



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**VECTORES VIRALES AAV PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO:
INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL EN
CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANAS**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCION INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ANAMARÍA CONSTANZA SÁNCHEZ DAZA

PROFESORES GUÍAS:
Dr. JUAN ASENJO DE LEUZE
Dra. BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
Dr. PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ
Dra. ZIOMARA GERDTZEN HAKIM
Dra. ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2017

VECTORES VIRALES AAV PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO: INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANAS

El alcoholismo es un grave problema socio-económico. El costo asociado al abuso del alcohol se ha estimado en 1.300 millones de dólares para la economía chilena y en 185 billones para Estados Unidos, costo que se debe principalmente a la pérdida de la productividad, tratamientos médicos y costos sociales.

El etanol es metabolizado en el hígado en dos pasos. El primero depende de la enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH) y el segundo de la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH2). En individuos de la población asiática existe una alta prevalencia de una mutación en el gen de la ALDH2, por lo que tienen una capacidad reducida para metabolizar el acetaldehído, produciendo fuertes efectos como mareos, hipotensión, palpitaciones, etc. Esto resulta en un rechazo al consumo de etanol y protección frente al alcoholismo. Este fenómeno sugiere que la modulación de la expresión de la ALDH2 mediante tecnologías genéticas puede resultar en un fenotipo similar.

Por lo tanto, la terapia génica se presenta como una alternativa atractiva para el tratamiento del alcoholismo, simulando el fenotipo asiático, mediante la inhibición específica de la enzima ALDH2, utilizando vectores virales codificantes de un shRNA como herramienta silenciadora.

Los virus adeno-asociados (AAV) han sido utilizados como poderosas herramientas para la transferencia de genes en estudios in vivo, en modelos animales y en ensayos clínicos en humanos, con resultados prometedores. La única terapia génica aprobada en el mundo occidental para comercialización es Glybera y está formulada con vectores AAV. En este trabajo se utilizaron vectores scAAV2 que codifican un ALDH2 shRNA, para silenciar la expresión del gen de ALDH2 en líneas celulares humanas.

Las líneas celulares HEK-293 y HepG2 se infectaron con el virus scAAV2/shRNA resultando en una reducción de la expresión de ALDH2 a nivel de RNA y proteínas en las dos concentraciones virales probadas (1×10^4 y 1×10^5 vg/cel) cada una probada en dos periodos de tiempos. En ambas líneas celulares los niveles de RNA de ALDH2 se redujeron en un 90% y la expresión a nivel proteico se inhibió en un 90% y 52% respectivamente, cinco días después de la infección. Las células HepG2 VL17A (ADH+) tratadas y expuestas a etanol mostraron un aumento de hasta el 50% en los niveles de acetaldehído.

Estos resultados sugieren que la terapia génica puede ser una herramienta útil para el tratamiento del alcoholismo, a través del silenciamiento de la expresión de ALDH2 utilizando tecnología shRNA entregada las células por vectores AAV.

ABSTRACT

AAV GENE THERAPY FOR ALCOHOLISM: INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ALDEHYDE DEHYDROGENASE ENZYME EXPRESSION IN HEPATOMA CELLS.

Alcoholism is a serious socio-economic problem. The cost associated with alcohol abuse for the Chilean economy is estimated at USD\$1300 million, in the USA alcoholism costs \$185 billion mainly due to lost productivity, health care and associated societal ills.

The process by which ethanol is metabolized in the liver occurs in two steps. The first step depends on the enzyme Alcohol dehydrogenase (ADH) and the second step is catalyzed by the enzyme Aldehyde dehydrogenase (ALDH2). Individuals of the Asian population show large prevalence of a mutation in ALDH2 and they have a diminished capacity to metabolize acetaldehyde, producing strong effects including dizziness, hypotension, and palpitations. This results in an aversion to alcohol intake and protection against alcoholism. This phenomena strongly suggests that modulation of ALDH2 expression by genetic technologies could result in a similar phenotype.

Gene therapy has emerged as an alternative for alcoholism treatment, mimicking the Asian phenotype, through the specific inhibition of the ALDH2 enzyme, using viral vectors coding a shRNA as a silencing tool.

AAV viral vectors have been used as powerful tools for gene delivery *in vivo* studies, animal models and clinical trials, with promising results. The only gene therapy approved for commercialization in the western world is Glybera formulated by AAV vectors. We utilized scAAV2 vectors encoding ALDH2 shRNA to silence ALDH2 gene expression in human cell lines.

Human cell lines HEK-293 and HepG2 were transduced with scAAV2/shRNA showing a reduction in ALDH2 RNA and protein expression with the two viral concentrations tested (1×10^4 and 1×10^5 vg/cell) at two different time points. In both cell lines ALDH2 RNA levels were reduced by 90% and protein expression was inhibited by 90% and 52%, respectively five days post infection. Transduced HepG2 VL17A cells (ADH+) exposed to ethanol resulted in a 50 % increase in acetaldehyde levels.

These results suggest that gene therapy could be a useful tool for the treatment of alcoholism by knocking down ALDH2 expression using shRNA technology delivered by AAV vectors.

DEDICATORIA

*A dos grandes mujeres,
mi mamá y mi abuela*

AGRADECIMIENTOS

La realización del Doctorado fue un largo proceso de aprendizaje, en el cual se formularon miles de preguntas, se realizaron interminables discusiones, se vivieron incontables frustraciones. Estas preguntas no se hubiesen convertido en respuestas, ni las discusiones en conclusiones, ni las frustraciones en logros; si no hubiese sido por el apoyo de cada una de las personas que participaron en este proceso:

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores de tesis Dr. Juan Asenjo y Dra. Barbara Andrews por la confianza entregada y por el apoyo incondicional. También agradecer a los integrantes de la comisión evaluadora Dr. Pablo Caviedes, Dra. Ziomara Gerdtzen y especialmente, Dra. Oriana Salazar por sus valiosas recomendaciones. Además agradecer a los profesores del departamento IQBT, Dra. María Elena Lienqueo y Dr. Álvaro Olivera.

I am grateful of Dr. Richard Jude Samulski, who received me in his laboratory at University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina, USA. I wish to thank to my labmates and especially to Matt Hirsh and Chengwen Li for their advice and guidance during my internship.

Quiero agradecer a TODOS los integrantes del CeBiB, a los que hemos compartido por años este camino y a los que recién comienzan, por hacer los días agradables y por estar siempre dispuestos a ayudar, en especial a Federico Hartmann, Javier Gimpel, Marcela Antipán, Franco López, Anett Rubio, Diego Lagos y Jean Castro.

A las integrantes “senior” Vida Rodríguez, Carolina Contador, Natalia Jiménez, Cristina Ravanal y Camila Wilkens, por su linda amistad. A mis queridos maestros de cultivo Alicia Lucero y Sergio Mercado, gracias por la confianza y apoyo brindado de principio a fin. A Noemí Miranda, Irene Roman, Paz Zañartu y especialmente a Nancy Carrasco, muchas gracias por su imprescindible apoyo.

A mis amigos que me han acompañado en este camino, Rodrigo, Dani, Nube, Naty, Lore, Xino, Gonzi, Pablito, Panchi, Icha... To my North Carolina's friends Giselle, Alonso, Katie, Lex, Shamsa, Destinee and Melissa thank you for made me feel like in home.

A mi familia, mis primas y primos, tías y tío, mi papá, mi abuela y especialmente y con mucho cariño a mi madre, por su apoyo incondicional.

Finalmente, agradecer a Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT por su apoyo financiero a través de Concurso Becas de Doctorado en Chile, Año Académico 2012 (#21120422), gastos operacionales y pasantía en el extranjero (2015); CONICYT + PAI/ Concurso Nacional tesis de Doctorado en el sector productivo, convocatoria 2015 (#7815120002); Concurso Beca Asistencia a Eventos para estudiantes de doctorado, convocatoria 2017 (#81170036); Proyecto Basal de CONICYT (#FB0001), Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB.

TABLA DE CONTENIDO

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

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

ÍNDICE DE FIGURAS

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

ÍNDICE DE TABLAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Alcoholismo y sus consecuencias

El consumo de alcohol data desde el periodo Neolítico. Los brebajes alcohólicos pueden, incluso, haber precedido al pan como alimento básico (Rietschel et al., 2013). En la naturaleza diferentes alcoholes se producen por la fermentación de los azúcares de las frutas, principalmente mediante levaduras. El principal alcohol producto de la fermentación es etanol. Se cree que el rol que cumplía el etanol en las frutas era actuar como inhibidor del crecimiento microbiano (Dudley, 2000).

Animales frugívoros pueden utilizar esta sustancia como estimulante sensorial para la localización de recursos y para ganancia calórica, adicionalmente puede representar una recompensa nutricional directa, aportando 7,1 [kcal/g] lo que correspondería a casi el doble de los carbohidratos, que aportan 4,1 [kcal/g]. Una persona alcohólica puede obtener más del 50% de las calorías diarias provenientes del consumo de alcohol (Bebb et al., 1971; Lieber, 2009).

El alcohol es rápidamente absorbido desde el estómago, el intestino delgado y el colon. Se alcanza la máxima concentración sanguínea dentro de 30 a 90 minutos después de la ingesta. El alcohol se distribuye uniformemente a través de los tejidos y fluidos corporales y se elimina principalmente por el sistema renal, el tracto urinario, la exhalación y el metabolismo. Cuando se consume alcohol pasa del estómago e intestinos a la sangre, luego es metabolizado por enzimas, principalmente en el hígado, donde es convertido a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y rápidamente a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). La mayoría del alcohol se metaboliza en el hígado, pero una pequeña fracción se mantiene sin metabolizar, permitiendo la medición de la concentración de alcohol en el aliento y orina. El hígado solo puede metabolizar una cierta cantidad del alcohol por hora, independiente de la cantidad consumida. Esta capacidad depende de la actividad de las enzimas, las cuales varían entre individuos, debido a polimorfismos genéticos (Rundio et al., 2013).

