también puede ocurrir entre el origen de replicación (Ori) y el brazo derecho. Ambas recombinaciones son productivas para originar el genoma de un vector adenoviral de 1<sup>ra</sup> generación.

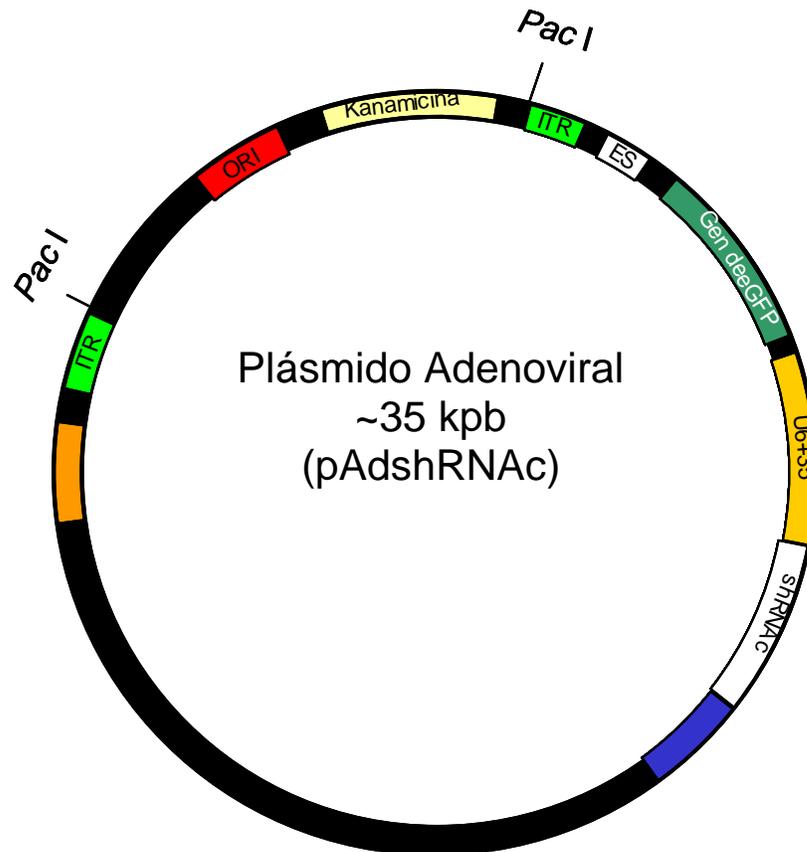
El tamizado del plásmido recombinante (Figura 11) se realizó aplicando los siguientes 3 criterios: i) las colonias deben ser resistentes a kanamicina, ii) el tamaño del plásmido de las colonias debe ser ~35 kpb y iii) la digestión del plásmido con *Pac I* debe dar dos fragmentos, uno de ~32 kpb que corresponde al genoma adenoviral y otro de 3 ó 4,5 kpb, dependiendo de si la recombinación ha tenido lugar en los brazos de homología izquierdo y derecho o entre el origen de replicación y el brazo derecho. Ambas recombinaciones dan origen al genoma del vector adenoviral deseado (He y *cols.*, 1998). Por último, se confirmó la identidad del clon mediante secuenciación.

#### **4.4.3 Producción de vectores adenovirales**

Se transfectaron células HEK-293 con 5 µg de genoma adenoviral recombinante y 10 µL de lipofectamina 2000™ (Invitrogene). El DNA y la lipofectamina se diluyeron en tubos independientes, a 250 µL con DMEM sin suero y sin antibiótico. Se incubaron a temperatura ambiente 10 min, luego se mezclaron e incubaron otros 10 min para formar el complejo DNA-Lipofectamina.

Las células HEK-293 al 70~80% de confluencia en un botella de 25 cm<sup>2</sup> con 4 mL de DMEM sin suero y sin antibiótico, se transfectaron con los 500 µL de complejo DNA-Lipofectamina durante 5 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación se cambió el medio por 5 mL de medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y se continuó la incubación durante 15 días, renovando el medio cada 2 días.

Las células, sin evidencias de efectos citopático, se cosecharon raspando el fondo de la botella con un mezcquino, se recolectaron y se lisaron con 3 ciclos de congelamiento



**Figura 11: Plásmido recombinante que posee el genoma de un vector adenoviral de 1<sup>ra</sup> generación.** Este plásmido codifica la eGFP y el shRNAc bajo el control del promotor del RNA U6. El plásmido se digirió con *Pac I* para exponer los ITR del genoma del vector adenoviral y al mismo tiempo eliminar el marcador de selección (kanamicina) y el origen de replicación.

y descongelamiento (-80°C/37°C). El lisado celular se centrifugó a 21.000 x *g* 10 min. para precipitar los restos celulares. En el siguiente ciclo de amplificación se utilizó 2/3 del lisado total para infectar un botella de 25 cm<sup>2</sup> con células HEK-293 al 70~80% de confluencia. Estas células se incubaron durante 5 días antes de lissarlas. La tercera amplificación se realizó con 2/3 del lisado obtenido para infectar tres botellas de 75 cm<sup>2</sup>, se cultivó durante otros 5 días antes de lissar las células. Finalmente con este último lisado se infectaron 20 botellas de 75 cm<sup>2</sup>, las cuales se cultivaron durante 3 días antes de cosechar los virus.

#### **4.4.4 Purificación de los vectores adenovirales**

Células HEK-293 infectadas con vectores adenovirales, provenientes de 20 botellas de 75 cm<sup>2</sup>, se soltaron raspando las botellas con un mezuquino. Las células se decantaron por centrifugación a 9000 x *g* durante 5 min, se lavaron con 8 mL de PBS, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 8 mL de PBS. Las células resuspendidas se sometieron a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-80°C/37°C) para lissarlas y liberar las partículas virales. Los virus se purificaron en una gradiente discontinua de CsCl (Invitrogen). La totalidad del lisado celular (8 mL) se cargó en un tubo de polialómero (Beckman. Palo Alto, CA, EEUU) el cual contenía la gradiente establecida previamente con 3 mL y 4 mL de CsCl 1,2 g/mL y 1,4 g/mL, respectivamente. La gradiente se centrifugó a 100.000 x *g* y 4°C durante 90 min en centrífuga semiultra Beckman modelo Avanti J-301 con un rotor de ángulo batiente (JS-24). Los vectores adenovirales correctamente empaquetados tienen una densidad mayor que los virus vacíos, evidenciándose 2 bandas en los tubos luego de la separación por densidad. Los vectores virales más densos se recuperaron por

aspiración con una micropipeta, se alicuotaron en fracciones de 100 µL en tampón Tris-HCl 5 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM, seroalbumina de bovino 0,05% y glicerol 25% y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **4.4.5 Cuantificación de vectores adenovirales**

Los vectores adenovirales se cuantificaron espectrofotométricamente en función de la cantidad de DNA. Para ello, una fracción de los vectores recién purificados por gradiente de cloruro de cesio, se lisaron con una solución de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), SDS al 0,1% y EDTA 1 mM. Los virus se incubaron 10 min a 56°C para desarmar las cápsides virales y exponer el DNA viral. Finalmente se cuantificaron 3 diluciones (1/25, 1/50 y 1/100) a 260 nm (Mittereder y *cols.*, 1996). La concentración viral se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Partículas virales/mL} = A_{260} \times 50 \times 10^{12}$$

#### **4.4.6 Infección de células H4-II-E-C3 con vectores adenovirales y medición de la ALDH2**

Se sembraron  $1,2 \times 10^6$  células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 en una placa de 35 mm que contenía 2 mL de medio DMEM con suero. Luego de 24 h de incubación a 5% CO<sub>2</sub> y 37°C, cuando las placas se encuentran aproximadamente al 50% de confluencia, se infectaron con distintas dosis virales según se indique. La incubación a 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C se extendió por otras 96 h luego de lo cual se lisaron las células y se midió la actividad de la ALDH2 como se describió en la sección 4.2.5 (pág. 30).

#### **4.4.7 Extracción de RNA total**

Las células H4-II-E-C3 se infectaron con distintas dosis del vector adenoviral que codifica el shRNAc (AdV-shRNAc) y del vector adenoviral que sólo tiene el promotor (AdV-Control). La preparación del RNA se realizó 96 h postransducción. Una placa de 35 mm (aprox.  $4 \times 10^6$  células) se procesó con 1 mL de TRIzol (Invitrogen). El homogenizado se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación de las nucleoproteínas. Se adicionó 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente con la mano y se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa, aproximadamente 0,5 mL, se le agregó 0,5 mL de isopropanol y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. El RNA se decantó por centrifugación a  $12.000 \times g$  durante 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el RNA se resuspendió en agua libre de RNAsas y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. (Shimadzu UV-1201).

#### **4.4.8 Electroforesis de RNA**

Para detectar la expresión del shRNA y el procesamiento de éste, se sometió a electroforesis entre 20 y 40  $\mu\text{g}$  de RNA total en un gel de poliacrilamida desnaturante (poliacrilamida:bisacrilamida [19:1] 20%, urea 7 M, TBE 1x) a una potencia constante de 15 W y utilizando TBE 1x como tampón de electroforesis (Tris 45 mM, ac. Bórico 175 mM y EDTA 2 mM).

#### **4.4.9 Transferencia del RNA a una membrana**

Para detectar la expresión del shRNAc y del siRNA2 se transfirió el RNA, durante 1 h a 100 V, a una membrana de nylon Hybond-XL (Amersham Biosciences. Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando la cámara de transferencia Trans-Blot (Bio-Rad. Hercules, CA, EE.UU.). La transferencia se realizó en tampón TBE 1x. Una

vez concluida la transferencia se secó la membrana al aire por 5 min y luego se fijó el RNA en la membrana mediante exposición directa de ésta a la luz del transiluminador (2 min). La membrana se guardó a 4°C hasta el momento de su utilización.

#### **4.4.10 Marcación de la sonda**

La sonda usada para detectar el shRNAc y el siRNA2 fue el oligonucleótido TG-317 cuya secuencia (CAGCAGCCCGAGGTCTTC) es complementaria a la hebra antisentido del shRNAc y del siRNA2 (es decir, es idéntica al mensajero de la ALDH2) de modo que no hibrida con el mensajero de la ALDH2. El oligonucleótido se marcó en el extremo 5' con ATP  $\gamma$ -<sup>32</sup>P. La marcación del oligonucleótido TG-317 se realizó a 37°C durante una h, en presencia de 20 pmoles de ATP  $\gamma$ -<sup>32</sup>P, tampón de fosforilación directa 1x y 10 U de polinucleótido kinasa en un volumen final de 20  $\mu$ L. El oligonucleótido marcado se incubó 16 h a -20°C con acetato de sodio 0,1 M y etanol 66% y, se decantó por centrifugación durante 45 min. Finalmente se resuspendió en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

#### **4.4.11 Hibridación del RNA**

La detección del shRNAc y del siRNA2 se realizó por hibridación con una sonda complementaria. Las membranas se preincubaron por 1 h a 65°C en una solución que contiene SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 0,5% y DNA de espermio de salmón 100  $\mu$ g/mL. La hibridación se realizó durante 1 h con 6 pmoles del oligonucleótido marcado. Las membranas se lavaron 3 veces con una solución de SSC 2X y SDS 0,2%, una vez a 65°C y dos veces a 55°C. Finalmente la señal de hibridación se capturó con una película fotográfica BioMax XAR (Kodak, Rochester, NY)

## 5 **RESULTADOS**

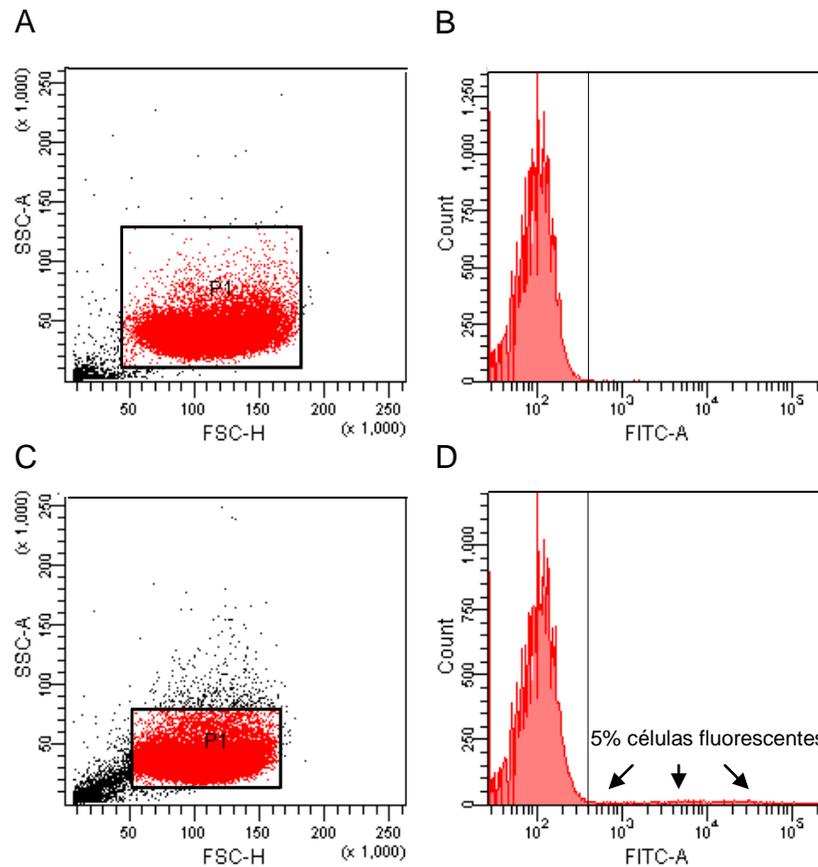
Los resultados se presentan en cuatro secciones: i) modelo celular, ii) experimentos con siRNAs: diseño y evaluación iii) experimentos con shRNA: construcción del gen y evaluación y iv) experimentos con vector adenoviral interferente: construcción y evaluación.