En la población asiática existen individuos que presentan una mutación del gen que codifica para la isoenzima ALDH2, por lo que tienen una capacidad reducida para degradar el acetaldehído y, en consecuencia, al consumir alcohol presentan alta concentración de acetaldehído en la sangre. La presencia de altos niveles sanguíneos de este metabolito genera una fuerte reacción adversa que presenta síntomas como dolor de cabeza, náusea, vómitos, taquicardia, hipotensión y rubor facial, impidiendo el abuso en el consumo de alcohol (Mizoi et al., 1983).

1.2 Problemas de salud asociados al alcoholismo

Un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado correlación entre el consumo excesivo de alcohol y el factor de riesgo tanto como para el cáncer del tracto gastrointestinal superior (cavidad bucal y esófago) como para el cáncer de hígado, colorrectal, páncreas y algunos otros órganos (Jelski et al., 2008).

La fibrosis y cirrosis hepáticas deben ser las consecuencias más serias del abuso en el consumo de alcohol, alcanzando el 50% de las muertes por enfermedades hepáticas. Además la cirrosis hepática es el principal precursor del carcinoma hepatocelular, el cual es el octavo cáncer más frecuentemente diagnosticado (McKillop et al., 2005).

El consumo excesivo de alcohol es una de las principales causas de la pancreatitis crónica y un factor de riesgo para la diabetes *mellitus* tipo 2, ambas enfermedades relacionados con el cáncer de páncreas. El alcohol y sus metabolitos (acetaldehído y esteres etílicos de ácidos grasos) pueden alterar las vías metabólicas implicadas en la respuesta inflamatoria y la carcinogénesis. Estos diversos efectos metabólicos del alcohol pueden interactuar con otros factores de riesgo (factores genéticos, dietéticos, ambientales y de estilo de vida) dando lugar a pancreatitis y diabetes *mellitus* aguda y crónica, que son factores que afectan el proceso de la carcinogénesis hacia el desarrollo de cáncer de páncreas (Go et al., 2005).

Con respecto a las patologías cardiovasculares, el alcohol puede causar hipertensión, aumentar el riesgo de enfermedades de las arterias coronarias e infartos, cardiomiopatías con falla cardíaca y arritmias (Carr, 2011; Krishnamoorthy et al., 2009).

El uso leve a moderado de alcohol tiene numerosas consecuencias negativas para la función reproductiva tanto femenina como masculina (Emanuele et al., 1998, 2002). Estudios en animales han demostrado que el consumo de alcohol altera la pubertad femenina y que beber durante este periodo también puede afectar el crecimiento y la salud de los huesos. Posterior a la pubertad el alcohol puede interrumpir el ciclo menstrual normal y afectar los niveles hormonales postmenopausia (Emanuele et al., 2002).

En el caso del sistema reproductor masculino, la ingesta de alcohol puede provocar efectos negativos en todos sus niveles (hipotálamo, glándula pituitaria anterior y testículos), pudiendo causar impotencia, infertilidad y reducir los caracteres sexuales secundarios. En los testículos puede afectar a las células de Leydig, las cuales producen y secretan la hormona testosterona, resultando en niveles reducidos de testosterona en la sangre. El alcohol también daña la función de las células de Sertoli que juegan un rol importante en la maduración de la esperma. En la glándula pituitaria el alcohol puede disminuir la producción y liberación de las dos hormonas críticas en la función reproductiva, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Finalmente el alcohol puede interferir en la función endocrina del hipotálamo (Emanuele et al., 1998).

Neurológicamente, el alcohol daña especialmente al sistema límbico, diencéfalo y la corteza cerebral frontal, por lo que se estima que el alcohol causa demencia. Además

interfiere con la absorción de nutrientes y vitaminas especialmente con deficiencia de tiamina, lo que se asocia con confusión mental, ataxia y pérdida de memoria síntomas de enfermedades como encefalopatía de Wernicke y/o síndrome de Korsakoff (Martin et al., 2003)

1.3 Problemas socio-económicos asociados al alcoholismo

El alcoholismo es una adicción que causa problemas sociales y económicos. En Estados Unidos se calcula que el alcoholismo tiene un costo anual para la sociedad de 185 mil millones de dólares (To, 2007) y en Chile de 3 mil millones de dólares anuales (Ministerio de Salud de Chile, 2010). Ello incluye costos indirectos: menor productividad del trabajador, cuando es un bebedor problema, por muerte prematura y ausentismo, y costos directos: gastos en salud, policía, accidentes y destrucción de activos (Olavarría et al., 2009).

1.3.1 Factores que predisponen al alcoholismo

Las causas del alcoholismo no están del todo claras, pero se ha propuesto que animales que consumen alcohol moderadamente pueden haber tenido una ventaja evolutiva debido a que aumentan su ingesta calórica (Dudley, 2000).

Para una bebida alcohólica se define la medida estándar (una unidad) aquella que contenga alrededor de 14 gramos de alcohol puro, siendo equivalente a: 350 mL de cerveza (5% alcohol), 150 mL de vino (12% alcohol) o 45 mL de licor fuerte (40% alcohol) como el tequila, el ron, el vodka o el whisky. Esta medida es útil para seguir guías de salud, pero pueden no reflejar el consumo real debido a la variación en los volúmenes consumidos o por la propia variabilidad del contenido de alcohol de cada tipo de bebida (NIAA, 2017).

Mientras que en dosis moderadas el alcohol genera efectos motivacionales y de refuerzo, en altas dosis puede generar aversión induciendo: déficit cognitivo, incoordinación motora y vómitos. En altas concentraciones el alcohol se puede unir alostéricamente a bolsillos hidrofóbicos de algunos receptores de neurotransmisores, como el receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA-A) (Enoch, 2008) y al receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (Möykkynen et al., 2012), alterando el proceso cognitivo, la consolidación de la memoria y anestesia (Robbins et al., 2006). Sin embargo, no existe una correlación directa que indique que los efectos hipnóticos y anestésicos del etanol son los que generan sus propiedades gratificantes (Enoch, 2008).

Otros estudios han mostrado que el acetaldehído producido en el cerebro, por acción de la enzima catalasa, tiene un efecto de refuerzo en el consumo de alcohol, a diferencia del acetaldehído que se acumula en el torrente sanguíneo (que no atraviesa la barrera hematoencefálica), que provoca aversión al consumo (Deitrich, 2011; Karahanian et al., 2011; Quintanilla et al., 2012).

Se han realizado diversos estudios que buscan identificar los genes que contribuyen a la dependencia del alcohol (Crabbe et al., 2006; Rietschel et al., 2013; Wang et al., 2012).

Los primeros genes identificados son aquellos relacionados con su metabolismo, tales como las enzimas alcohol deshidrogenasa ADH y aldehído deshidrogenasa ALDH (Dick et al., 2006). Otros genes identificados son los que codifican para los ya mencionados receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA-A) y los receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), algunos canales de potasio específicos y adenilato ciclasas (Rietschel et al., 2013).

Son muchos los factores genéticos que influyen en el desarrollo del alcoholismo, pero una mutación dominante simple en el gen que codifica para la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (alelo ALDH2*2) otorga una marcada protección contra el desarrollo de esta condición, debido a la acumulación de acetaldehído (T. K. Li, 2000), este polimorfismo se ha encontrado en una alta proporción de la población asiática (Chen et al., 1999). La forma más frecuente para la aldehído deshidrogenasa es la isoenzima activa (ALDH2*1) que metaboliza el aldehído generado de la oxidación del alcohol. Como la ALDH2*2 tiene menos actividad que la isoenzima ALDH2*1, los individuos que presentan el alelo protector presentan una marcada elevación de los niveles de acetaldehído cuando consumen etanol, llevando a una fuerte reacción adversa que desalienta un futuro consumo de alcohol (Ocaranza et al., 2008). Por esta razón, individuos heterocigotos ALDH2*2/ALDH2*1 están protegidos contra el abuso de alcohol y el alcoholismo entre un 66 a un 75%, mientras que los individuos homocigotos ALDH2*2/ALDH2*2 son virtualmente abstemios, casi 100% protegidos (Chen et al., 1999; Luczak et al., 2006; Ocaranza et al., 2008).

Es importante mencionar que no son sólo factores genéticos los que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad, un rol muy importante es del ambiente en que se encuentra un potencial alcohólico, influyendo este sobre todo en las primeras fases de la enfermedad (Kendler et al., 2008; Wang et al., 2012).

1.4 Enzimas metabolizadoras del alcohol y acetaldehído

La reducción de cadenas de aldehídos a alcoholes es un proceso biológico común, que permite la eliminación de compuestos reductores durante el metabolismo de las bacterias anaeróbicas, hongos y plantas. Como resultado de la fermentación producida por estos organismos, los animales se encuentran con frecuencia con alcoholes en el entorno y han desarrollado mecanismos enzimáticos para metabolizarlos. Los alcoholes son metabolizados a sus correspondientes aldehídos, los que luego pueden ser oxidados a ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos son convertidos finalmente a ésteres de acetil coenzima A (CoA) y entran a la ruta general de oxidación de grasas (Crabb et al., 1987).

Específicamente el etanol es oxidado a acetaldehído por tres vías: por la enzima citoplasmática alcohol deshidrogenasa (ADH), por la catalasa presente en los peroxisomas o por el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS). Posteriormente enzimas como la aldehído deshidrogenasa (ALDH), que se encuentran en altos niveles en el hígado oxidan, el acetaldehído a acetato el cual se transforma finalmente a acetil-CoA (Crabb et al., 1987) (Figura 1).

1.4.1 Alcohol deshidrogenasa

La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es responsable de la oxidación de aproximadamente el 90% del alcohol ingerido. Esta enzima tiene una amplia especificidad de sustrato, oxidando alcoholes primarios y secundarios. Se localiza en la fracción citosólica de la célula (Cederbaum, 2012). Es abundante en el hígado, aunque se ha encontrado en pequeñas proporciones en el tracto gastrointestinal, y en el riñón. Ha sido ampliamente estudiada, la estructura de la enzima aislada de hígado de caballo, fue resuelta mediante cristalografía de rayos-X en el año 1973 por Branden y cols. (Brändén et al., 1973). Es un dímero compuesto de subunidades de 40 kDa, cada una conteniendo dos átomos de zinc. En el caso humano se han observado varias isoenzimas para la ADH, codificadas en 3 *loci*, llamadas ADH₁, ADH₂ y ADH₃, agrupadas como ADHs de clase I (Smith et al., 1971). Además, se han encontrado polimorfismos en ADH₂ y ADH₃. El locus ADH₁ codifica la cadena α , mientras que el locus ADH₂ posee 3 alelos que codifican las cadenas β_1 , β_2 y β_3 . ADH₃ existe como dos alelos que codifican las cadenas γ_1 y γ_2 (Crabb et al., 1987).

El control de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa es complejo, debido a: la disociación del NADH producido es un paso limitante de la velocidad; además, la catálisis está sujeta a inhibición por los productos NADH y acetaldehído. También está sujeto a inhibición por sustrato a altas concentraciones de etanol.

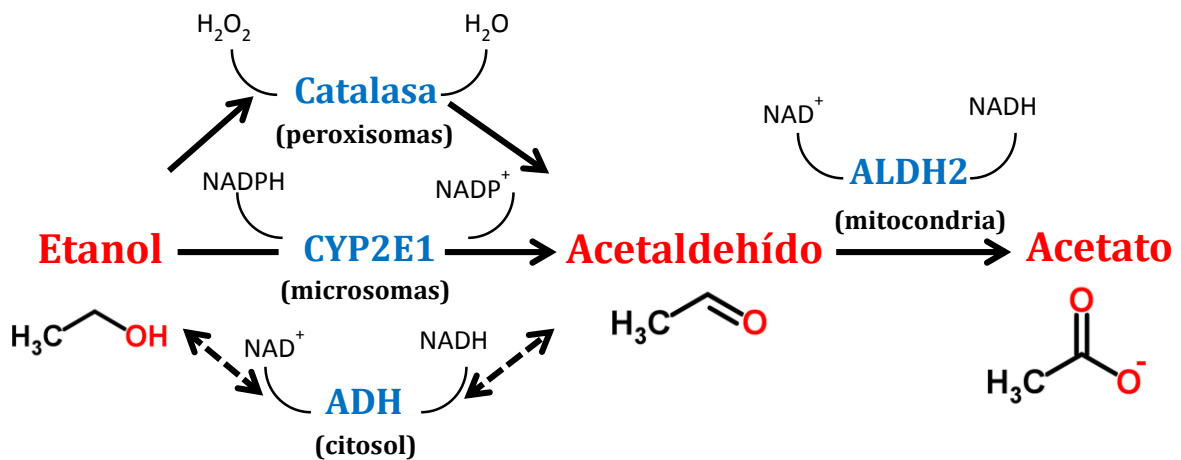


Figura 1. Metabolismo del etanol

La enzima catalasa localizada en los peroxisomas oxida el etanol a través de la conversión del peróxido de hidrógeno a agua. El sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) está localizado en el retículo endoplásmico y compuesto principalmente por el citocromo P450 2E1 inducible [CYP2E1]. La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) localizada en el citosol es la principal metabolizadora de etanol, mediante la reducción de NAD^+ a NADH en una reacción reversible. Luego, el acetaldehído es convertido a acetato principalmente por la enzima mitocondrial ALDH2.

1.4.1.1 *ADH clase I*

Existen 3 genes ADH_1 , ADH_2 y ADH_3 que codifican para las siguientes subunidades: α ($ADH1A$), β_1 , β_2 y β_3 ($ADH1B$), γ_1 y γ_2 ($ADH1C$). Estas diferentes subunidades y formas polimórficas se combinan para producir una variedad de homo y hetero dímeros. (ej. $\alpha\alpha$, $\beta_1\beta_1$, $\alpha\beta_2$). Se encuentran principalmente en el hígado y son las mayores responsables de la oxidación del alcohol debido a que poseen una K_M menor que 5 mM (Lands, 1998). En una nueva clasificación se han agrupado en 5 clases distintas, designadas $ADH1$ a $ADH5$, debido a sus características estructurales y cinéticas. Los genes humanos que codifican las subunidades peptídicas α , β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 , γ_2 , π , χ , y μ (o llamada σ) son designadas como $ADH1A$ (anterior $ADH1$), $ADH1B^*1$ (anterior $ADH2^*1$), $ADH1B^*2$ (anterior $ADH2^*2$), $ADH1B^*3$ (anterior $ADH2^*3$), $ADH1C^*1$ (anterior $ADH3^*1$), $ADH1C^*2$ (anterior $ADH3^*2$), $ADH2$ (anterior $ADH4$), $ADH3$ (anterior $ADH5$) y $ADH4$ (anterior $ADH7$), respectivamente. La $ADH5$ (anterior $ADH6$) codifica un polipéptido al cual no se le ha asignado una letra del alfabeto griego (Cederbaum, 2012).

Tabla 1. Constantes cinéticas de las isoenzimas humanas de ADH del hígado.

Adaptado de (Cederbaum, 2012).

Constante	$\alpha\alpha$	$\beta_1\beta_1$	$\beta_2\beta_2$	$\beta_3\beta_3$	$\gamma_1\gamma_1$	$\gamma_2\gamma_1$	$\pi\pi\pi$
K_M NAD ⁺ (μ M)	13	7,4	180	530	7,9	8,7	14
K_M etanol (mM)	4,2	0,049	0,94	24	1	0,63	34
K_i 4-metil-pirazol (μ M)	1,1	0,13	-	2,1	0,1	-	2000
$V_{m\acute{a}x}$ (min^{-1})	27	9,2	400	300	87	35	20
pH (óptimo)	10,5	10,5	8,5	7,0	10,5	10	10,5

La clase I de las isoenzimas de ADH realiza el rol principal en la oxidación del alcohol. La habilidad de formar isoenzimas, con diversas propiedades cinéticas, contribuye probablemente a la gran variabilidad que existe en la población humana para metabolizar el etanol. La fuerte sensibilidad de la clase I a la inhibición por pirazol explica la poderosa inhibición del metabolismo del alcohol por estos agentes (Cederbaum, 2012).

1.4.1.2 *ADH clase II y III*

Se reconocieron dos *loci* adicionales al preparar extractos de hígado de pacientes que murieron repentinamente, los genes ADH_4 y ADH_5 que codifican las cadenas π y χ respectivamente. $ADH \pi$ se ha designado como ADH clase II y $ADH \chi$ como clase III (T. K. Li et al., 1977; Wagner et al., 1984). No se han observado polimorfismos en estos *loci* (Crabb et al., 1987).

Los genes ADH_4 producen homodímeros $\pi\pi\pi$ en el hígado y en menor proporción en riñones, pulmones y está también presente en la mucosa gástrica, por lo que podría actuar como paso previo a la metabolización hepática del etanol. La generación local de acetaldehído en el estómago puede ser el responsable de la gastritis erosiva aguda inducida por el consumo de alcohol. La alta K_M de esta enzima con el alcohol hace que

esta enzima sea importante para el metabolismo a altas concentraciones de alcohol (Cederbaum, 2012).

El gen ADH5 produce homodímeros $\chi\chi$. Esta isoenzima está distribuida en varios tejidos y tiene una K_M aún más alta para el alcohol (>2 M) (Cederbaum, 2012), por lo que probablemente casi no participa en la eliminación del etanol (Crabb et al., 1987).

1.4.1.3 *ADH clase IV*

El gen ADH7 codifica la subunidad σ , la cual es eficiente oxidando retinol a retinal. Esta forma está presente en el estómago.

1.4.1.4 *ADH clase V*

El producido por el gen ADH6 está presente en hígado y estómago, pero la proteína no ha sido caracterizada (Cederbaum, 2012).

Las formas polimórficas de ADH (clase I ADH1B, ADH1C) varían en distintos grupos raciales como se muestra en la Tabla 2. A la fecha, no existen asociaciones claras entre las isoenzimas ADH y el desarrollo de enfermedades al hígado debidas al alcoholismo o a la propensión al consumo de alcohol. Estudios que han investigado la asociación entre el alcoholismo y el daño al hígado inducido por alcohol con polimorfismos en ADH2, ADH3, CYP2E1 y ALDH2 no son concluyentes. Un gran meta-análisis (Zintzaras et al., 2006) muestra que los portadores de los alelos ADH1B*1 y ADH1C*2 (las ADHs menos metabolizadoras de etanol) y el alelo altamente activo ALDH2*1 tienen un aumento en el riesgo de alcoholismo, estos hallazgos reflejan la baja acumulación de acetaldehído [26]. ALDH2*1 es un factor protector del daño hepático porque remueve el acetaldehído que es tóxico. Ni el polimorfismo en ADH2 o ADH3 fueron implicados en el desarrollo de enfermedades al hígado. Variantes alélicas de CYP2E1 no están involucradas en determinar el riesgo de alcoholismo o de enfermedades hepáticas. Más investigaciones son requeridas en este aspecto (Cederbaum, 2012).

Tabla 2. Frecuencia de los alelos ADH en poblaciones de distintas razas.

Adaptado de (Cederbaum, 2012).