### 5.1 **MODELO CELULAR**

#### 5.1.1 **Actividad de la ALDH2 de rata en células humanas HEK-293**

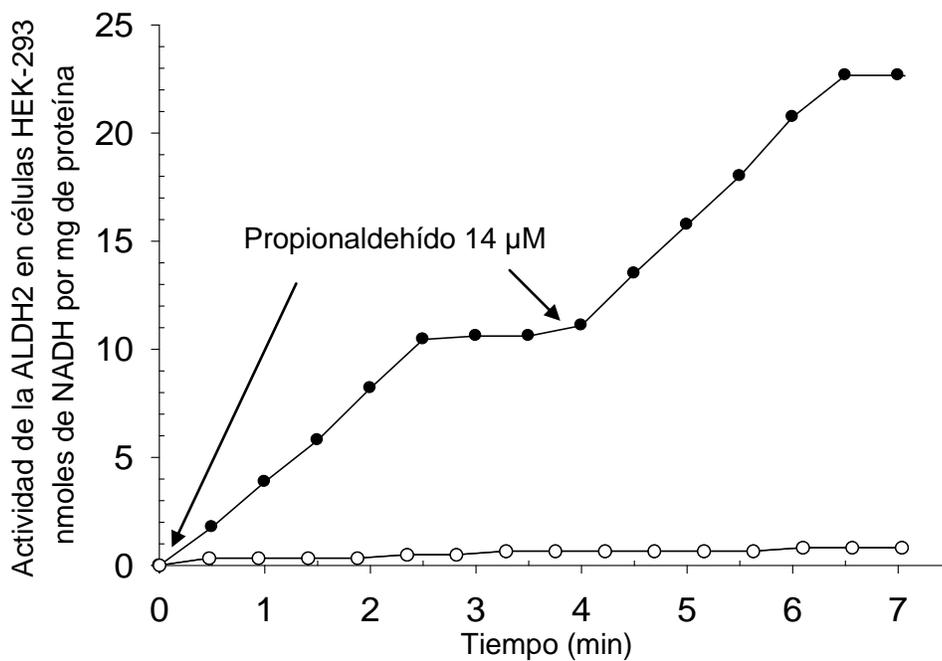
En estudios iniciales se determinó la eficiencia de transfección de las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3, las cuales expresan un nivel apreciable de la ALDH2 (Karahanian y *co/s.*, 2005). Utilizando Lipofectamine 2000 y el plásmido pAAV-eGFP, que codifica la proteína eGFP, se cuantificó el número de células verdes en un citómetro de flujo. Como se muestra en la Figura 12, menos del 5% de las células expresan eGFP. Esta eficiencia de transfección no permite evaluar la reducción de la actividad de la ALDH2 en las células H4-II-E-C3.

Como alternativa a las células H4-II-E-C3 se utilizaron células HEK-293, las cuales son fácilmente transfectables alcanzando eficiencias superiores al 50%. Estas células carecen de la actividad de la ALDH2 (Figura 13), lo que permite tener un sistema que exprese la ALDH2 de rata mediante su transfección con el plásmido pACCMVpALDH2D, alcanzando niveles de actividad similar a células H4-II-E-C3 (Karahanian y *co/s.*, 2005) (3,85 nmoles NADH producidos/mg de proteína/min). Adicionalmente la transfección simultánea de las células HEK-293, con el plásmido pACCMVpALDH2D y con las moléculas interferentes (siRNA), es equivalente a tener un sistema con 100% de eficiencia de transfección.



**Figura 12: Análisis por citometría de flujo de células H4-II-E-C3 transfectadas con un plásmido que codifica eGFP**

Los paneles A y B son células H4-II-E-C3 sin transfectar. El panel A representa las características físicas de la población celular, en las abscisas se grafica el tamaño de las células y en las ordenadas la dispersión de la luz (que es función de la rugosidad y granulosidad de las células). El panel B representa la subpoblación P1 del panel A, en las abscisas se grafica la fluorescencia de las células y en las ordenadas su número; en él se definió la fluorescencia basal de las células H4-II-E-C3 sin eGFP y el punto de corte (FITC-A  $3 \times 10^2$ ). Los paneles C y D son células H4-II-E-C3 transfectadas con el plásmido pAAV-eGFP, que expresa la eGFP. En el panel C se seleccionó la subpoblación P1 a la cual se le evaluó su fluorescencia graficada en el panel D; un desplazamiento hacia la derecha del punto de corte indica que las células transfectadas expresan eGFP. Se concluye de este gráfico que menos del 5% de las células H4-II-E-C3 transfectadas con el plásmido pAAV-eGFP presentan fluorescencia sobre el control.



**Figura 13: Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con pACCMVpALDH2D y sin transfectar.**

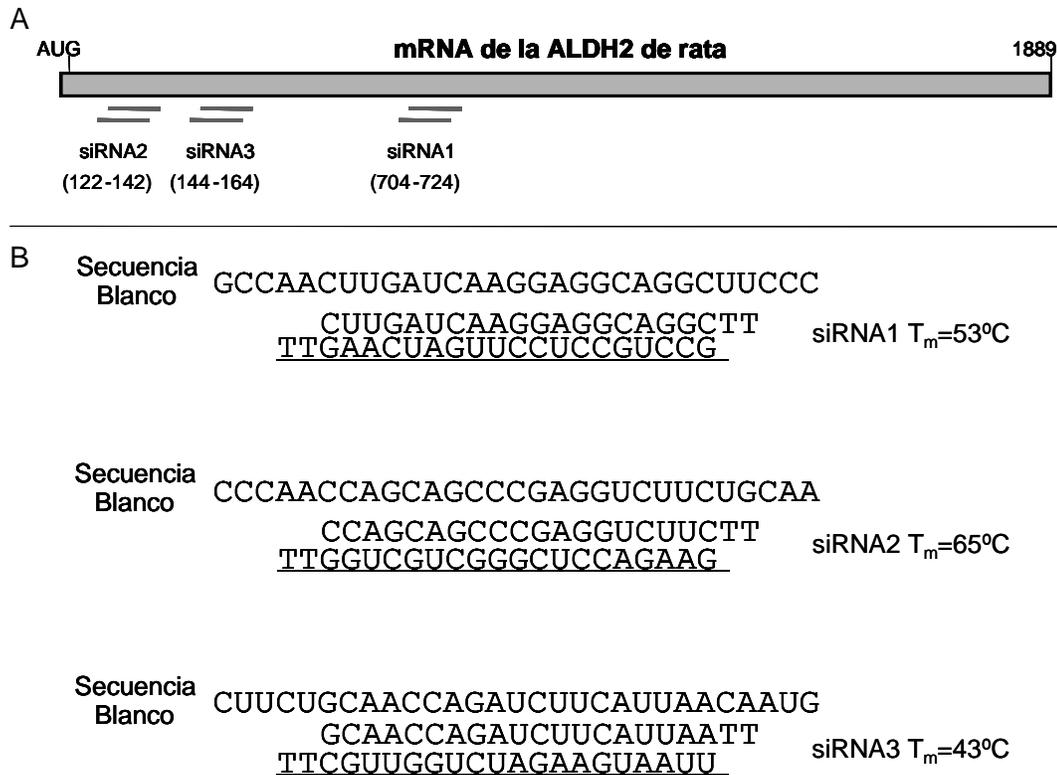
El ensayo estándar mide la cantidad de NADH producida por miligramo de proteína en el tiempo, utilizando 14  $\mu\text{M}$  de propionaldehído como sustrato. Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 sin transfectar (círculos abiertos) y transfectadas (círculos cerrados) con un plásmido que expresa la ALDH2 de rata (pACCMVpALDH2D). Medición realizada 72 h postransfección, utilizando lisado celulares como fuente de actividad enzimática.

## 5.2 Experimentos con siRNAs

### 5.2.1 Inhibición de la expresión de la ALDH2 de rata en células HEK-293 transfectadas con siRNAs

Con el propósito de inhibir la actividad de la ALDH2 se diseñaron 3 siRNAs, de acuerdo a los criterios de Elbashir y cols. (2002) y Reynolds y cols. (2004). La eficiencia de estos 3 siRNAs para inhibir la expresión de la ALDH2 de rata se probó en células HEK-293. Los siRNAs 1 y 2 se diseñaron de acuerdo a los criterios de Elbashir y cols (2002) en Tabla 1 (pág. 15). Por otra parte, el siRNA3 se diseñó de acuerdo a las reglas de Reynolds y cols (2004) en Tabla 2 (pág. 16). Los siRNAs 1 y 3 están dirigidos contra zonas exclusivas del mensajero de la ALDH2 de rata, mientras que el siRNA2 está dirigido contra una zona del mensajero de ALDH2 (ver Figura 14), cuya secuencia nucleotídica es compartida por rata y humano, y no está presente en otras ALDHs de rata ni de humano. Los tres siRNAs (RNAs de doble hebra) se sintetizaron con 2 timinas en el extremo 3' lo que les brindaría mayor resistencia a la degradación por exonucleasas 3' (Elbashir y cols., 2001). Cuando se forma el siRNA ambas timinas quedan protuberantes y desapareadas. La Figura 14 muestra la secuencia y la ubicación de los siRNAs sobre el mensajero de la ALDH2 de rata.

Como ya se indicara, las células HEK-293 no poseen actividad ALDH2 detectable (*vide supra*, pág 55. Figura 13) de modo que para determinar la eficiencia en el silenciamiento de la ALDH2 se cotransfectaron células HEK-293 con el plásmido pACCMVpALDH2D junto con los siRNAs ya apareados. Como control se transfectó las células con los oligonucleótidos sentido y antisentido de los respectivos siRNAs. La actividad de la ALDH2 se normalizó de acuerdo a la actividad de células HEK-293



**Figura 14: Secuencia y ubicación de los siRNAs sobre el mRNA de la ALDH2 de rata.**

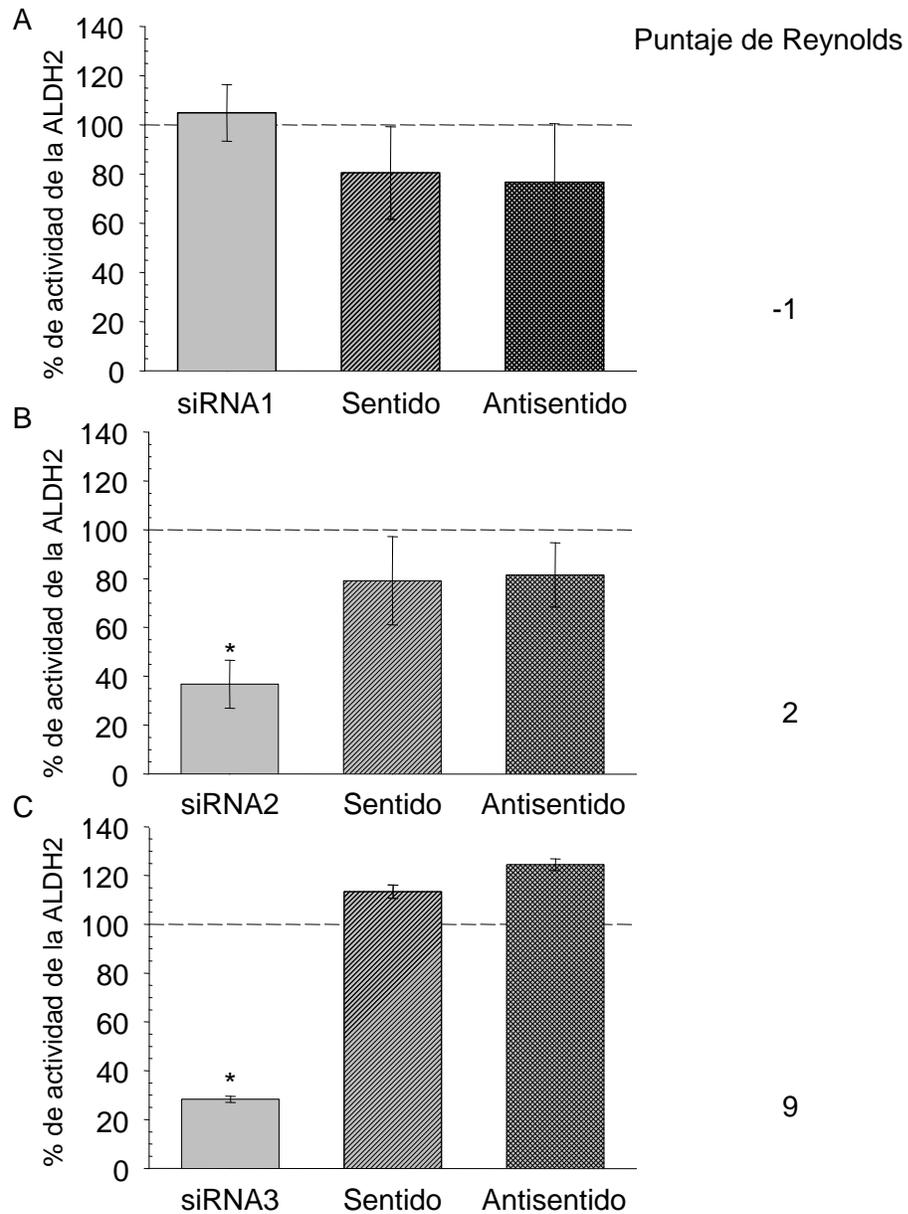
A) Esquema del mRNA de la ALDH2 de rata, se indica la ubicación de los siRNA 1 y 2 diseñados de acuerdo los criterios de Elbashir y cols. (2002) y del siRNA3, diseñado de acuerdo a Reynolds y cols. (2004). B) Secuencia de los siRNAs, la secuencia subrayada corresponde a la hebra de antisentido que se utiliza como hebra guía en el complejo de silenciamiento, ya que aparea con el mensajero de la ALDH2. La hebra antisentido del siRNA2 también es complementaria al mRNA de la ALDH2 humana. Los números corresponden a la zona de complementariedad de base con el mensajero de la ALDH2 de rata que comprende cada siRNA según el archivo GeneBank X14977.  $T_m$  calculada de acuerdo a Xia y cols., (1998).