	ADH1B*1 (%)	ADH1B*2 (%)	ADH1B*3 (%)	ADH1C*1 (%)	ADH1C*2 (%)
Americanos blancos	>95	<5	<5	50	50
Europeos blancos	85	15	<5	60	40
Japoneses	15	85	<5	95	5
Americanos negros	85	<5	15	85	15

Estas isoenzimas poseen distintas frecuencias en diferentes poblaciones y diversos parámetros cinéticos ADH.

1.4.2 Catalasa

La enzima catalasa contiene un grupo hemo y se encuentra en los peroxisomas de las células. Cumple un rol fundamental en la conversión de grupos oxidantes a moléculas menos reactivas, por lo que se considera una enzima antioxidante, principalmente cataliza la remoción del peróxido de hidrógeno H_2O_2 , pero también puede oxidar el alcohol (Figura 1). Esta vía de metabolización es limitada por la concentración de H_2O_2 presente en la célula en condiciones fisiológicas, por lo que oxida solo el 2% del etanol, su rol en la oxidación del alcohol en el hígado es insignificante (Cederbaum, 2012).

Los efectos producidos por el etanol en el sistema nervioso central están mediados por el acetaldehído, pero el acetaldehído sistémico producido en el hígado prácticamente no atraviesa la barrera hematoencefálica. En el tejido cerebral no se expresa la enzima ADH, por lo que la responsable de la oxidación del etanol hacia acetaldehído es la catalasa, la cual se encuentra distribuida en los peroxisomas de todo el cerebro. El acetaldehído derivado de la oxidación dependiente de catalasa en el cerebro tendría un rol importante en el desarrollo de tolerancia al alcohol, al consumo voluntario de etanol y a los refuerzos positivos del consumo, quizás por la interacción con catecolaminas, produciendo varios productos de condensación (Karahanian et al., 2011; Morales et al., 2013; Quintanilla et al., 2012, 2016).

1.4.3 Oxidación microsomal (citocromo P450)

Citocromo P450s son una familia de enzimas involucradas en la oxidación de esteroides, ácidos grasos y numerosos xenobióticos. Se encuentra en altos niveles en el hígado, principalmente en el retículo endoplásmico (fracción microsomal). Algunos P450s se encuentran también en la mitocondria. Existen muchas isoenzimas de P450, más de 100 familias de genes han sido identificadas y están organizadas según su homología. CYP2E1 es la isoenzima que tiene la más alta actividad para oxidar alcohol hacia acetaldehído. Además de etanol, CYP2E1 puede oxidar muchos otros compuestos incluyendo acetona, bencenos y otros alcoholes.

La K_M de CYP2E1 para el alcohol es 10 mM, 10 veces mayor que la K_M de ADH para etanol, pero aún se mantiene dentro de los rangos alcanzados en bebedores sociales. A bajas concentración de alcohol CYP2E1 realiza un 10% de la oxidación total de alcohol en el hígado, pero dado su alta K_M la contribución a la degradación de etanol aumenta a medida que aumenta la concentración de éste (Lu et al., 2008).

Muchas P450s son inducidas por sustrato, lo que permite la remoción de compuestos xenobióticos. Los niveles de CYP2E1 están aumentados en casos de administración crónica de etanol, por lo que es importante en pacientes alcohólicos. Se han identificado 13 polimorfismos diferentes para CYP2E1, los que podrían ser importantes factores de riesgo para la carcinogénesis o ciertas toxinas, sin embargo no hay evidencias que relacionen estos polimorfismos con la frecuencia de daño hepático (Cederbaum, 2012).

Los ciclos catalíticos producidos por CYP2E1 producen una gran cantidad de especies reactivas del oxígeno como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, lo que podría contribuir a los daños hepáticos producidos por estrés oxidativo (Lu et al., 2008).

1.4.4 Aldehído deshidrogenasa

Aldehídos endógenos son formados durante el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, aminas biogénicas, vitaminas y esteroides. Además la biotransformación de un gran número de drogas y agentes ambientales genera aldehídos. Los aldehídos son compuestos electrofílicos altamente reactivos que interactúan con grupos tiol y amino, lo que genera desde efectos fisiológicos y terapéuticos hasta citotoxicidad, genotoxicidad y mutagénesis o carcinogénesis. En este aspecto las enzimas ALDH oxidan eficientemente y en la mayoría de los casos detoxifican una cantidad significativa de aldehídos químicamente diversos. 16 genes que codifican para enzimas ALDH y 3 pseudogenes han sido identificados en el genoma humano en distintos cromosomas. Los polimorfismos en genes codificantes de enzimas ALDH humanas evidencian la importancia en las rutas de decodificación de estas enzimas, generando metabolismos alterados y enfermedades. Polimorfismos en *aldh2* son caracterizados por una disminución del metabolismo del acetaldehído, bajo riesgo de alcoholismo y un aumento en el riesgo de cáncer inducido por el consumo de alcohol (Sophos et al., 2001).

La mayor parte del acetaldehído producido en el metabolismo del etanol es oxidado por isoenzimas de la enzima aldehído deshidrogenasa, las cuales se pueden clasificar según su K_M para el acetaldehído. La mayoría de las isoenzimas están en la mitocondria, en la fracción microsomal y en el citosol. La mitocondria contiene una ALDH con baja K_M en la matriz (ALDH clase II) y una ALDH de alta K_M en la membrana externa, los microsomas contienen una ALDH de alta K_M mientras que el citosol contiene una con K_M intermedia (ALDH clase I) y una de alta K_M (ALDH clase III). El acetaldehído también puede ser oxidado por la enzima aldehído oxidasa, xantina oxidasa o por CYP2E1, pero estas vías solo metabolizan una pequeña fracción del etanol ingerido. La ALDH mitocondrial de baja K_M oxida la mayor parte del acetaldehído, aunque en el hígado humano se ha descrito que la ALDH citosólica de clase I puede contribuir (Cederbaum, 2012).

1.4.4.1 Aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2)

Esta isoenzima juega el papel más importante en la oxidación de acetaldehído *in vivo*, basado en su baja K_M ($<5 \mu M$) (Lands, 1998), facilitando una rápida eliminación del acetaldehído. El alelo más frecuente en la población es ALDH2*1. El alelo ALDH2*2 tiene una mutación dominante simple (G/C→A/T) en el exón 12 causando una sustitución E487K (Vasiliou et al., 2000), lo que causa una disminución en la afinidad por el cofactor NAD^+ , resultando en una inactivación catalítica de la enzima (Farres et al., 1994). Este alelo es frecuente, pero confinado a los individuos asiáticos. Esta enzima inactiva se puede encontrar entre un 15% a un 40% de la población del este de Asia (Chen et al., 1999). Cuando estos individuos consumen etanol, los niveles de acetaldehído en la sangre son entre 5 a 20 veces mayores que en los individuos que cuentan con el alelo

activo de la ALDH2 (Cederbaum, 2012) y exhiben el “síndrome de aversión al alcohol” (Peng et al., 2009).

Los individuos heterocigotos ALDH2*1/ALDH2*2 presentan un 15 % de actividad con respecto a aquellos homocigotos ALDH2*1/ALDH2*1 (Xiao et al., 1996). Si los individuos son homocigotos para el alelo ALDH2*2 son virtualmente abstemios (Ocaranza et al., 2008) y presentan una prevalencia 75 – 90% menor que aquellos que portan solo la isoenzima activa ALDH2*1 (Thomasson et al., 1991). Un estudio realizado en individuos de origen asiático nacidos en Estados Unidos o Canadá muestra que los heterocigotos consumen dos tercios menos alcohol que homocigotos ALDH2*1 y que los homocigotos ALDH2*2 son prácticamente abstemios (Tu et al., 1995).

En general la capacidad de la enzima ALDH2 para remover el acetaldehído excede a la capacidad de producir acetaldehído, por lo tanto los niveles circulantes de éste son usualmente bajos. El consumo crónico de alcohol disminuye la oxidación del acetaldehído debido a una disminución en la actividad de la ALDH2 o por una alteración de la función mitocondrial y además se aumenta su producción debido a una adaptación metabólica (Cederbaum, 2012).

También la enzima ALDH2 puede interactuar con compuestos exógenos de manera no catalítica como el acetaminofén (paracetamol), esta unión covalente resulta en una disminución en la actividad catalítica de la enzima, lo que contribuye a una función mitocondrial disminuida observada después de la administración de este medicamento (Vasiliou et al., 2000).

La base de la acción de ciertas drogas para la aversión al alcohol como el disulfiram o cianamida es inhibir la ALDH2. La acumulación resultante de acetaldehído causa una variedad de efectos molestos como náuseas, sudoración, vómitos y aumento de la frecuencia cardíaca (Cederbaum, 2012).

1.5 Tratamientos para el alcoholismo

El tratamiento para el alcoholismo depende del historial de la persona, su decisión de recuperarse y su entorno (Pettinati et al., 2005). Este comienza con una etapa de desintoxicación alcohólica para luego desarrollar una reducción substancial de su ingesta. Para lograr este objetivo es necesario apoyo de familia y amigos, terapia psicológica y farmacológica (Tabla 3). Uno de los grandes problemas de todas las intervenciones farmacológicas es la poca adherencia al tratamiento, especialmente en un paciente alcohólico, provocando en muchos casos que retomen el consumo. Solo tres medicamentos han sido aprobados por la FDA (*Food Drug Administration*) para el tratamiento de la dependencia de alcohol, pero son adecuados solamente para un 20% de los pacientes (Jung et al., 2006; National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2014; Zindel et al., 2014)

Tabla 3. Medicamentos para tratar la dependencia de alcohol.

Adaptado de (Miller et al., 2011).

	Aprobado FDA	Evidencia clínica	Recomendaciones clínicas
Disulfiram	Si	Baja	No se recomienda su uso rutinario
Naltrexona Acamprosato	Si	Buena	Deben ser utilizados en conjunto con terapia psicológica
Inhibidor de la recaptación de serotonina	No	Insuficiente	Recomendada para pacientes con desórdenes depresivos.
Ondansetrona Topiramato	No	Insuficiente	Recomendada para reducir la frecuencia de consumo y aumentar el periodo de abstinencia.

1.5.1 Acamprosato

Este medicamento se utiliza para reducir la ansiedad en un paciente que se encuentra en abstinencia de consumo de alcohol, fue aprobado por la FDA en el año 2004. Actúa restaurando el balance de las neuronas glutamérgicas que se han vuelto hiperexcitadas por el abuso del alcohol, específicamente bloquean el receptor glutamérgico-N-metil-D-aspartato (NMDA) y activan el receptor de ácido γ -aminobutírico tipo A. Su uso resulta en la disminución de los síntomas de la privación alcohólica, incluyendo insomnio, inquietud y ansiedad, síntomas que podrían hacer que el paciente tenga una recaída (Miller et al., 2011). La vida media de este medicamento es de 12 h, pero deben administrarse 3 dosis diarias (Center for Substance Abuse Treatment, 2009a).

1.5.2 Naltrexona

Es un antagonista de los receptores de endorfinas, disminuyendo la liberación de dopamina. La dopamina conduce a los efectos de recompensa (placenteros) del consumo de alcohol, por lo que se cree que reduce los deseos por consumirlo (Litten et al., 1996). Se utiliza en conjunto con terapia psicosocial (Miller et al., 2011). En 1994 la FDA aprobó su uso en el tratamiento de pacientes alcohólicos. Sin embargo, algunos estudios clínicos han mostrado que la terapia con Naltrexona es más efectiva que el placebo, pero no más efectiva que la terapia psicológica por sí sola y que los efectos no se ven aumentados al combinar ambos (Williams et al., 2008). Se requiere administrar una dosis diaria en el caso de Naltrexona oral y existe una solución inyectable de un mes de duración (Center for Substance Abuse Treatment, 2009b, 2009c)

1.5.3 Disulfiram

Es un medicamento aprobado por la FDA que se usa desde los años 40. Su principal modo de acción es como un agente aversivo, debido a que inhibe de manera inespecífica a las enzimas aldehído deshidrogenasas (debido a la interacción con los grupos sulfhidrilos de la enzima (Vallari et al., 1982)) y bloquea el metabolismo del acetaldehído, por lo que este se acumula en la sangre imitando el fenotipo asiático y causa efectos no placenteros si se ingiere alcohol como: sudoración, dolor de cabeza, hipotensión, palpitaciones, náuseas, vómitos, etc. La asociación de estos síntomas con el consumo de alcohol reducen los deseos de ingerir alcohol (Johnson, 2008).

Lamentablemente, la vida media del disulfiram es de 10 h, por lo que se necesita una administración periódica del fármaco para mantener inhibida a la ALDH2 (“Antabuse (disulfiram) Data Sheet,” 2017). Esto representa un inconveniente, pues los pacientes que quieren beber simplemente abandonan el tratamiento (Johnson, 2008). Este medicamento modifica otras proteínas además de la ALDH y produce reacciones adversas, las más frecuentes son hepáticas, luego neurológicas, cutáneas, psiquiátricas, entre otras (Fuller et al., 2004). 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 et al., 1991).

En la actualidad, su uso se ha reducido por sus efectos secundarios y por el bajo cumplimiento de los pacientes, debido a esto solo a un 10% de los pacientes les recetan disulfiram (Mark et al., 2003).

1.5.4 Alternativas no farmacológicas

Para enfrentar el alcoholismo se han buscado otras alternativas mediante el uso de terapia génica: el estudio de Garver y cols. (2001) muestra la prueba de principio que la inhibición específica de la expresión de la ALDH2 puede ser usada para imitar el fenotipo asiático de aversión al alcohol. Utilizando un oligo desoxiribonucleótido fosforotioato sintético antisentido contra el ARNm *aldh2*. En ratas deprivadas de agua se redujo la actividad de la ALDH2 entre un 30 a 40% y se aumentó en 4 veces el nivel de acetaldehído en la sangre, además se redujo en un 62% el consumo de alcohol (Garver et al., 2001). Sin embargo, esta terapia tiene como limitante la vida media del antisentido que es sólo de 50 horas (Zhang et al., 1996), por lo que una inhibición a largo plazo del consumo de etanol es difícil de alcanzar.

Para lograr una inhibición a largo plazo del consumo de alcohol se busca reducir los niveles de la enzima ALDH2, con la administración de vectores virales que codifiquen moléculas de ARN antisentido anti *aldh2*, inhibiendo la expresión del gen *aldh2*. Luego de la administración de estos vectores la expresión de sus genes puede durar desde semanas a meses (Morral et al., 1999).

En el estudio de Karahanian y cols. (2005) mostraron que un antisentido anti *aldh2* entregado por un vector adenoviral redujo en un 65% la actividad de la enzima ALDH2 en un cultivo de células de hepatoma de rata (H4-II-E-C3), aumentando 8 veces los niveles de acetaldehído en la sangre con respecto al control (Karahanian et al., 2005). Luego en otro estudio de Ocaranza y cols. (2008) la estrategia descrita por Karahanian y cols. (2005) se probó en ratas *Wistar* criadas como bebedoras de alcohol (UChB: Universidad de Chile Bebedoras (Quintanilla et al., 2006)). Mediante una inyección intravenosa de un vector adenoviral que transporta antisentido anti- *aldh2*, se redujo la actividad de la ALDH2 hepática en un 85% y se inhibió el consumo voluntario de etanol en un 50% durante 34 días (Ocaranza et al., 2008).

Un estudio reciente de Sapag y cols. (2016) diseñaron *hairpin ribozymes* para reducir el consumo voluntario de alcohol en un modelo de dependencia de alcohol en ratas, las ribozimas diseñadas tienen como blanco de acción el mRNA de ALDH2. Las ribozimas fueron entregadas por un vector adenoviral en las ratas bebedoras y su consumo disminuyó en un 47% y los niveles de acetaldehído se doblaron comparados con el control (Sapag et al., 2016).

Estos estudios muestran que es posible emplear diferentes herramientas para silenciar la expresión de la enzima ALDH2 y así aumentar los niveles de acetaldehído, provocando un rechazo al consumo de alcohol. Estos resultados sugieren que la terapia génica es una potente herramienta para lograr una reducción del consumo de alcohol prolongada en el tiempo y podría ser una alternativa no farmacológica para el tratamiento del alcoholismo.

1.6 Terapia génica

La terapia génica comprende el tratamiento de enfermedades genéticas o enfermedades adquiridas, mediante la entrega de un ADN codificante de una proteína terapéutica o la introducción de un ácido nucleico para interrumpir el ARN mensajero de una proteína patogénica. A diferencia de las terapias con medicamentos convencionales, en este caso se modifica el genotipo celular y no solo el fenotipo. Se han usado diversas estrategias para administrar la terapia en órganos específicos, células específicas o ambas. La entrega se logra a través de virus genéticamente modificados y/o interacciones entre receptores-ligandos y anticuerpos.

El desarrollo de una terapia génica comienza con la identificación del gen defectuoso y la clonación del gen terapéutico, generalmente se elige el cADN que codifica para la proteína completa, pero puede incluir intrones, señales de localización nuclear o señales de secreción de proteínas. Además el ADN debe contener secuencias de regulación transcripcional, un sitio de inicio de la transcripción, y una secuencia de poliadenilación para transcribir y estabilizar el ARNm.

El gen terapéutico junto con las señales requeridas es clonado en un plasmidio, el cual debe ser transportado por un “vector de entrega”. Este debe entrar a la célula blanco ya sea por la membrana plasmática o por un receptor específico. El ADN debe llegar al núcleo de la célula para ser procesado por las enzimas celulares y luego transcrito y traducido. La proteína producida puede actuar intracelularmente, como proteína de membrana o como proteína secretada. Se debe medir la eficiencia de la transferencia del gen terapéutico, cuantificando el ARNm, la cantidad de proteína y la eficiencia terapéutica (Wecker et al., 2010).

La terapia génica también se puede usar para interrumpir la traducción de un ARNm específico. En general estas terapias funcionan uniéndose al ARNm blanco y/o degradándolo mediante un antisentido o un ARN interferente (ARNi) (Wecker et al., 2010).

Los oligos antisentido son secuencias de hebra simple de entre 12 a 28 nucleótidos, modificados químicamente para aumentar su vida media. La unión de estos antisentidos al ARN complementario resulta en una degradación del ARN blanco por la enzima ARNasaH y una endoribonucleasa que reconoce el heteroduplex ARN-ADN, con lo que el ARN es degradado y la expresión de la proteína reducida, sin embargo una gran cantidad de oligonucleótidos son requeridos para un silenciamiento eficiente (Wecker et al., 2010).

El sistema de silenciamiento con ARNi toma ventaja de la maquinaria celular endógena: secuencias de doble hebra de ARN se diseñan para entrar a la célula y ser cortadas en “short interfering RNA” (siRNA) por la enzima DICER. Alternativamente siRNA sintéticos pueden ser entregados directamente a la célula, en este caso las moléculas de siRNA están unidas por un grupo de proteínas llamadas complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Las proteínas RISC desenrollan el siRNA y el ARN de hebra simple se une a un ARNm específico. RISC corta el ARNm en la región pareada con el siRNA antisentido y el ARNm es degradado (Wecker et al., 2010). Una desventaja de los siRNA

es su corta vida media, disminuyendo su capacidad de regular eficientemente la expresión génica. Para prolongar su vida media, “small hairpin RNA” (shRNA) se han desarrollado y son procesados endógenamente a siRNAs, entrando al procesamiento por RISC (Bofill-De Ros et al., 2016).