transfectadas con pACCMVpALDH2D junto con un oligonucleótido sin complementariedad de base con el mensajero de la ALDH2 (para mantener la proporción de lipofectamina/ácido nucleico constante en todos los experimentos) al cual se le asignó una actividad de 100%. Se determinó que el siRNA1 no disminuye la actividad de la ALDH2 de rata (Figura 15 A), mientras que los siRNAs 2 y 3 producen una disminución que oscila entre un 65 y un 70% (Figura 15 B y C). Dicha disminución se obtuvo únicamente mediante la transfección de la doble hebra de RNA (siRNA), observándose sólo una pequeña disminución de la actividad ALDH2 con la hebra sentido y la antisentido constituyentes de los respectivos siRNAs. Esto sugiere que la disminución de la actividad enzimática no se debe a un bloqueo de la traducción del mRNA por la hebra de antisentido.

El diseño de los siRNAs 1 y 2 se realizó antes de la publicación de las reglas de Reynolds; luego un análisis retrospectivo de estos siRNAs con el algoritmo propuesto predice que ambas secuencias serían malos blancos para la interferencia (el siRNA1 tiene un puntaje de -1 y el siRNA2 un puntaje de 2 de un máximo de 9). Sin embargo, el siRNA2 disminuye en 65% de la actividad ALDH2 de rata en células HEK-293. Este resultado puede significar que existen otros factores aún no identificados que determinan la eficiencia del siRNA (ver discusión).

Se decidió utilizar el siRNA2 para desarrollar la etapa siguiente debido a que: i) Se ha reportado que una disminución del 40% de la actividad de la ALDH2 produce un efecto farmacológico (Helander y Carlsson, 1990; Garver y *cols.*, 2001); en circunstancias que el siRNA2 disminuye un 60% la actividad de la ALDH2, ii) la secuencia blanco está presente en el mensajero de la ALDH2 de rata y de humano, lo que permitiría usar la





**Figura 15: Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con siRNAs.**

Las células HEK-293 se transfectaron con i) pACCMVpALDH2D y ii) con siRNA1 (A), siRNA2 (B), siRNA3 (C) o sus oligonucleótidos sentido (achurado sencillo) y antisentido (achurado doble). La actividad se midió en los lisados 72 h postransfección, se corrigió por mg de proteína total y se expresó como porcentaje de la actividad de la ALDH2 de células HEK-293 transfectadas con pACCMVpALDH2D junto con un oligonucleótido no relacionado (control ---; 2,04 nmoles de NADH producido/mg de proteína/min = 100%). (siRNA 2 y 3 son significativos  $*=p<0,05$ ). n=3, en triplicado.

misma molécula en células humanas y, iii) el siRNA3, que produce una mayor inhibición, posee 2 adeninas consecutivas inmediatamente antes de las 2 timinas, de modo que al construir un gen para siRNA3 estas adeninas quedarían inmediatamente antes de la señal de término de la transcripción inhibiendo su reconocimiento por parte de la polimerasa. Esto hace imposible construir un gen que, bajo el control de un promotor de la RNA polimerasa III, transcriba un shRNA precursor del siRNA3.

### **5.3 Experimentos con shRNA**

#### **5.3.1 Clonación de tres promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III**

Al iniciar esta tesis no se había descrito un promotor de la RNA polimerasa III de rata, ni evidencia que demostrara la funcionalidad de los promotores de la RNA polimerasa III humana (algunos de los cuales ya estaban descritos) en células de rata. Contar con un promotor reconocido por la RNA polimerasa III, que sea funcional en células de rata es fundamental para producir genes de shRNA. Por este motivo se clonaron y secuenciaron los promotores de los RNAs U6, H1 y 7SK humanos. Se observó que las secuencias clonadas diferían de las publicadas para el promotor del RNA 7SK (Tabla 5). Estas secuencias se publicaron en la base de datos GenBank.

#### **5.3.2 Funcionalidad de los promotores humanos en células de rata H4-II-E-C3 y humanas HEK-293**

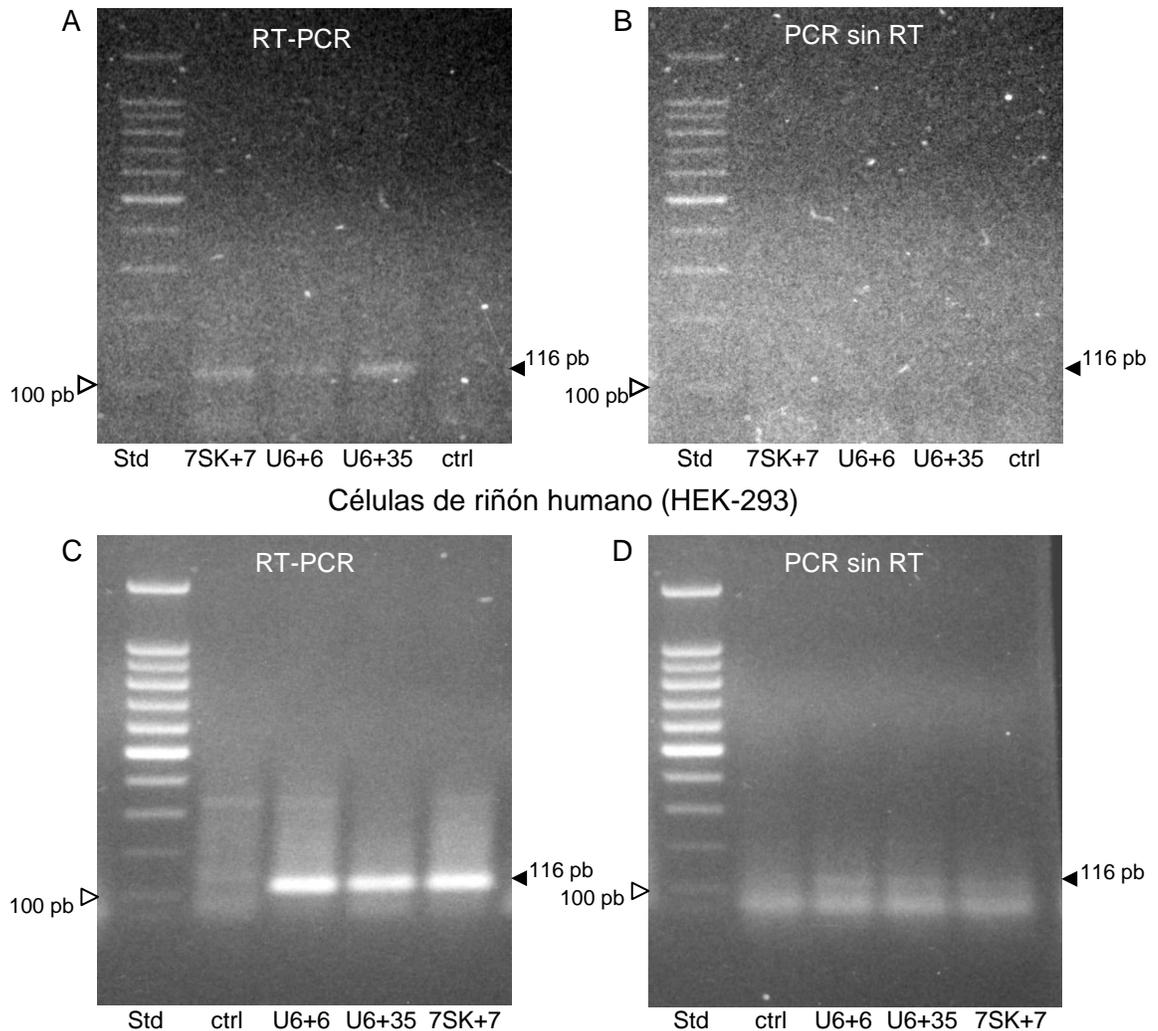
La funcionalidad de los promotores de la RNA polimerasa III de humanos en células de rata, se verificó ligando río abajo de cada uno de ellos un DNA de 116 pb cuya transcripción se detectó mediante RT-PCR (Figura 16 A y B). Se demostró que los

**Tabla 5: Diferencias nucleotídicas en el promotor del RNA 7SK de distintos tipos celulares humanos.**

Numeración según (X04992)	Previo en GenBank		Clonados y publicados en esta tesis		
	HeLa (X05490)	HeLa (X04992)	HEK-293 (AY578685)	HepG2 (AY578684)	Caco-2 (AY578683)
Inserción 34-35	Sí	No	No	No	No
nt 59	G	C	C	C	C
nt 153	A	C	C	C	C
nt 201	T	T	T	C	C

El promotor del RNA 7SK de tres tipos celulares humano (HEK-293, HepG2 y Caco-2) se clonó, secuenció y publicó en GenBank (AY578683, AY578684, AY578685).

Células de hígado de rata (H4-II-E-C3)\*

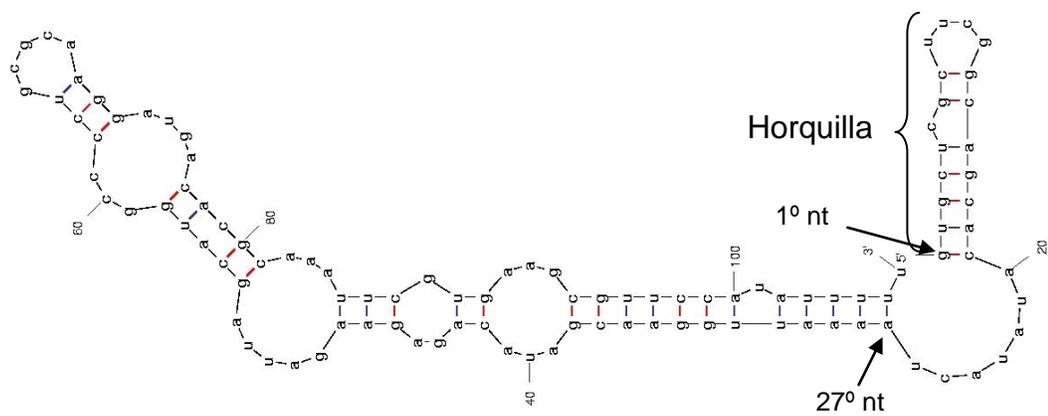


**Figura 16: RT-PCR de un RNA de 116 nt expresado bajo el control de distintos promotores humanos reconocidos por la RNA polimerasa III de rata.**

A) RT-PCR de hepatoma de rata (H4-II-E-C3) transfectadas con una plásmido que contiene: promotor del RNA 7SK (7SK+7), promotor del RNA U6 (U6+6) y promotor del RNA U6+27 (U6+35). Control RNA de células sin transfectar (ctrl). Estándar de tamaño de 100 pb (Std). (B) Control sin transcripción reversa. C) RT-PCR de células humanas HEK-293 transfectadas con: promotor de RNA U6+6, promotor de RNA U6+35 y promotor de RNA 7SK+7. (D) Control sin transcripción. La flecha negra indica la migración esperada para el amplicón (116 pb). La flecha blanca indica la migración del fragmento de 100 pb del estándar. (\*) Eficiencia de transfección 1/10 H4-II-E-C4/HEK-293.

promotores de los RNAs U6 y 7SK humanos, clonados en esta tesis, son funcionales en células de rata. Debe hacerse notar que a pesar de que la eficiencia de la transfección de estas células no supera el 5%, la amplificación del RNA de 116 nt mediante RT-PCR semicuantitativa, permite detectar su expresión. De manera análoga se determinó la funcionalidad de los promotores en células humanas HEK-293 (Figura 16 C y D).