1.6.1 Pre-requisitos de la terapia génica

La aplicación de la terapia génica requiere de varias consideraciones críticas. Primero se debe seleccionar una enfermedad que típicamente no responde a tratamientos convencionales. Segundo, se debe determinar la base genética de la enfermedad identificando el gen que produce la proteína y las posibles mutaciones que este tenga. Tercero, la patofisiología de la enfermedad debe ser conocida y se debe estimar la duración de la expresión del gen exógeno. Cuarto, se deben tener métodos para la detección del ARN, proteína y funcionalidad de la proteína. Quinto, se deben desarrollar sistemas *in vitro* e *in vivo* para probar la eficacia de la transferencia genética, lo que en general requiere un modelo animal de la enfermedad. Finalmente se deben producir grandes cantidades del vector de grado farmacéutico (Wecker et al., 2010).

1.6.2 Genes integrados en cromosomas

La principal ventaja de un gen que se integra en un cromosoma es que este se puede perpetuar luego de la replicación celular. La progenie celular también contendrá los genes introducidos, logrando una expresión estable de larga duración. Esta estrategia se puede utilizar para tratar células que están en división activamente, por ejemplo en células madres (no diferenciadas), como resultado se obtiene una población de células las que se pueden auto-renovar o madurar hacia un tejido específico. Una alta eficiencia en la transferencia del gen terapéutico en células madres y una expresión estable, puede proveer la posibilidad de curar un desorden genético. Por otra parte, la inserción ocurre de forma aleatoria, por lo que podría no expresarse el gen si se integra en una región de heterocromatina condensada, en otros casos la integración del gen terapéutico podría interrumpir un gen crucial para la célula, lo que puede generar la muerte celular o podría interrumpir un gen encargado de la oncogénesis, produciendo proliferación descontrolada. La terapia génica *ex vivo* ofrece la posibilidad de seleccionar las células en que la integración cromosomal haya sido exitosa, amplificándola en cultivos celulares y monitorear su fenotipo, antes de transferir de vuelta las células al paciente (Strachan et al., 1999).

1.6.3 Genes episomales

Otros sistemas de transferencia génica están diseñados para que los genes transferidos permanezcan como elementos extracromosomales y se expresen en altos niveles. Si la célula está en división activamente, los genes transferidos pueden no segregarse igualmente a las células hijas, por lo que la expresión estable a largo plazo puede ser un problema. Por lo que este tipo de terapia no es útil para tratar desordenes genéticos. Sin embargo, para algunas enfermedades no es necesaria la expresión estable, tales como terapias contra el cáncer, en las cuales se busca atacar un tipo de célula en particular

durante un tiempo determinado, una vez que las células malignas son eliminadas, el gen terapéutico no sigue siendo necesario (Strachan et al., 1999).

1.7 Vehículos para transferencia génica

Existen diversos medios para incorporar el gen terapéutico a la célula blanco, se clasifican principalmente en virales y no virales (Figura 2). El ADN terapéutico que transfecta una célula por medio no viral, es subclonado en un plasmidio, por lo que grandes cantidades de plasmidio deben ser producidas y purificadas. Los métodos tradicionales para la transferencia *in vitro* de plasmidio mediante micro inyecciones, co-precipitación del ADN con fosfato de calcio y electroporación. Estas técnicas funcionan experimentalmente, pero son poco eficientes en cultivos primarios, por lo que es difícil usarlas para terapias *in vivo*. Se han realizado mejoras utilizando plasmidios en liposomas o plasmidios unidos a complejos ligando/receptor, anticuerpos o nano partículas. Los vectores virales son diseñados para reconocer receptores específicos para la entrada la célula y utilizan la maquinaria celular para la transcripción y traducción del gen (Strachan et al., 1999; Wecker et al., 2010).

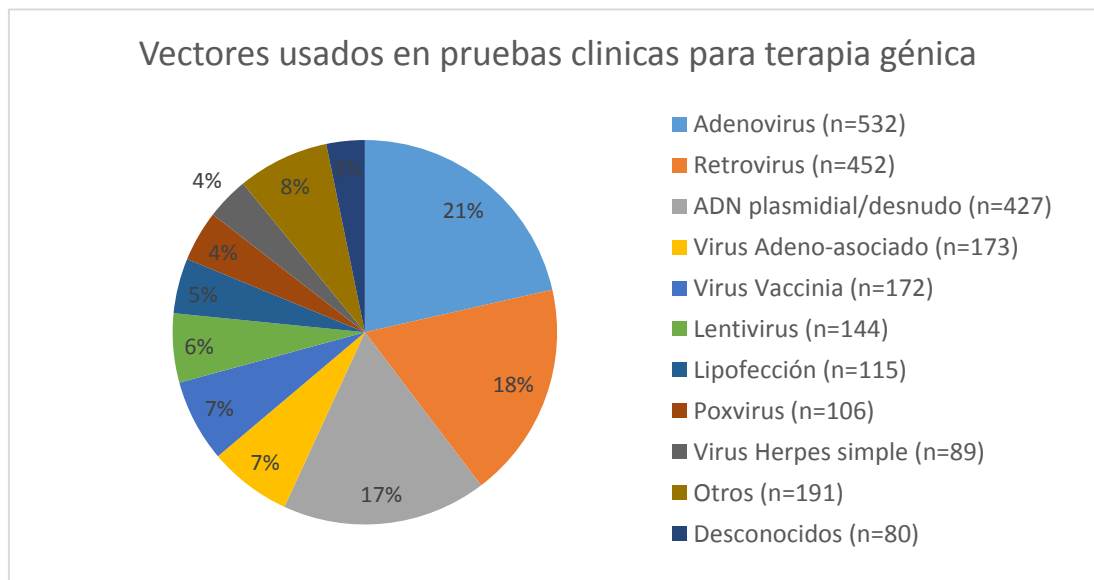


Figura 2. Vectores usados en terapia génica

Distribución porcentual de los distintos métodos usados como vectores para terapia génica (traducida de <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> 2016).

1.7.1 Vehículos basados en plasmidios

1.7.1.1 *Plasmidios ADN*

Los plasmidios presentan baja toxicidad, es una técnica simple, pero entran a la célula con baja eficiencia. De todas maneras se ha mejorado su eficiencia uniendo los plasmidios a moléculas que permiten el ingreso a la célula mediante endocitosis. Esta técnica se usa principalmente para estudios *in vitro* (Wecker et al., 2010).

1.7.1.2 *Liposomas*

Son agregados lipídicos que unen ADN, oligonucleótidos o shRNA y entran a la célula mediante la fusión con la membrana celular o por endocitosis. Existen diversos tipos de liposomas (monocapas, multicapas, neutros o cargados) y su eficiencia de transducción depende del tejido blanco. Se han combinado liposomas con anticuerpos o ligandos de receptores específicos para aumentar su eficiencia. Las ventajas de los complejos ADN-liposomas es que se pueden transferir secuencias largas de ADN y que la producción y purificación a gran escala es simple y que poseen baja toxicidad. Sin embargo, la transferencia con liposomas es menos eficiente que la transferencia mediante vectores virales (Strachan et al., 1999; Wecker et al., 2010).

1.7.2 Vectores Virales

Ningún sistema de transferencias de genes es ideal, cada uno tiene sus limitaciones y ventajas, sin embargo, los vectores virales se han preferido como vehículos de transferencia génica debido a su alta eficiencia para transducir células humanas (Wecker et al., 2010).

1.7.2.1 *Vectores oncoretrovirales*

Retrovirus son virus de ARN que poseen una transcriptasa reversa, la cual sintetiza ADN a partir de ARN. Luego de infectar a la célula blanco los retrovirus liberan un complejo de nucleoproteínas (complejo de pre-integración) en el citoplasma de la célula infectada, este complejo retro-transcribe el ARN viral y el ADN resultante se integra en un sitio en el cromosoma del hospedero. Los retrovirus son muy eficientes transfiriendo el ADN en las células y debido a que el ADN se integra se propaga establemente ofreciendo la posibilidad de una cura permanente para una enfermedad. Debido a estas propiedades los retrovirus fueron considerados como los vehículos más prometedores para la entrega de genes (Warnock et al., 2014). Sin embargo podrían ocasionar mutagénesis insercional.

Los vectores retrovirales usados tradicionalmente en terapia génica son derivados de retrovirus (oncoretrovirus) por ejemplo virus de leucemia murina. Todos los genes virales son removidos del virus, por lo que este no se puede replicar. Soportan insertos de hasta 8 kb. Sólo pueden transducir células en división, debido a que el complejo de pre-integración sólo puede interactuar con el núcleo cuando la membrana nuclear es fragmentada durante la división celular. Su uso se limita a ciertos tejidos celulares como

células sanguíneas y células del tracto gastrointestinal. La propiedad de infectar solo células en continua división puede ser beneficiosa para la terapia génica contra el cáncer de tejidos que normalmente poseen células con baja proliferación, las células cancerígenas que están en continua división pueden ser atacadas selectivamente sin dañar los tejidos normales (Strachan et al., 1999).

1.7.2.2 **Vectores adenovirus**

Los adenovirus son virus de ADN que producen infecciones en el tracto respiratorio superior y que tienen tropismo natural al epitelio respiratorio, las corneas y el tracto gastrointestinal, son el sistema de entrega más usado en ensayos clínicos. Sus ventajas son que altos títulos pueden ser producidos en cultivos, pueden infectar un amplio rango de tipos celulares, incluyendo células que no están en división. La entrada a la célula sucede mediante endocitosis por receptor (Figura 3), la eficiencia de transducción es muy alta y aceptan insertos de hasta 35 kb (Warnock et al., 2014; Wecker et al., 2010).

Sin embargo, el ADN no se integra en el genoma celular por lo que la expresión de los genes insertados sólo se realiza por un corto periodo de tiempo. La primera generación de adenovirus recombinantes usados en fibrosis quística muestran que la expresión declina después de 2 semanas y es imperceptible luego de sólo 4 semanas. Como los adenovirus pueden infectar casi cualquier tipo celular pueden plantear un riesgo en algunas terapias que están diseñados para matar células cancerosas sin causar toxicidad para las células normales circundantes. Además, los vectores de adenovirus de primera generación pueden generar respuestas inmunes no deseadas, causando la inflamación crónica (Warnock et al., 2014; Wecker et al., 2010).

Muchas de estas dificultades han sido abordadas mediante el diseño de adenovirus de segunda generación, en los que todos los genes adenovirales han sido eliminados (*gutless vectors*), por lo que requieren un virus helper para proliferar, dicho virus provee ciertas funciones virales en *trans* (enzimas encargadas de la replicación viral, ensamblaje viral) que son esenciales para una infección productiva (Crystal, 2014).

El riesgo de una respuesta inmune a estos vectores es menor, esta es una consideración importante dada la necesidad de administrar un tratamiento con frecuencia (debido a la incapacidad del adenovirus para integrar en el ADN cromosómico). Desafortunadamente, la supresión de los genes adenovirales puede también ser contraproducente. La delección de la región E3 elimina la capacidad para codificar una proteína que protege el virus de los mecanismos de vigilancia inmune en el huésped. Además, los vectores adenovirales plenamente modificados tienen una eficiencia de transducción mucho más bajos (Strachan et al., 1999).

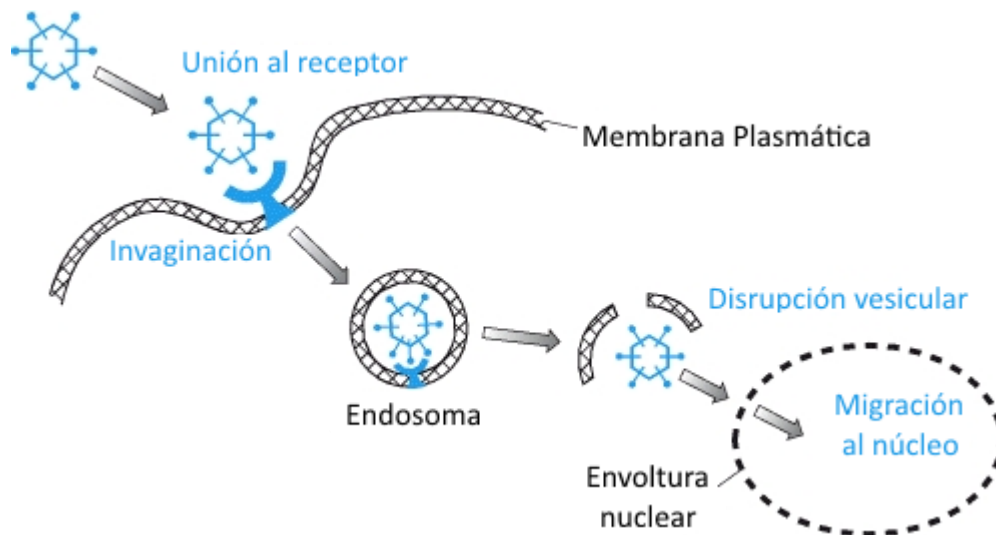


Figura 3. Adenovirus entran a la célula por endocitosis mediada por receptor

Las proteínas de la cápside se unen a un receptor específico de la membrana plasmática celular y comienza la endocitosis, en la cual la membrana se invagina para formar vesículas intracelulares (endosomas). Las proteínas virales desarman las vesículas, permitiendo su escape y posterior migración al entorno nuclear donde el ADN viral entra a través del complejo de poro nuclear (Adaptado de Strachan y cols. 1999 (Strachan et al., 1999)).

1.7.2.3 *Vectores de virus Herpes simple*

Los vectores virus Herpes simple (HSV) tienen tropismo hacia el sistema nervioso central (SNC) y pueden permanecer durante un tiempo prolongado latentes en neuronas. Tienen una capacidad de inserto relativamente alta (>20 kb) y no se integra en el genoma. Las potenciales aplicaciones son la entrega de genes en neuronas para el tratamiento de enfermedades neurológicas como Parkinson o para tratamiento contra tumores del SNC (Strachan et al., 1999).

1.7.2.4 *Lentivirus*

La familia de lentivirus, que incluye al VIH (virus de inmunodeficiencia humana) son retrovirus complejos que infectan macrófagos y linfocitos. A diferencia de los oncoretrovirus, los lentivirus son capaces de transducir células que no están proliferando. En el caso del VIH, por ejemplo, el complejo de pre-integración contiene una señal de localización nuclear que permite el transporte activo a través de los poros nucleares durante la interfase celular. Debido a su capacidad de infectar células que no están en división y de integrarse en el genoma, se han considerado como una potente herramienta para la terapia génica (Naldini, 1998).

1.7.2.5 Virus adeno-asociados

Los virus adeno-asociados (AAV) son miembros no-patogénicos de la familia parvovirus. Se caracterizan por encapsidar genomas de ADN de hebra simple (ssADN). Su genoma lineal es de aproximadamente 4,7 kb. En sus extremos posee 145 nucleótidos invertidos repetidos (*inverted terminal repeat, ITR*), que debido a su naturaleza palindrómica se pliegan formando una estructura característica de horquilla con forma de T, como se observa en la Figura 4 (Gonçalves, 2005).

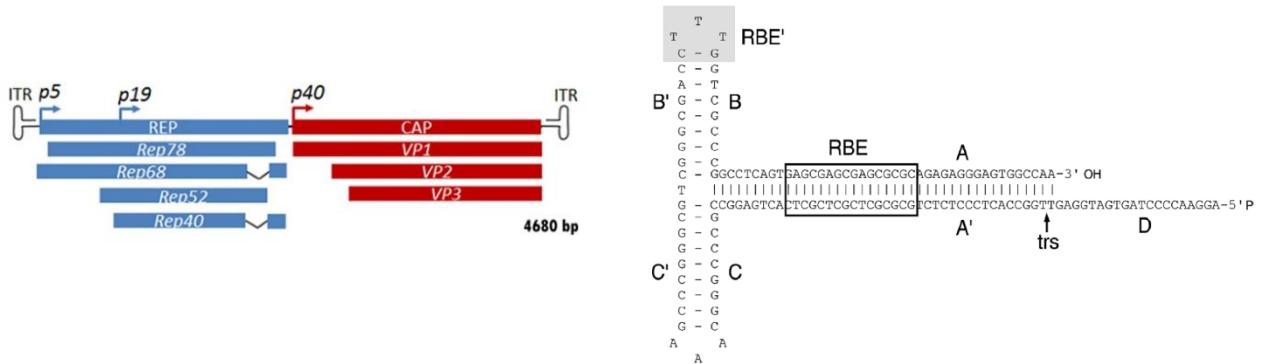


Figura 4. Mapa del genoma de AAV.

A la izquierda se presenta en forma esquemática el genoma de AAV, los ITR se representan en forma de horquilla y las proteínas virales Rep y Cap en azul y rojo respectivamente. A la derecha, se muestra en detalle la horquilla formada por un ITR, RBE es la zona de unión a la proteína Rep (encargada de la replicación) y trs es el sitio en el cual endonucleasas cortan para formar genomas ssADN. (Adaptado de Gonçalves y cols. 2005 (Gonçalves, 2005)).

A diferencia de otros vectores virales, los AAV nunca han sido asociados con alguna enfermedad humana, debido a que su replicación es naturalmente deficiente. Se han identificado numerosos serotipos de AAV. Se diferencian entre ellos por las proteínas que forman la cápside, la cual es responsable del tropismo viral, la cinética de la infección y la inmunogenicidad. El serotipo 2 es el más estudiado y más usado en pruebas preclínicas y clínicas, debido a que su genoma fue el primero en ser clonado (McCarty, 2008).

In vivo los vectores AAV del serotipo 2 (AAV2) son particularmente eficientes para infectar células diferenciadas como neuronas, miocitos, células retinales, epitelio bronquial y hepatocitos, resultando en una expresión del transgen de larga duración en modelos animales (Daya et al., 2008).

Numerosos estudios clínicos y preclínicos se han realizado utilizando vectores AAV para la transferencia de genes, para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas como la hemofilia, fibrosis quística, enfermedad de Canvas, distrofia muscular, deficiencia de α 1-antitripsina y amaurosis congénita de Leber dentro de otras. Además se han probado en el tratamiento de enfermedades adquiridas como falla cardíaca severa, enfermedad de Parkinson y artritis reumatoídea (Daya et al., 2008; Mingozzi et al., 2011; Nathwani et al., 2011).

Se han hecho experimentos usando vectores híbridos de los serotipos 2 y 8, AAV2/8, en los cuales se usa la cápside de un serotipo alternativo, serotipo 8. Aunque los serotipos AAV5, AAV8 y AAV2 son similares en capacidad para infectar y expresarse en hepatocitos Rhesus, se ha encontrado que la prevalencia de la inmunidad contra AAV8 es menor que la de los otros serotipos en humanos. Este antecedente es importante debido a que la presencia de anticuerpos neutralizantes contra AAV disminuye el éxito de la infección de hepatocitos. Los AAV8 tienen propiedades biológicas diferentes que les permiten desencapsidarse y liberar su genoma más rápido que otros serotipos (Davidoff et al., 2005). La capacidad de infección de cada serotipo es relativa al tejido/órgano/animal que se quiera infectar, por lo que es importante realizar pruebas previas para estimar la eficiencia de transducción, a modo de ejemplo el serotipo 8 tiene tropismo al hígado, pero tiene una baja eficiencia de transducción en células humanas hepáticas HepG2 (Ellis et al., 2013).