A pesar de que la técnica utilizada no es cuantitativa, se observa que a partir de la misma cantidad de RNA total (2 µg) la cantidad de amplificación obtenida es considerablemente mayor en células HEK-293, lo que sugiere que la cantidad de RNA expresado también es mayor. Este resultado es coherente con una mayor eficiencia de transfección en las células HEK-293 que en las células H4-II-E-C3. La cantidad de amplificación obtenida entre los distintos promotores en el mismo tipo de células es similar, indicando que su eficiencia de transcripción relativa también es similar. En el año 2002 se determinó que una horquilla de RNA, que emula a un siRNA, produce mayor inhibición cuando es transcrita a continuación de los primeros 27 nt del RNA U6 (cuya secuencia forma una horquilla que la protege de la degradación por exonucleasas 5', ver Figura 17) (Paul y *col.*, 2002). Con estos antecedentes, eficiencia de transcripción similar (dato empírico) y mayor inhibición con U6+27 (dato bibliográfico) se eligió el promotor del RNA U6+35 (transcribe los 27 nucleótidos iniciales del RNA U6 más 8 nucleótidos del sitio de restricción) para comandar la transcripción de las horquillas de RNA (shRNA a, b y c).

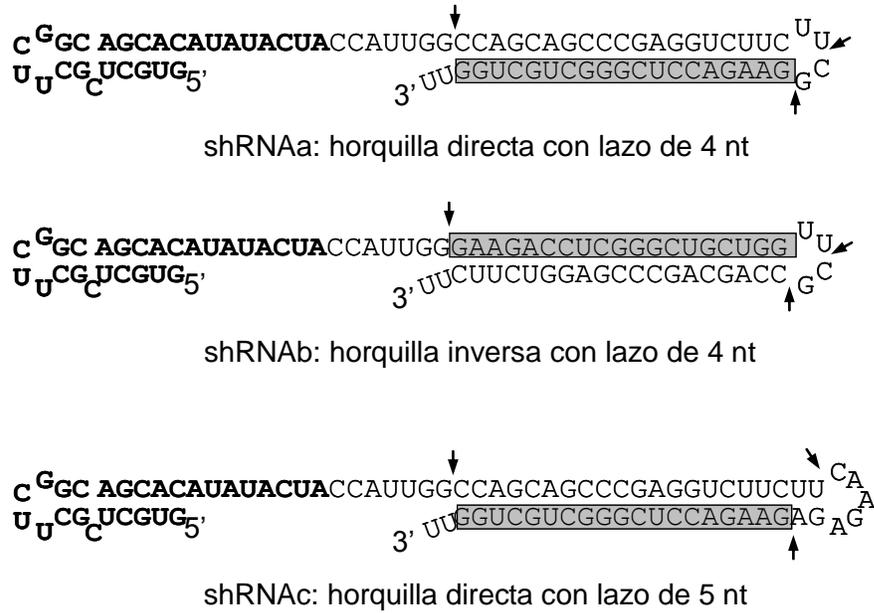


**Figura 17: Predicción de la estructura secundaria del RNA U6 humano.**

Predicción realizada con el programa MFOLD. Se observa que los primeros 19 nt forman una estructura de horquilla, la cual se postula brinda protección a la degradación por exonucleasas 5'.

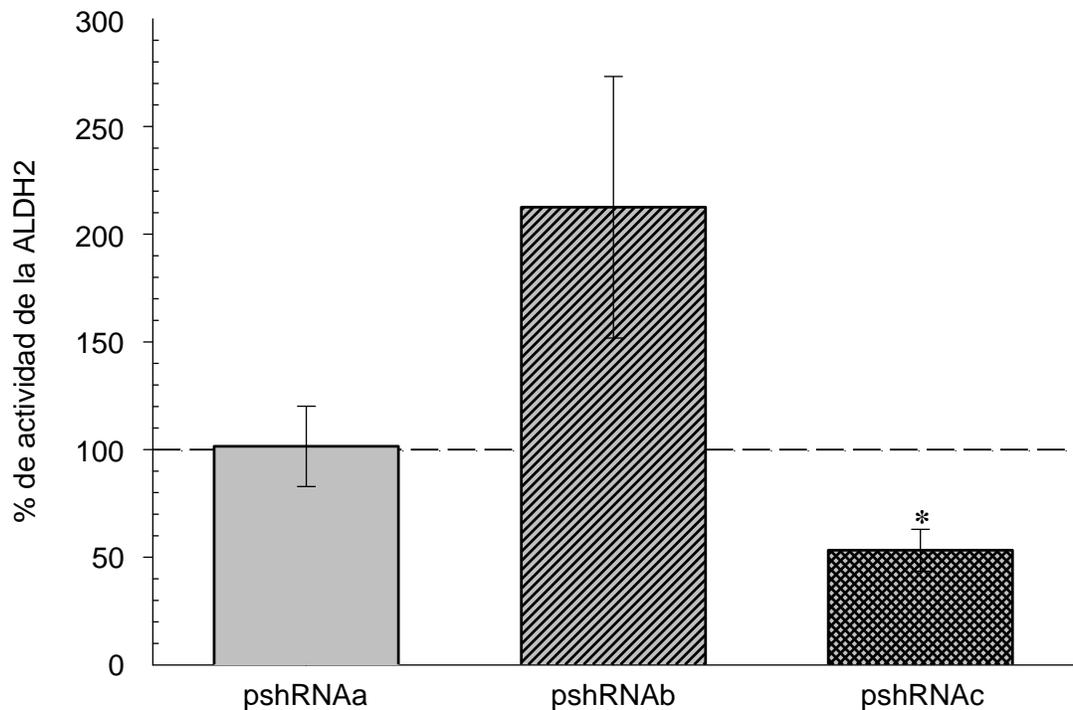
### **5.3.3 Construcción de genes que expresan horquillas de RNA bajo el control de promotores de la RNA polimerasa III humana**

Para lograr un silenciamiento estable y prolongado de la ALDH2 es necesario contar con un mecanismo de entrega permanente del siRNA a la célula. Dado que el RNA es sensible a las nucleasas en general y a las RNAsas en particular, enzimas de gran actividad celular. Para solucionar esta dificultad se construyó un gen que transcribe permanentemente un RNA que se pliega formando una horquilla (shRNA), cuyo tallo es la secuencia del siRNA2, de modo que al ser procesada por la enzima Dicer se libere una molécula del siRNA2; se consideró que las horquillas poseyeran en su extremo 5' los primeros nucleótidos del RNA U6, pues se ha visto que otras horquillas que lo posee producen una mayor inhibición (Paul y *cols.*, 2002). Se diseñaron 3 genes que transcriben shRNAs (Figura 18). El primero de ellos, codificado por el plásmido pshRNAa, expresa una horquilla con un tallo de 19 nt y un lazo de 4 nt que une la hebra sentido con la antisentido y se ubica río arriba de esta última (la hebra guía del complejo RISC). El plásmido pshRNAb codifica una horquilla con un tallo de 19 nt y un lazo de 4 nt, el que se ubica río abajo de la hebra de antisentido. El plásmido pshRNAc codifica una horquilla de 21 nt de tallo y 5 nt de lazo, la que se ubica río arriba de la hebra de antisentido. La transfección de células HEK-293 con el plásmido pshRNAa no disminuye la actividad de la ALDH2, el plásmido pshRNAb aumentó la actividad de la ALDH2, fenómeno que no se estudió pues no presenta interés práctico en el marco de esta tesis. El plásmido pshRNAc fue activo produciendo una disminución del 50% de la actividad de la ALDH2 de rata en células HEK-293 (Figura 19).



**Figura 18: Plegamiento predicho de los shRNAs obtenidos por transcripción de genes controlados por el promotor del RNA U6 humano.**

Se muestra el plegamiento de los 3 shRNAs transcritos, predicho por el programa MFOLD (Zuker, 1989). Todos los shRNAs poseen 35 nt que forman la horquilla del RNA U6 humano y el brazo de unión con la horquilla interferente (mostrado en negrita). La secuencia complementaria al mRNA de la ALDH2 se destaca en una caja gris. Los shRNAa y shRNAb poseen el mismo lazo de 4 nt y el shRNAc uno de 5 nt. Las flechas indican los sitios teóricos de corte para que Dicer origine el siRNA2.



**Figura 19: Actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con plásmidos que expresan un shRNA bajo el control del promotor del RNA U6+35 humano.**

La actividad de la ALDH2 en lisados de células HEK-293 se midió 72 h postransfección con plásmidos que codifican shRNAs contra la ALDH2 de rata. La transfección con los plásmidos pshRNAa (codificante del shRNAa) no produjo cambios respecto del control, mientras que el aumento observado con el pshRNAb (codificante del shRNAb) no es estadísticamente significativo ( $p < 0,09$ ). En cambio la transfección con pshRNAc (codificante del shRNAc) disminuyó la actividad en 50% ( $*=p < 0,05$ ). La actividad de la ALDH2 en células HEK-293 transfectadas con pACCMVpALDH2D y sin pshRNA fue definida como 100% (---) (5,37 nmoles NADH producido/mg de proteína/min).

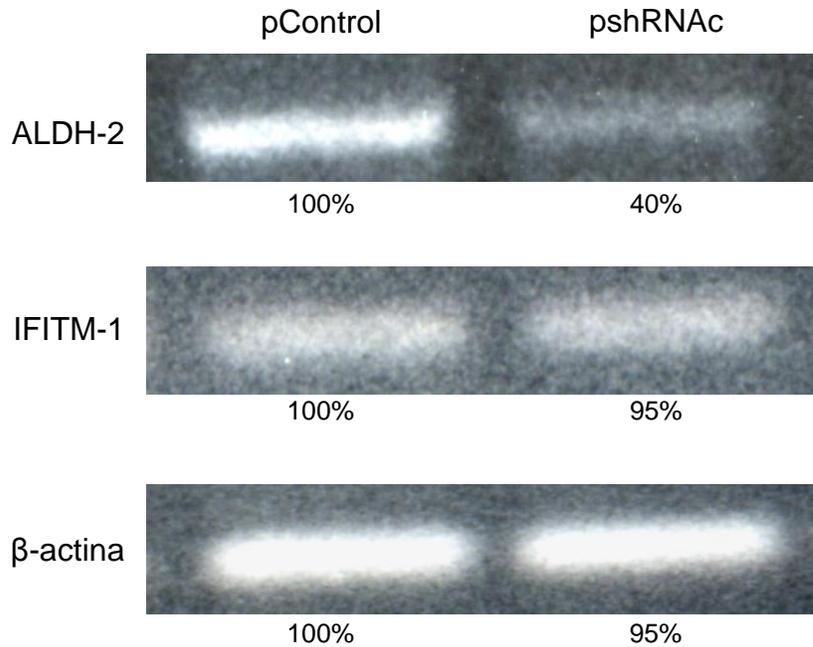
#### **5.3.4 Disminución del mensajero de la ALDH2 de rata en células HEK-293**

Para determinar si la reducción de la actividad de la ALDH2 obtenida con pshRNAc, es consecuencia de una disminución del mensajero, se transfectaron células HEK-293 con el plásmido pACCMVpALDH2D y con pshRNAc o con un plásmido control (pControl, plásmido que sólo posee el promotor). El mRNA de la ALDH2 se cuantificó mediante RT-PCR. El plásmido que codifica la horquilla disminuyó la cantidad de mensajero de la ALDH2 en aproximadamente 60% (cuantificado con el programa Scion) (Figura 20). Este resultado es consistente con una reducción del 50% en la actividad de la ALDH2.

Se observó que la cantidad de mensajero de la  $\beta$ -actina (gen constitutivo) se mantuvo constante entre las células transfectadas con el plásmido interferente (pshRNAc) y el plásmido control (pControl), indicando que la transcripción de otras proteínas no fue afectada. Adicionalmente se analizó el nivel de mensajero del gen IFITM-1, el cual aumenta cuando la vía del interferón es activada (lo cual se desea evitar); el mensajero no aumentó, indicando que no se ha activado la vía del interferón (Figura 20). Este resultado es positivo porque, al no activar la vía del interferón, le brinda potencialidad terapéutica el plásmido pshRNAc.

#### **5.3.5 Transcripción del gen del shRNA y detección del siRNA**

Para determinar si el gen codificante de la horquilla de RNA se transcribe se realizó un análisis de Northern que detecta la presencia de la horquilla. Para ello se transfectó células HEK-293 con el plásmido pshRNAc. El RNA extraído de las células se separó por tamaño en un gel de poliacrilamida desnaturante. El RNA separado se transfirió a una membrana y se hibridó con una sonda complementaria al shRNAc y al siRNA2



**Figura 20: Reducción selectiva del mensajero de la ALDH2 de rata en células HEK-293 transfectadas con el plásmido pshRNAc.**

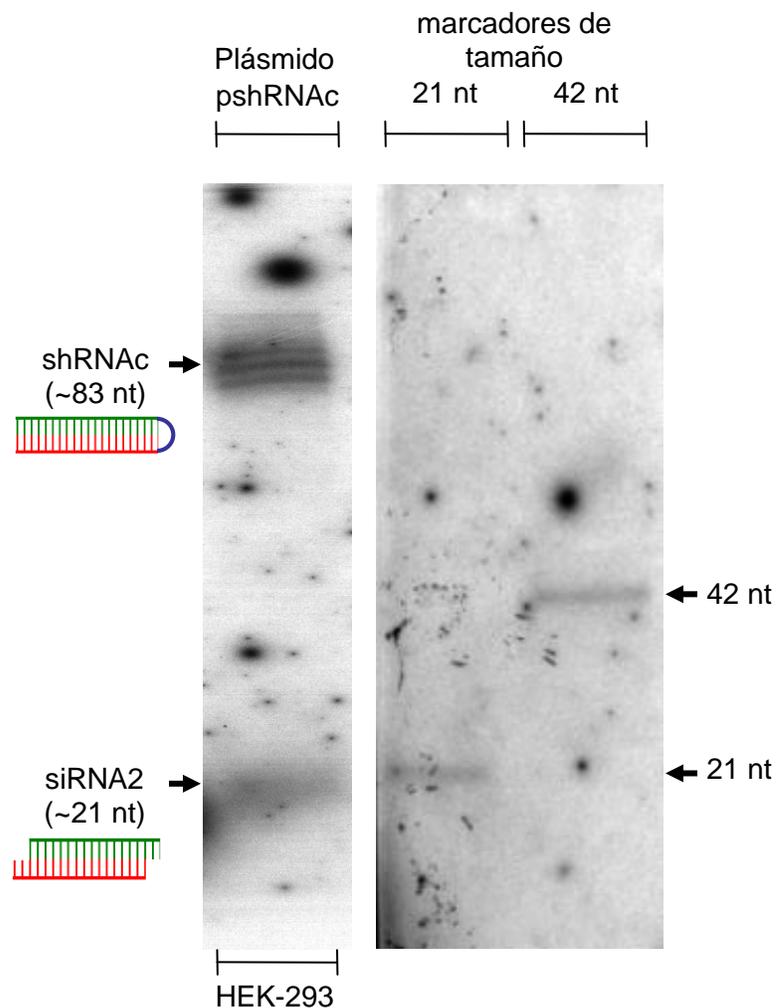
Reacción de transcripción inversa y amplificación del mensajero de la ALDH2, del IFITM-1 y de  $\beta$ -actina a partir de células HEK-293 transfectadas con pACCMVpALDH2D y con pshRNAc o con pControl. El plásmido pshRNAc reduce el mensajero de la ALDH2, consistente con la reducción de actividad de la ALDH2. El mensajero del IFITM-1, el cual aumenta cuando se activa la vía del interferón, permanece virtualmente sin cambios, indicando que no hay activación de la misma. El mensajero de la  $\beta$ -actina se mantuvo sin mayores cambios, indicando que la reducción fue selectiva. (16 a 20 ciclos de amplificación). La cuantificación de las bandas se realizó con el programa SCION.

(complementaria a la hebra de antisentido). La Figura 21 muestra que el gen codificante del shRNAc (~83 nt) se expresa en células HEK-293 y que una parte es procesada, posiblemente por Dicer, liberando el siRNA2 (~21 nt).

## **5.4 Experimentos con vectores adenovirales**

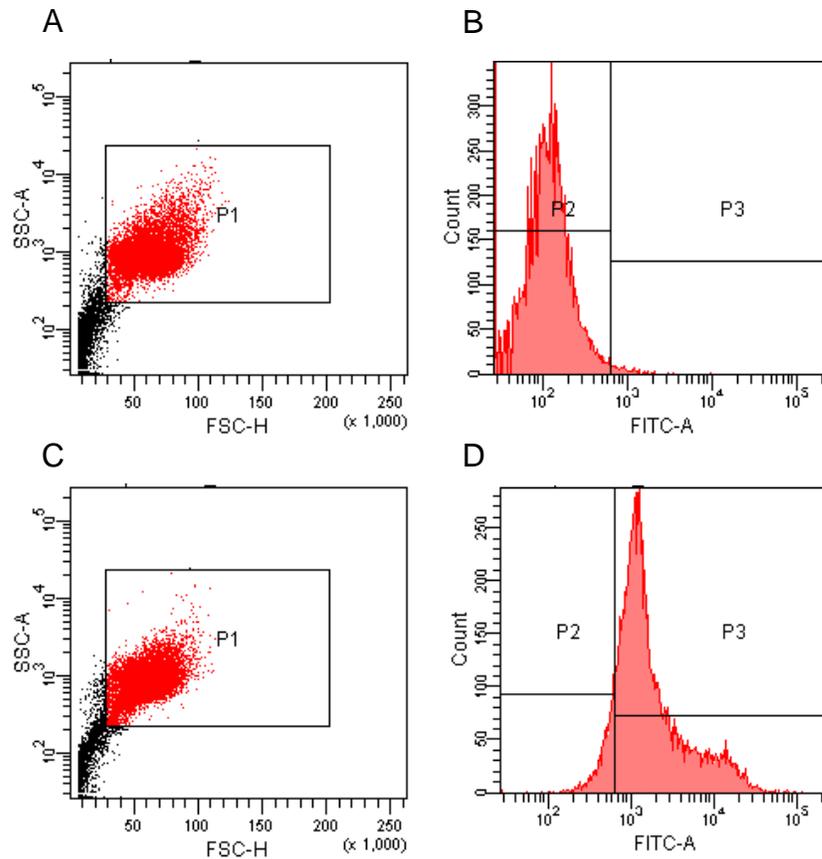
### **5.4.1 Construcción de un vector adenoviral de 1<sup>ra</sup> generación que codifica el shRNAc.**

Se construyeron 2 vectores adenovirales de primera generación, los cuales poseen todos los genes virales a excepción de E1 y E3. Uno de los vectores posee el gen que codifica el shRNAc (AdV-shRNAc) bajo el control del promotor del RNA U6+35 y el otro vector posee solamente el promotor del RNA U6+35 sin una secuencia codificante (AdV-Control). Además, ambos vectores codifican eGFP que permite seguir el curso de la infección y la eficiencia de la misma. En todos los experimentos realizados con vectores adenovirales se determinó una eficiencia de transfección superior al 90% (Figura 22). Las células de hepatoma de rata infectadas con distintas dosis virales (partículas virales por célula o pv/c) presentan una disminución de 10-15% (ANOVA  $p < 0,05$ ) en la actividad de la ALDH2 (Figura 23). Este resultado contrasta con lo observado en el caso de las transfecciones realizadas con pshRNAc en células HEK-293 (Figura 19) donde se observó una disminución del 50% de la actividad de la ALDH2. La disminución a la actividad con 2000 pv/c, tanto con el vector interferente como con el vector control, puede ser consecuencia de un efecto citopático no detectado por cambios en la morfología celular. La divergencia entre los resultados en el sistema de expresión en células HEK-293 y en células infectadas con vector adenoviral AdV-shRNAc se discutirá en la sección 6.



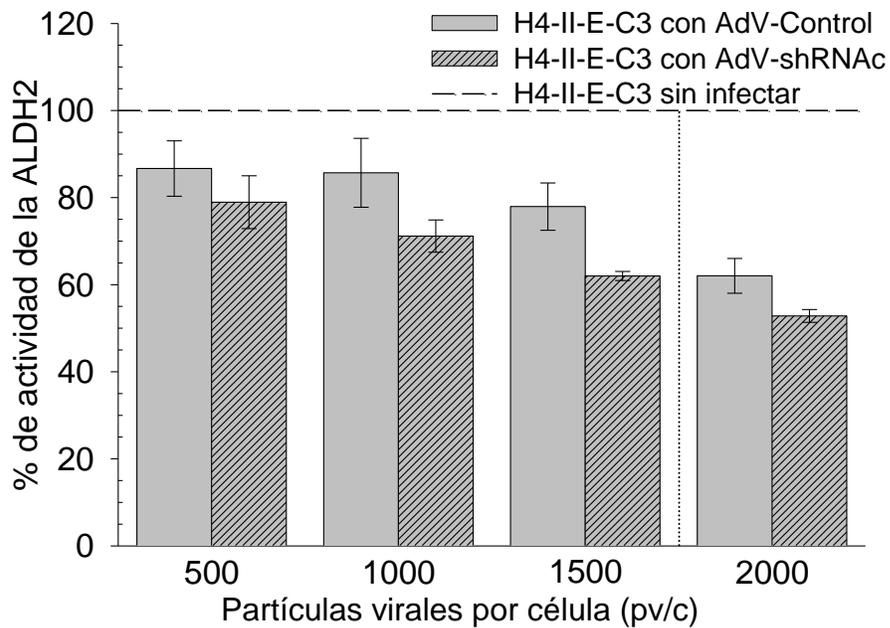
**Figura 21: Detección de siRNA2 y shRNAc en células HEK-293**

Análisis de Northern realizado sobre RNA de células HEK-293 transfectadas con el plásmido pshRNAc. El RNA se extrajo 72 h después de la transfección y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida (20%) desnaturalante con urea 7M. La sonda, usada para hibridar, se marcó en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  y es complementaria a la hebra antisentido del siRNA2 y del shRNAc. El panel de la izquierda corresponde a RNA de células HEK-293 transfectadas con pshRNAc, los paneles de la derecha corresponden a marcadores de tamaño.



**Figura 22: Eficiencia de transducción de las células de hepatoma de rata H4-II-E-C3 con AdV-shRNAC**

Los paneles A y B corresponden a las mediciones realizadas a células H4-II-E-C3 sin transfectar. En el panel A se seleccionó la población celular a la que se le midió la fluorescencia. En el panel B se muestra la fluorescencia basal de las células H4-II-E-C3. Los paneles C y D corresponden a células H4-II-E-C3 transducidas con 500 pv/c de AdV-shRNAC (el cual codifica la eGFP). El panel D muestra que el 90% de las células presentan fluorescencia sobre la línea base.



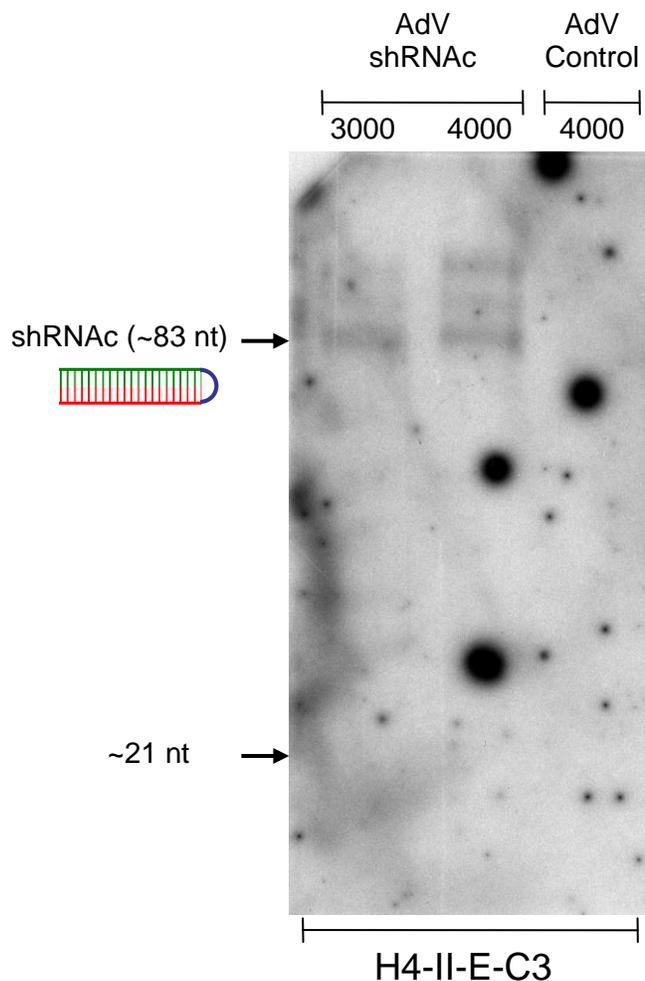
**Figura 23: Actividad de la ALDH2 de células de hepatoma de rata transfectadas con vectores adenovirales interferente y control (AdV-shRNAC y AdV-Control).**

La actividad de la ALDH2 en células de hepatoma de rata (H4-II-E-C3) 96 h postinfección. Se demuestra una reducción limitada de la actividad de la ALDH2 por AdV-shRNAC (10-15%, ANOVA  $p < 0,05$ ) la que se observó a todas las dosis virales estudiadas. El análisis de varianza también indica que el AdV-Control *per se* genera una marcada inhibición de la actividad ALDH2 ( $p < 0,05$ ). Se graficó como porcentaje de la actividad presente en células H4-II-E-C3 sin transfectar (---) (Actividad de 12 nmoles de NADH producido/mg de proteína/min = 100%).  $n=3$  en triplicado.

#### 5.4.2 Análisis de Northern para RNA total de hepatomas de rata (H4-II-E-C3)

Se preparó RNA total de células H4-II-E-C3 transducidas con 3000 y 4000 partículas virales por célula (pv/c) de AdV-shRNAC y AdV-Control, ya que a menores dosis no se observa señal en el análisis de Northern. Los RNAs se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida 20% desnaturalante con urea 7M y posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon donde se fijaron. La detección se realizó por hibridación con la misma sonda utilizada para detectar la horquilla y el siRNA2 expresados a partir del plásmido pshRNAC (ver Figura 21) marcada radiactivamente. La señal se recolectó durante 3 semanas con una placa autoradiográfica.

El análisis de Northern (Figura 24) muestra una muy pequeña cantidad de shRNAC (~83 nt) mientras que no se detecta la presencia de siRNA2, lo que puede atribuirse a variadas causas como por ejemplo: i) No hay procesamiento del shRNAC, ii) el procesamiento del shRNAC es muy poco y produce pequeños niveles de siRNA2, los que pueden encontrarse bajo el límite de detección, iii) el shRNAC es procesado normalmente, pero la degradación del siRNA2 es muy rápida, reduciendo los niveles globales de siRNA2 en la célula ó, iv) existe una baja expresión del shRNAC, produciéndose una pequeña cantidad de siRNA2, la que está bajo el límite de detección del análisis de Northern. Sin embargo, este resultado confirma un resultado previo que el promotor del RNA U6 humano promueve la transcripción de un RNA en células de rata (*vide supra*. pág 62, Figura 16).



**Figure 24: Análisis de Northern con RNA de células H4-II-E-C3 transducidas con AdV-shRNAc**

Detección del shRNAc en células H4-II-E-C3 transfectadas con 3000 y 4000 pv/c del vector adenoviral AdV-shRNAc o AdV-control. Sólo se observa una pequeña cantidad del shRNAc (~83 nt). No se detecta la presencia de una banda de ~21 nt esperada para el siRNA2 en las células H4-II-E-C3 transfectadas con AdV-shRNAc. Eficiencia de transducción superior al 90%.

## 6 **DISCUSIÓN**

La utilización de moléculas de siRNA, como herramientas para reducir la actividad celular de la ALDH2, tuvo como objetivo aumentar la duración y la especificidad de la reducción versus aquella esperada con oligonucleótidos fosforotioatos o la transcripción de gen de antisentido dirigidos contra el mensajero de la ALDH2 (Ocaranza y *cols.*, 2008; Garver y *cols.*, 2001). Estos estudios han demostrado en modelos animales que una menor tasa de traducción de dicho mensajero disminuye la actividad de la ALDH2 y genera un rechazo al consumo de alcohol. Las estrategias de “prueba de principio” utilizadas anteriormente no permiten efectos prolongados, como es el caso de los oligonucleótidos fosforotioato de antisentido, requiriendo administraciones periódicas para mantener la actividad de la ALDH2 disminuida, o carecen de especificidad, como es el caso del gen de antisentido. Ambas características podrían ser mejoradas con la utilización de siRNAs generados a partir de un gen que se transcriba produciendo un shRNA.

En esta tesis se construyeron 3 siRNAs (siRNA 1, 2 y 3) y 3 genes (shRNAa, b y c) de los cuales 2 siRNAs y 1 gen disminuyeron la actividad de la ALDH2 en 60-70%. Tanto los siRNAs como el gen disminuyeron sobre el umbral de 40% la actividad de la ALDH2, el cual se ha determinado en otros estudios que corresponde a la disminución de la actividad de la ALDH2 alcanzada por otros agentes efectivos en producir un rechazo al consumo de alcohol, tanto en ratas como en humanos (Helander y Carlsson, 1990; Garver y *cols.*, 2001; Ocaranza y *cols.*, 2008).

## 6.1 Expresión del gen de la ALDH2 de rata en células humanas HEK-293

Los resultados preliminares en células H4-II-E-C3, consistentemente mostraron una baja eficiencia de transfección en todas las condiciones analizadas. Este bajo nivel de transfección nos obligó a construir un sistema celular artificial que expresara el mensajero de la ALDH2 de rata y en el que pudiéramos detectar la actividad de la ALDH2. La estrategia de cotransfección utilizada tiene varias ventajas: i) no requiere realizar correcciones a la actividad de la ALDH2 por concepto de la vida media de la proteína preformada (proteína formada antes de la transfección del siRNA o del gen que codifica el shRNA), debido a que la síntesis de la ALDH2 comienza con la transfección del plásmido que la codifica. ii) no requiere realizar correcciones a la actividad de la ALDH2 por concepto de la eficiencia de la transfección, debido a que el complejo de lipofectamina y DNA lleva tanto el gen que codifica la ALDH2 como el siRNA o el gen que codifica el shRNA; de modo que todas las células transfectadas con el gen de la ALDH2 también lo han sido con el siRNA o el gen lo codifica. Esto es equivalente a transfectar con moléculas interferentes el 100% de las células que expresan el gen de la ALDH2 de rata.

Sin embargo, utilizar un tipo celular distinto al modelo final (células HEK-293 embrionarias de riñón *versus* H4-II-E-C3 hepatomas) plantea la interrogante de si la cantidad de mRNA de la ALDH2 presente en el modelo de sobreexpresión es comparable en términos cuantitativos a la presente en las células de rata, esto a pesar de que en términos de actividad son comparables a lo reportado por Karahanian y cols. (2005) (~4 ng/mg proteína/min). Podría darse la situación de que en el modelo de sobre expresión (HEK-293) una menor cantidad de mensajero origine una actividad de

la ALDH2 similar a la presente en las células de rata, como consecuencia de una mayor eficiencia de traducción del mensajero que compense la diferencia. Así un siRNA que es eficiente en células HEK-293, porque degrada el 50% de los mensajeros (produciendo una reducción del 50% del mRNA y posiblemente de la proteína), puede ser ineficiente en otro tipo celular, donde el gen se expresa con mayor fuerza produciendo una mayor cantidad de mensajero, de modo que la misma cantidad de moléculas destruidas equivalen por ejemplo sólo al 25% del total del mRNA de la ALDH2 y, como consecuencia, producen sólo una disminución del 25% de la actividad.

Recientemente, se ha reportado que la estructura secundaria del RNA blanco, puede favorecer o limitar la eficiencia de un siRNA para producir silenciamiento (Amares y cols., 2007; Schubert y cols., 2005; Westerhout y Berkhout, 2007). Así, un siRNA que produce una degradación del 90% del mensajero blanco, cuando éste se encuentra en una determinada conformación tridimensional, en otra línea celular donde las proteínas y mensajeros son diferentes, el mensajero blanco puede plegarse de manera distinta y el mismo siRNA ahora sólo degradaría el 10% del blanco, a pesar de que en ambos casos la secuencia del siRNA es 100% complementaria al mensajero blanco. En el futuro los criterios deberían incorporar consideraciones de disponibilidad espacial de la secuencia en el mRNA blanco, lo que ayudaría a tener mejores predicciones de eficiencia para las posibles secuencia blanco. A pesar de sus limitaciones, este sistema permitió probar de manera sencilla los distintos siRNAs y posteriormente los genes de shRNA e identificar 2 siRNAs y 1 gen de shRNA con potencial de inhibición.

## 6.2 Elección de las secuencias blanco contra la ALDH2 de rata

La principal ventaja de los siRNA sintetizados químicamente, es que permiten realizar un barrido rápido de todas las secuencias candidatas a ser buenos blancos para la interferencia. Además, permiten transfectar las células con las hebras sentido o antisentido y probar fácilmente la especificidad de la interferencia, descartando que se trate de un efecto tipo RNA de antisentido.

En esta tesis se utilizaron los criterios de Elbashir y *cols.*, (2002) y Reynolds y *cols.*, (2004) para buscar, en el mensajero de la ALDH2, secuencias blanco para interferencia que tengan mayores posibilidades de producir inhibición. Los criterios de Elbashir y *cols.*, pretenden ubicar una región del RNA blanco que esté alejada de los sitios de unión a proteínas y evitar las regiones muy estructuradas tridimensionalmente. Por otra parte, los criterios de Reynolds y *cols.*, no consideran a las proteínas que pudiesen estar unidas al RNA blanco (consistente con el modelo de silenciamiento del momento, que consideraba que el complejo de silenciamiento era capaz de desarmar la estructura del mRNA para encontrar zonas de complementariedad); más bien se preocupa empíricamente de tener una interacción más eficiente entre el RNA guía, el RNA blanco y el complejo de silenciamiento, para lo cual es importante tener o no ciertos nucleótidos en posiciones determinadas dentro de la zona de complementariedad con el siRNA. Ambos criterios nos permitieron encontrar rápidamente regiones en el mensajero de la ALDH2 que produjeron una disminución de la actividad superior al 40% (disminución mínima que genera un efecto farmacológico). Sin embargo, ninguno de los criterios, tanto los de Elbashir como los de Reynolds, considera la disponibilidad física (estructura secundaria) de la secuencia

blanco como un factor a tomar en cuenta para predecir la eficiencia de un sitio. El desarrollo de mejores algoritmos para predecir la estructura secundaria de RNAs grandes (como los mRNAs) y su incorporación a los criterios de selección, debería aumentar la eficiencia de selección de buenas secuencias para generar silenciamiento.

### **6.3 Potencialidad del siRNA2 como fármaco genético contra el alcoholismo**

Los siRNAs 2 y 3 disminuyeron en 65-70% la actividad de la ALDH2 de rata en células HEK-293. Ambos siRNAs tienen potencial farmacológico y se encuentran en la misma región del mensajero, pero el siRNA2 tiene el atractivo de ser 100% complementario también con el mensajero de la ALDH2 humana.

Recientemente, Ocaranza *y cols.*, (2008) describieron la disminución por 30 días de la actividad de la ALDH2 de ratas alcohólicas por una dosis única de un vector adenoviral de 1<sup>ra</sup> generación [ $\Delta$ (E1, E3)-adenovirus] que codifica un RNA de antisentido contra el mensajero de la ALDH2 de rata, logrando una disminución del 50% en el consumo voluntario de etanol de las ratas tratadas versus las ratas controles. Esto demuestra que se puede utilizar la maquinaria celular para sintetizar moléculas de RNA que inhiban por largo tiempo la expresión del gen de la ALDH2.

Un siRNA presenta una ventaja sobre un RNA de antisentido de gran tamaño; su especificidad. Las secuencias de los siRNAs, utilizados en esta tesis, se analizaron mediante BLAST para asegurar que no tuviesen complementariedad de base con los mensajeros de otras ALDHs celulares, ni con otros mensajeros de rata o humano. Este hecho le brinda al siRNA una ventaja comparativa frente a un gen de antisentido

extenso (varios cientos de bases) debido a la similitud de las secuencias nucleotídica entre los distintos genes de las ALDHs, ya que el gen de antisentido también afectaría las otras ALDHs. La utilización de un siRNA como fármaco tiene un gran potencial a consecuencia de su exquisita selectividad, la que puede llegar a distinguir mensajeros que difieren en un nucleótido solamente (Schwarz y cols., 2006).

Sin embargo los siRNA, al igual que los oligonucleótidos de fosforotioato, adolecen del mismo problema: tienen una vida media corta (48 h, Zhang y cols., 1996) por lo que requieren de administraciones periódicas para mantener suprimida la expresión de la ALDH2.

#### **6.4 Construcción de genes que expresan un shRNA precursor del siRNA2 para inhibir la expresión de la ALDH2.**

La construcción de un gen que exprese constantemente un shRNA precursor de un siRNA es una manera eficiente de tener un suministro constante de fármaco en la célula diana. Los genes tienen la ventaja de que una vez introducidos en la célula utilizan la maquinaria de ésta para sintetizar la molécula interferente, y dependiendo de la estabilidad de dicho gen es posible obtener una expresión que puede alcanzar varios meses o años. En nuestra experiencia, la selección de la secuencia que conecta la hebra sentido y antisentido de la horquilla, es fundamental para tener éxito en producir un gen que exprese un shRNA que inhiba la expresión de un gen blanco. Por ello es necesario probar con distintas secuencias conectoras hasta obtener el silenciamiento esperado. Debido a lo anterior, es desaconsejable utilizar en primera instancia genes para probar la funcionalidad de posibles secuencias blanco y abordar la construcción

de un gen precursor de un siRNA sólo después de haber probado la funcionalidad de dicho siRNA sobre el mRNA blanco.

Para construir genes, precursores de un siRNA, hoy tenemos dos alternativas: i) expresar una horquilla de RNA utilizando un promotor reconocido por la RNA polimerasa III, como por ejemplo los promotores de los RNA U6, H1 y 7SK; o ii) utilizar un promotor reconocido por la RNA polimerasa II, como por ejemplo el del citomegalovirus (CMV).

Los promotores de la RNA polimerasa III son pequeños (100-300 pb) y comandan la síntesis de RNAs pequeños carentes de Cap y cola de poli A. Esta polimerasa reconoce secuencias de inicio y término de la transcripción bien definidas. Una secuencia de al menos 4 timinas consecutivas es reconocida como una potente señal de término de la transcripción y su expresión es constitutiva en todos los tejidos.

Los shRNAs transcritos por la RNA polimerasa III se asemejan estructuralmente a los microRNAs (RNAs pequeños que regulan postranscripcionalmente la expresión de un gen) y pueden causar efectos tóxicos porque compiten con los miRNA endógenos para ser exportados al citoplasma por exportina 5 (Ohrt y *cols.*, 2006; Grimm y *cols.*, 2006). Los shRNA transcritos por la RNA polimerasa III poseen muy pocos nucleótidos adicionales, tanto en el extremo 5' como en el 3', por lo que teóricamente deben tener pocas interacciones no deseadas.

Actualmente se encuentran disponibles promotores de la RNA polimerasa III, cuya expresión puede ser controlada con tetraciclina (Lin y *cols.*, 2004; Kappel y *cols.*, 2006)

o incluso específicos de tejidos controlados por tetraciclina (Meissner y cols., 2001). La utilización de promotores inducibles para tener una expresión controlada de un shRNA terapéutico, podría disminuir la toxicidad reportada para los siRNAs, dado que se podría controlar la expresión del shRNA permitiendo un uso menos intensivo de exportina 5, de modo que esta no sea limitante para los miRNAs endógenos.

Los promotores de la RNA polimerasa II tienen un tamaño que oscila entre 300 y 1000 pb, sintetizan RNAs largos con Cap y una cola de poli A. Estos promotores pueden ser de expresión ubicua o específica de tejido. Los RNAs transcritos por esta polimerasa son estructuralmente semejantes a los RNAs mensajeros y se exportan del núcleo al citoplasma posiblemente por la misma vía que utilizan los mRNAs tradicionales, lo que podría disminuir o eliminar la toxicidad celular descrita para algunos shRNAs transcritos por la RNA polimerasa III. Se han reportado algunas inhibiciones obtenidas con shRNAs transcritos a partir de promotores de la RNA polimerasa II (Xia y cols., 2006 a y b; Yuan y cols., 2006; Zhou y cols., 2005). Los RNAs transcritos por la RNA polimerasa II tienen secuencias nucleotídicas adicionales al siRNA que se desea producir, aumentando las posibilidades de tener interacciones con otros RNAs que se expresen en el mismo tipo celular y que tengan alguna secuencia total o parcialmente complementaria con él. Recientemente, se ha reportado que la señal de término de la transcripción reconocida por la RNA polimerasa III ( $T_5$ ) también puede ser reconocida, como señal de término de la transcripción, por la maquinaria de transcripción reclutada por el promotor del CMV (Song y cols., 2004); de esta manera al reducirse los nucleótidos adicionales en el extremo 3' de un shRNA transcrito por la RNA polimerasa II disminuyen también las interacciones no deseadas.

En esta tesis se construyó un gen que expresado en células en cultivo, controlados por el promotor del RNA U6, disminuyó en 50% la actividad de la ALDH2, lo que es un poco menor que la disminución obtenida con el siRNA2 60-70%. Esta diferencia en el silenciamiento puede explicarse porque, una vez transfectada la célula, el gen debe alcanzar el núcleo para expresar el shRNA, luego el shRNA debe ser transportado al citoplasma por exportina 5 para ser procesado por Dicer y liberar el siRNA2 que finalmente es incorporado a RISC para ejercer su actividad biológica; en cambio los siRNAs sintéticos son liberados directamente al citoplasma en donde se produce el reconocimiento de estos por RISC y el corte del RNA blanco.

La principal desventaja que tienen los promotores de la RNA polimerasa III es que esta polimerasa reconoce una secuencia de 4 ó más timinas como señal de término de la transcripción, de modo que una horquilla que posea 4 timinas consecutivas en su tallo no podrá ser expresada en su totalidad. Este punto es muy importante, si consideramos que uno de los criterios de Reynolds y *cols.* sugiere que los últimos 5 nucleótidos de la hebra sentido sean adeninas o timinas, lo que aumenta la probabilidad de tener una secuencia teóricamente eficiente con 4 timinas consecutivas (el mismo efecto ocurre si se trata de 4 ó más adeninas consecutivas, en donde la hebra antisentido del shRNA es la que llevaría las timinas consecutivas).

## **6.5 Elección del promotor para expresar un shRNA.**

Al iniciar esta tesis no existía información de la funcionalidad de los promotores de los RNA U6, H1 y 7SK humanos (reconocidos por la RNA polimerasa III) en células de rata ni que era posible expresar los shRNAs a partir de promotores de la RNA polimerasa II.

La funcionalidad de los promotores se evaluó mediante una RT-PCR de un RNA reportero en células HEK-293 (humano) y H4-II-E-C3 (rata) transfectadas con un plásmido que codifica dicho RNA. Se demostró cualitativamente la funcionalidad de los promotores en las células de rata y humano, pero no sabemos cual es su nivel de expresión. Una baja expresión del promotor del U6+35 podría ser la explicación para la pequeña disminución de la actividad de la ALDH2 observada con el vector adenoviral. Una posibilidad para determinar cual es el nivel de transcripción del promotor, es cuantificar mediante transcripción inversa y posterior amplificación por PCR en tiempo real el número de moléculas de RNA transcrito que hay por célula de rata transfectada y compararla con el número de transcrito presente en células HEK-293.

#### **6.6 La estructura del shRNA determina su actividad inhibitoria.**

El shRNAa (inactivo) y el shRNAc (activo) se diferencian en la secuencia y el largo del conector, lo que produce un drástico cambio en la disminución de la actividad de la ALDH2. Una posibilidad es que el procesamiento de las horquillas tenga eficiencias distintas; siendo el shRNAc probablemente procesado más eficientemente que el shRNAa (una vez procesados los shRNAs ambos originan el siRNA2). Esto indicaría que el shRNAc origina más siRNA2 que el shRNAa.

Esta mayor eficiencia de procesamiento que postulamos podría ser consecuencia de que el conector más grande. El conector de 9 nt, que forma una vuelta de 5 nt, permite una conformación del DNA menos torcionada comparada con el caso de 4 nt; la forma más corta de 4 bases al estar más tensionada podría influir en el grado de apareamiento de las bases adyacentes a este, dejando un segmento de cadena

simple. Adicionalmente la secuencia de 9 nt alarga el tallo en 2 nucleótidos y con ello se aplica un giro de 60° entre los extremos de la horquilla (Tang y Daper, 1994). Así, los grupos voluminosos ubicados en los extremos de la horquilla (base y ápice) se desplazan. Esta nueva configuración puede favorecer la interacción del shRNAc con Drosha, exportina 5 y/o con Dicer lo que resulta finalmente en una mayor eficiencia de procesamiento y con ello, un mayor grado de silenciamiento.

Inesperadamente, mientras el shRNAa fue inactivo para inhibir la expresión de la ALDH2, el siRNAb produjo un marcado aumento de la actividad de la misma (Aunque no fue significativa,  $p < 0.09$ ). Dicho aumento puede deberse a algún grado de estabilización del mensajero por parte del shRNAb, un aumento en la tasa de traducción o bien a un aumento en el nivel de transcripción de dicho gen, esto último ya ha sido descrito para otro gen (Li y cols., 2006a). Sin embargo, este efecto no se estudió porque no representaba interés para el objetivo final de esta tesis.

## **6.7 Entrega permanente del shRNA e inhibición de la ALDH2 de rata**

En el tratamiento de enfermedades crónicas, como el alcoholismo, se requiere de administraciones periódicas de fármaco. Sin embargo, los pacientes con frecuencia abandonan el consumo de los medicamentos en perjuicio del tratamiento. Por ello el fármaco ideal para tratar el alcoholismo debe tener un efecto prolongado (meses o años) con una sola dosis; algo similar a las vacunas, las cuales tienen efectos protectores por varios años luego de una única dosis. Se ha probado sin éxito cápsulas subcutáneas de liberación prolongada de disulfiram, cuyo efecto no es superior a los placebos (Johnsen y Morland, 1991). La entrega eficiente y la expresión prolongada de

un gen pueden lograrse mediante la transfección de células con un vector viral. En esta tesis se abordó la construcción de un vector adenoviral de primera generación que incorpora el gen del shRNAc en su genoma. Con este vector se logró disminuir la actividad de la ALDH2 en 10% respecto del control, mientras que la eficiencia de transfección fue de al menos el 90%, como fue demostrado por cuantificación de las células verdes por citometría de flujo. La pequeña disminución de la actividad de la ALDH2 alcanzada con los vectores adenovirales de 1<sup>ra</sup> generación puede explicarse por la presencia del RNA VA I que codifican estos vectores. Este RNA tiene una estructura secundaria similar a un miRNA y actúa como inhibidor competitivo de exportina 5, Dicer y RISC (Andersson y cols., 2005; Lu y Cullen, 2004). A pesar de esto, algunas publicaciones han reportado buenas inhibiciones de expresión génica con shRNA entregados con vectores adenovirales que codifican el RNA VA I (Ro y cols., 2005; Krom y cols., 2006). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que dichas inhibiciones hayan sido alcanzadas con shRNA precursores de siRNAs más eficientes que el siRNA2, produciendo inhibiciones superiores con dosis virales muy bajas, de modo que se sintetiza una pequeña cantidad de RNA VA I que no alcanzaría a inhibir la actividad de los siRNAs.

Otra explicación a la baja reducción de la actividad de la ALDH2 puede ser una pequeña tasa de transcripción del gen de shRNA en células de rata. Los resultados del análisis de Northern en células H4-II-E-C3, muestran una pequeña cantidad de shRNA aún a dosis virales grandes, resultado que es más compatible con una baja transcripción que con un problema en el procesamiento del shRNA; en cuyo caso se esperaría observar el shRNA sin procesar.

Una alternativa a la reducción de la actividad de la ALDH2 con vectores adenovirales de 1<sup>ra</sup> generación puede ser el uso de vectores adenovirales de 3<sup>ra</sup> generación (Adenovirus dependientes de ayudante), que carecen de todos los genes virales incluyendo el del RNA VA I. Estos vectores han sido administrados *in vivo* transduciendo hepatocitos eficientemente, logrado mantener la expresión de un gen reportero por más de dos años luego de una administración única en ratones (Toietta y cols., 2005) o en primates (Morral y cols., 1999). La entrega de un gen codificante del shRNAc con vectores adenovirales de 3<sup>ra</sup> generación (carente de todos los genes virales incluido el RNA VA I) permitiría obtener disminuciones de la actividad de la ALDH2 cercanas o superiores al 40%, lo que es farmacológicamente deseable para una terapia contra el alcoholismo.

## **6.8 PROYECCIONES DE ESTA TESIS**

Esta tesis deja algunas interrogantes y desafíos que pueden ser interesantes de abordar en estudios futuros en este campo. En primer lugar se debería construir un vector adenoviral de 3<sup>ra</sup> generación, el cual no expresa el RNA VA I con lo que se espera que la inhibición de la ALDH2 por acción del shRNAc sea mucho mayor. Este vector viral, al no expresar proteínas virales es mucho menos inmunogénico, lo que permitiría expresar el shRNAc en ratas *in vivo* y determinar si el shRNAc puede modificar el patrón de consumo voluntario de alcohol en las ratas tratadas versus un control de ratas tratadas con un vector adenoviral que no codifica el shRNAc.

Otra alternativa interesante es la construcción de un gen de shRNA controlado por un promotor de la RNA polimerasa II que sea específico de hígado. Esto agregaría un

nivel más de especificidad a nuestro sistema de silenciamiento genético, de modo que tal vez sería mucho más fácil llegar a una aplicación en humanos, pues sólo sería necesario demostrar que no hay inhibiciones no deseadas en hígado. También se podrían utilizar promotores de la RNA polimerasa III regulables, lo que permitiría tener una expresión controlada de la horquilla. De este modo sería posible probar en el mismo cultivo el nivel acetaldehído producido en presencia y ausencia del inductor.

Un experimento elegante sería construir un gen interferente que se active en presencia de etanol o acetaldehído (Kashima y cols., 1999; Schaarschmidt y cols., 2004). Este tipo de gen permitiría que la célula exprese el shRNA cuando esta es sometida permanentemente a concentraciones de etanol (como sucede con los alcohólicos) y una vez que se deja de estar en presencia del etanol, se deja de expresar el gen interferente, volviendo la célula a su estado normal. El gen sólo se activaría si las células (o el paciente) son expuestos nuevamente al etanol.

En el aspecto básico, para entender más los factores que favorecen el silenciamiento de un gen blanco por acción de un shRNA precursor de un siRNA, sería necesario construir una serie de shRNA, precursores del siRNA2, en los cuales se cambie el largo y la secuencia de la vuelta conectora de la horquilla. Estas horquillas de RNA deberían tener tallos de distinto largo, oscilando entre los 19 y 29 nt. La eficiencia de estas horquillas podría ser probadas en el sistema de sobre expresión en células HEK-293.

Finalmente, esta tesis demuestra que es posible reducir la actividad de la ALDH2 de rata, tanto con siRNAs sintéticos como con shRNAs sintetizados por la propia célula a partir de un gen, y que estos podrían tener valor terapéutico.

## 7 **CONCLUSIONES**

- i) La actividad de la ALDH2 de rata puede ser disminuida en células humanas por el sistema de interferencia de RNA, ya sea transfectando células con siRNAs o con genes que codifican una horquilla de RNA precursora de un siRNA. No obstante, faltan por conocerse algunos determinantes positivos para la acción eficiente de los siRNA.
- ii) Los algoritmos de Elbashir y cols. (2002) y Reynold's y cols., (2004) permitieron diseñar siRNAs contra la ALDH2 de rata con potencial terapéutico, demostrándose que producen una disminución de más del 60% de la actividad de la ALDH2.
- iii) La secuencia y el largo de la vuelta que conecta las hebras sentido y antisentido de la horquilla, determinan la eficiencia de la misma para producir el silenciamiento génico.
- iv) Sería conveniente utilizar vectores virales que no posean elementos que bloqueen el proceso de interferencia. Los vectores adenovirales dependientes de virus ayudante, carentes de todas las proteínas virales, pueden ser de gran ayuda en este sentido.

## 8 **REFERENCIAS**

Alcohol and Health (1997) Ninth Special Report to the U.S. Congress. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute on Alcohol, Abuse and Alcoholism. pp 14-15.

Ameres SL, Martinez J, Schroeder R (2007). Molecular basis for target RNA recognition, cleavage by human RISC. *Cell* 130:101-112.

Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79:9556-9565.

Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. (2007) Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Herat* 14:447-459.

Baer M, Nilsen T, Costigan C y Altman S (1990) Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res* 18:97-103.

Becker T, Noel R, Coats W, Gomez-Foix A, Alam T, Gerard R y Newgard Ch (1994) Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Met Cell Biol* 43:161-189.

Billy E, Brodani V, Zhang H, Müller U y Filipowicz W (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14428-14433.

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

Brummelkamp T, Bernard R y Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.

Caplen N, Parrish S, Imani F, Fire A y Morgan R (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9742-9747.

Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, Ferry N, Weinberg MS, Arbuthnot P (2006) Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther.* 13:411-421

Chen W, Liu M, Jiao Y, Yan W, Wei X, Chen J, Fei L, Liu Y, Zuo X, Yang F, Lu Y, Zheng Z (2006) Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol.* 80:3559-3566.

Chick J, Gough K, Falkowski W, Kershaw P, Hore B, Mehta B, Ritson B, Ropner R, Torley D (1992) Disulfiram treatment of alcoholism. *Br J Psychiatry* 161:84-89.

Couzigou P, Coutelle C, Fleury B y Iron A (1994) Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, alcoholism and alcohol related disease. *Alcohol and Alcoholism Suppl* 2:21-27.

Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K y Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

Elbashir SM, Harborth J, Weber K and Tuschl T (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.

Faiman MD, Jensen JC y Laucossiere RB (1984) Elimination kinetics of disulphiram in alcoholics after single and repeated doses. *Clin Pharm Therap* 36:520-526.

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

Farrés J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H (1994) 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. *269:13854-13860.*

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

Figuroa L, Minoletti A, Monreal M, Pemjeam A, Domínguez R y Marconi J (1998) Impacto socio económico del abuso del alcohol en Chile. República de Chile, Ministerio de Salud y Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE y Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

Fuller R, Branchey L, Brightwell D, Derman R, Emrick Ch, Iber F, James K, Lacoursiere R, Lee K, Lowenstam I, Maany I, Neiderhiser D, Nocks J y Shaw S (1986) Disulfiram treatment of alcoholism. A Veterans Administration cooperative study. *JAMA* 256:1449-1455.

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

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

Geiduschek E y Tocchini-Valentini G (1988) Transcription by RNA polymerase III. *Ann Rev Biochem* 57:873-914.

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

Gomez-Foix A, Coats W, Baque S, Alam T, Gerard R y Newgard Ch (1992) Adenovirus mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism. *J Biol Chem* 267 :25129-25134.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541.

Hammond S, Berstein E, Beach D y Hannon G (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 404:293-296.

Hannon G, Chubb A, Maroney P, Hannon G, Altman S y Nilsen T (1991) Multiple cis-acting elements are required for RNA polymerase III transcription gene encoding H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *J Biol Chem* 266:22796-22799.

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

Harborth J, Elbashir S, Bechert K, Tuschl T y Weber K (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557-4565.

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

Heath AC, Meyer J, Jardine R, Martin NG (1991) 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.

Helander A, Carlsson S (1990) Use of leukocyte aldehyde dehydrogenase activity to monitor inhibitory effect of disulfiram treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 14:48-52.

- Higuchi S (1994) Polymorphisms of ethanol metabolizing enzyme genes and alcoholism. *Alcohol Alcohol Suppl.* 2:29-34.
- Huang M, Lindahl R (1990) Aldehyde dehydrogenase heterogeneity in rat hepatic cells. *Arch Biochem Biophys.* 277:296-300.
- Johnsen J, Morland J. (1991) Disulfiram implant: a double-blind placebo controlled follow-up on treatment outcome. *Alcohol Clin Exp Res* 15:532-536.
- Johnsen J, Stowell A, Stensrud T, Ripel A, Mørland J (1990) A double-blind placebo controlled study of healthy volunteers given a subcutaneous disulfiram implantation. *Pharmacol Toxicol* 66:227-230.
- Johnson B y Ait-Daoud N (2000) Neuropharmacological treatment for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl)* 149:327-344.
- Kamath R, Martínez-Campos M, Zipperlen P, Fraser A y Ahringer J (2000) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2:1-10.
- Kappel S, Matthess Y, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K (2006) Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi- Cassettes. *Nucleic Acids Res* 34:4527-4536.
- Karahanian E, Ocaranza P, Israel Y (2005) 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
- Kashima Y, Nakajima Y, Nakano T y Tayama K (1999) Cloning and Characterization of Ethanol-Regulated Esterase Genes in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of bioscience and bioengineering* 87:19-27
- Kenna GA, McGeary JE, Swift RM (2004) Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 1. *Am J Health Syst Pharm.* 61:2272-2279.
- Klyosov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM (1996) Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry* 35:4445-4456.
- Krom YD, Fallaux FJ, Que I, Lowik C, van Dijk KW (2006) Efficient in vivo knock-down of estrogen receptor alpha: application of recombinant adenovirus vector for delivery of short hairpin RNA. *BMC Biotechnology* 6:11.
- Laaksonen E, Koski-Jännes A, Salaspuro M, Ahtinen H, Alho H (2008) A randomized, multicentre, open-label, comparative trial of disulfiram, naltrexone and acamprostate in the treatment of alcohol dependence. *Alcohol Alcohol.* 43:53-61.

- Lands WE.(1998) A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*. 15:147-160.
- Lewin B (1997) *Genes VI*, pág. 875-883. Oxford University Press and Cell Press. New York.
- Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R (2006a) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17337-17342.
- Li M, Li H, Rossi JJ.(2006b) RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1082:172-179.
- Li TK (2000) Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. *J Chromatogr* 382:57-66.
- Lieber CS. (1999) Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 23:991-1007.
- Lin X, Yang J, Chen J, Gunasekera A, Fesik SW, Shen Y (2004) Development of tightly regulated U6 promoter for shRNA expression. *FEBS Letters* 577:376-380.
- Litten RZ, Allen J, Fertig J (1996) Pharmacotherapies for alcohol problems: a review of research with focus on developments since 1991. *Alcohol Clin Exp Res*. 20:859-876.
- Lu S, Cullen BR (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol* 78:12868-12876.
- Luo HR, Israel Y, Tu GC, Eriksson CJ, Zhang YP (2005) Genetic polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in a Chinese population: gender, age, culture, and genotypes of ALDH2. *Biochem Genet*. 43:223-227.
- Madan A, Parkinson A, Faiman MD (1995) 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.
- Matsumoto H, Fukui Y. (2002) Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict Biol* 7:5-14.
- Mays DC, Nelson AN, Lam-Holt J, Fauq AH, Lipsky JJ (1996) 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.

Meissner W, Rothfels H, Schäfer B, Seifart K (2001) Development of an inducible pol III transcription system essentially requiring a mutated form of the TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 29:1672-82.

Minks, M, Benveniste, S, Maroney, P and Baglioni C (1979) Synthesis of 2'5'-oligo(A) in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254:5058-64

Mittereder N, March KL, Trapnell BC (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol.* 70:7498-7509.

Mizoi Y, Tatsuno Y, Adachi J, Kogame M, Fukunaga T, Fujiwara S, Hishida S y Ijiri I (1983) Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. *Pharmacol Biochem Behav* 18:127-133.

Montgomery M, Xu S y Fire A (1998) RNA as a target of double stranded RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15502-15507.

Morrall N, O'Neal W, Rice K, Leland M, Kaplan J, Piedra PA, Zhou H, Parks RJ, Velji R, Aguilar-Córdova E, Wadsworth S, Graham FL, Kochanek S, Carey KD, Beaudet AL (1999) 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 U S A* 96:12816-12821.

Morsy M y Caskey T (1999). Expanded- capacity adenoviral vector – the helper dependent vector. *Mol Med Today* 5:18-24.

Murphy S, Liegro C & Melli M (1987) The *in vitro* transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of the upstream promoter. *Cell.* 51:81-87.

Myslinski E, Amé J, Krol A & Carbon P (2001) An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of human H1 RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 29:2502-2509.

Napoli C, Lemieux C y Jorgensen R (1990) Introduction of chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Mol Biol* 31:957-973.

Ocaranza P, Quintanilla ME, Tampier L, Karahanian E, Sapag A, Israel Y (2008) Gene therapy reduces ethanol intake in an animal model of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1-6.

Ohrt, Merkle, Birkenfeld, Echeverri y Schwillle (2006) In situ fluorescenc analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleos by exportin 5. *Nucleic Acids Research* 34:1369-80

Paddison P, Caudy A y Hanon G (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1443-1448.

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

Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20:505-508.

Paule M y White R (2000) Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research* 28:1283-1298.

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

Poulsen E, Loft H, Andersen S y Andersen J (1992) Disulfiram therapy – adverse drug reactions and interactions. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 369:59-66.

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

Quintanilla M, Sepúlveda S y Tampier L (1993) Effect of diet and disulfiram on acetaldehyde blood levels after ethanol in UChA and UChB rats. *Alcohol* 10:381-385.

Reddy Ram (1988) Transcription of a U6 small nuclear RNA gene *in vitro*. *J Biol Chem* 263:15980-15984.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330.

Ro S, Hwang SJ, Ordög T, Sanders KM (2005) Adenovirus-based short hairpin RNA vectors containing an EGFP marker and mouse U6, human H1 or human U6 promoter. *Biotechniques* 38:625-627.

Robertson HD, Mathews MB. (1996) The regulation of the protein kinase PKR by RNA. *Biochimie.* 78:909-914.

Rossi J (2006) RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques, Suppl*:25-29.

Sambrook J, Fritsch E y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Segunda Edición.

Schaarschmidt S, Qu N, Strack D, Sonnewald U y Hause B (2004) Local Induction of the alc Gene Switch in Transgenic Tobacco Plants by Acetaldehyde. *Plant Cell Physiol.* 45:1566–1577

Scherer L, Rossi JJ, Weinberg MS. (2007) Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther* 14:1057-1064.

Schubert, Grunweller, Erdmann y Kurreck (2005) Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions. *J Mol Biol* 348:883–93

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

Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore J, Schelter J, Burchard J, Linsley P, Aronin N, Xu Z, Zamore PD (2006) Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet* 2:1307-1318.

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

Song J Pang S, Lu Y, Chiu R (2004) Poly(U) and polyadenylation signals are interchangeable for terminating the expression of shRNA from a pol II promoter. *Biochem Biophys Res Communi* 323:573-578.

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

Svoboda P, Stein P y Schultz R (2001) RNAi in oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 287:1099-1104.

Takeshita T, Yang X y Morimoto K (2000) The ALDH2 genotype, alcohol intake and liver-function biomarkers among Japanese male workers. *Human Genetics* 106:589-593.

Tang RS, Draper DE (1994) On the use of phasing experiments to measure helical repeat and bulge loop-associated twist in RNA. *Nucleic Acids Res* 22:835-841.

Tank AW, Weiner H, Thurman JA. (1981) 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.

Téllez C y Santis R (1994) Impacto médico-social del alcoholismo y su prevención. Centro de Estudios Públicos. Documento de Trabajo nº 215 pp 1-22.

Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, Mai XL, Jerome RE, Li TK, Wang SP, Lin YT, Lu RB y Yin SJ (1991) Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am J Hum Genet* 48:677-681.

Toietta G, Mane VP, Norona WS, Finegold MJ, Ng P, McDonagh AF, Beaudet AL, Lee B (2005) Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3930-3935.

Tu GC y Israel Y (1995) Alcohol consumption by Orientals in North America is predicted largely by a single gene. *Behav Genet* 25:59-65.

Tuschl T, Zamore P, Lehmann R, Bartel D y Sharp P (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev* 13:3191-3197.

Umulis DM, Gürmen NM, Singh P, Fogler HS.(2005) A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. *Alcohol* 35:3-12.

Vasiliou V, Bairoch A, Tipton K y Nebert D (1999) Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 9:421-434.

Watanabe T, Umehara T, Kohara M (2007) Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1263-1276.

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

Westerhout y Berkhout (2007) A systematic analysis of the effect of target RNA. *Nucleic Acids Res* 35:4322–30

Williams SH (2005) Medications for treating alcohol dependence. *Am Fam Physician*. 2005 2:1775-1780.

Xia T, SantaLucia J, Burkard M, Kierzek R, Schroeder S, Jiao X, Cox C and Turner D (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplex with Watson-Crick bases pairs. *Biochemistry* 37L:14719-14735.

Xia X, Zhou H, Samper E, Melov S, Xu Z (2006a) Pol II-Expressed shRNA knocks down *Sod2* gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *Plos Gene* 2:73-80.

Xia X, Zhou H, Xu Z (2006b) Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can Knock down the expression of multiple target genes. *Biotechniques* 41:64-68.

Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu L y Chang C (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251:549-557.

Yourick JJ y Faiman MD (1991) Disulphiram metabolism as a requirement for the inhibition of rat liver mitochondrial low  $K_M$  aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 42:1361-1366.

Yuan J, Wang X, Zhang Y, Li N (2006) shRNA transcribe by RNA pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol Biol Rep* 33:43-49.

Zamore P, Tuschl T, Sharp P y Bartel D (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.

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

Zhou H, Gang X, Xu Z (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res* 33:e62.

Zhou J, Weiner H (2000) 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. *Biochemistry* 39:12019-12024.

Zuker M (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244:48-52.