Sin embargo una infección eficiente, en términos del número de partículas que contengan y expresen su genoma en las células infectadas se ve obstaculizada por la necesidad de convertir el genoma de ADN de hebra simple (ssADN) en genoma de ADN de doble hebra (dsADN) antes de la expresión. Este paso puede ser completamente eludido mediante el uso de vectores auto-complementarias (*self-complementary* AAV, scAAV), en el cual el virus se empaqueta ADN que puede plegarse en forma de dsADN, evadiendo la necesidad de síntesis enzimática (McCarty et al., 2001).

1.7.3 Biología del virus adeno-asociado

Es uno de los virus más pequeños, sin manto y con una cápside icosaédrica de aproximadamente 22 nm. Como requieren de otro virus para replicarse se han clasificado en un género aparte de la familia *Parvoviridae* designado *Dependovirus*. A pesar de la alta sero-prevalencia de AAV en humanos (80% son seropositivos para AAV2), el virus no se ha relacionado con ninguna enfermedad humana.

Tiene un genoma de 4,7 kb que posee 145 nucleótidos terminales invertidos repetidos (ITR), que forman una estructura secundaria que expone un grupo hidroxilo 3' libre que funciona como partidor para la replicación del genoma viral. El virus no codifica polimerasa, por lo que utiliza la polimerasa de la célula hospedera para replicarse. Los ITR flanquean dos genes virales *rep* (replicación) y *cap* (cápside), que codifican para proteínas no-estructurales y estructurales, respectivamente. El gen *rep* mediante el uso de dos promotores p5 y p19 codifican para 4 proteínas reguladoras designadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Las Rep78 y Rep68 son proteínas de unión sitio-específicas al ADN y participan en el proceso de replicación mediante la interacción con las siguientes secuencias: con el elemento de unión a Rep (RBE) y el sitio de resolución terminal (*trs*) ubicadas en los ITRs, además según la presencia o ausencia de un virus *helper* pueden regular la expresión de los genes de AAV. Además actúan como endonucleasas sitio-específicas y tiene también actividad helicasa y ATPasa, que son compartidas con Rep52 y Rep40. Estas proteínas están encargadas de la generación y acumulación de genomas virales de hebra simple provenientes de intermediarios replicativos de doble hebra (Gonçalves, 2005).

El gen *cap* se transcribe desde un promotor único p40 y mediante *splicing* alternativo origina a dos transcritos. El transcrito mayor codifica la proteína virión 1 (VP1), la subunidad más grande de la cápside. El ARNm más corto posee un codón de inicio inusual (ACG), que se utiliza para generar VP2 y río abajo hay un codón de inicio convencional (AUG) que dirige la síntesis de VP3. VP1, VP2 y VP3 tienen una masa molecular aparente de 87, 72 y 62 kDa respectivamente y tienen una distribución en la cápside con simetría icosaédrica en una proporción de 1:1:10 (Gonçalves, 2005).

1.7.3.1 Infección celular

El modelo de estudio que se ha utilizado es el serotipo 2 de AAV, los cuales utilizan como puerta de entrada el receptor de proteoglicanos heparina sulfato y la internalización del virus es ayudada por los co-receptores heterodímeros $\alpha_v\beta_5$ integrina, por el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1 y por el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, c-Met. Estos receptores son los que le otorgan el tropismo al virus.

Los eventos y procesos que regulan el tráfico de las partículas AAV hacia el núcleo aún no están completamente resueltos, pero se propone que las partículas virales se internalizan mediante endosomas que debido a su pequeño tamaño pueden entrar al núcleo, mediante el complejo de poros nucleares (Gonçalves, 2005) (Figura 5).

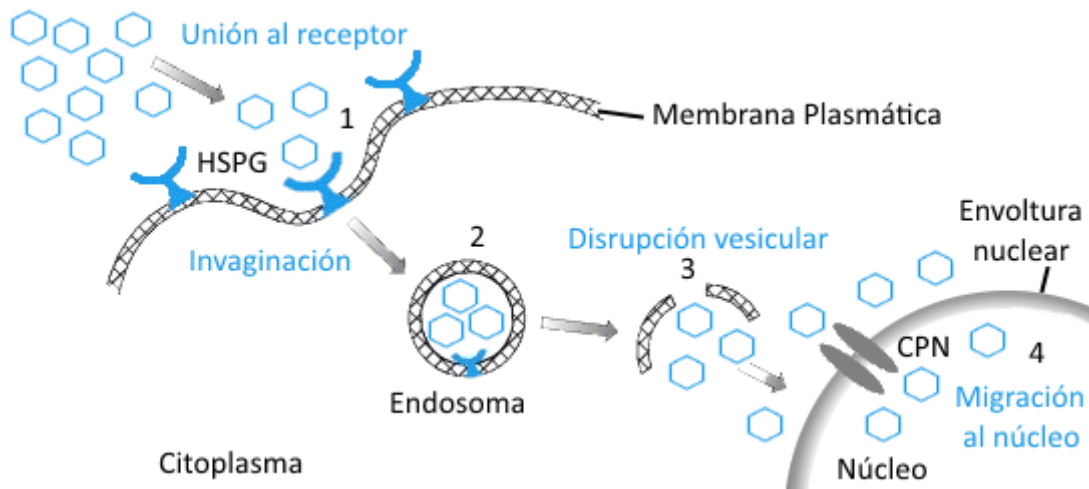


Figura 5. Representación esquemática del ciclo de infección de AAV2

(1) El virus se une al receptor proteoglicano heparina sulfato (HSPG) de la superficie celular, (2) AAV es rápidamente internalizado por vesículas revestidas de clatrina, siguiendo a la endocitosis se inicia el movimiento del endosoma y (3) luego de su acidificación el virus es liberado en el citoplasma. (4) Lentamente el virus ingresa al núcleo, probablemente mediante el complejo de poro nuclear (CPN). El genoma viral es descubierto y comienza la síntesis de ADN de doble hebra para continuar con la transcripción y traducción de este.

1.7.3.1.1 *Rutas líticas y lisogénicas*

Luego de la entrada al núcleo del huésped, AAV puede seguir una de las dos rutas de su ciclo de vida: lítica o lisogénica. La primera se desarrolla en células infectadas con un virus *helper* como adenovirus (Ad) o herpes simple virus (SV), mientras que la segunda se establece en ausencia de un virus *helper*.

Vía lisogénica: cuando una célula se infecta solo con AAV su programa de la expresión génica es auto-reprimida y la latencia se produce por integración preferencial del genoma del virus en una región de aproximadamente 2 kb en el brazo largo (19q13.3-qter) del cromosoma humano 19 designado AAVS1. Para que exista integración se necesita la presencia de los ITRs virales y Rep 78 o Rep 68.

Vía lítica: cuando una célula con una infección latente con AAV es co-infectada con un virus *helper*, el programa de expresión génica de AAV es activado, escindiendo el ADN del provirus desde el genoma del huésped mediado por las proteínas Rep, seguido de una replicación y empaque del genoma viral. El virus *helper* induce la lisis celular y los viriones son liberados. La inducción del ciclo lítico puede ocurrir en presencia de inhibidores metabólicos y/o agentes que dañan el ADN como la radiación UV o compuestos genotóxicos (Gonçalves, 2005).

1.7.3.2 **Producción y purificación**

Las partículas de AAV recombinante rAAV son generadas principalmente por el método de triple transfección. Células son transfectadas con tres plasmidios simultáneamente: un plasmidio que contiene el ADN de interés flanqueado por los ITRs virales de 145 nucleótidos, un segundo plasmidio que exprese en *trans* los genes virales *rep* y *cap* y un tercer plasmidio que posea los genes del virus *helper* necesarios para la replicación y empaque del rAAV (genes de Ad: E2A, E4ORF6 y V4). La línea celular productora debe expresar los genes de Ad E1A y E1B, siendo la más utilizada la línea HEK-293. Este método resulta más eficiente que la co-infección con un virus *helper*, pero resulta difícil de escalar, debido a la dependencia de la transfección celular. El conocimiento de la biología del virus ha mejorado el sistema de purificación, por ejemplo con la implementación de columnas de afinidad y/o columnas de intercambio iónico (Gonçalves, 2005; Lucero et al., 2017).

1.7.3.3 **Mecanismo de persistencia del vector de ADN**

El ADN entregado por AAV puede persistir por un largo periodo en órganos como el hígado o el músculo estriado, lo que se ha demostrado en diversos modelos animales, con diversos transgenes sin una toxicidad notable. Por lo que estos vectores son unos de los métodos más promisorios para terapia génica en células somáticas, por lo que han aumentado su presencia en ensayos clínicos (Gonçalves, 2005).

Es importante destacar que los vectores rAAV pierden todos los genes virales por lo que su replicación depende de la maquinaria celular del huésped. Finalmente, también es importante destacar que la naturaleza del genoma de AAV es de hebra simple, por lo

tanto la expresión del transgen ocurriría una vez que este ADN se convierta en un templado transcripcionalmente funcional de doble hebra. Estudios muestran que los genomas de hebra simple tiene una vida media muy corta dentro de la célula, porque la mayoría son reconocidos por enzimas del huésped que reconocen el ADN de hebra simple como dañado y son degradados, por lo que la conversión a hebra doble debe realizarse rápidamente luego de que el virus desensamble su cápside (Gonçalves, 2005).

Existen dos vías por las cuales el ADN del rAAV puede convertirse en doble hebra, la primera es mediante la síntesis *de novo* de la hebra complementaria y la segunda vía es la complementariedad de hebras de polaridad opuesta, debido a que la progenie viral encapsida hebras de polaridad negativa y positiva por igual. Este paso es muy importante porque existe una correlación directa entre la acumulación de templado de doble hebra con la expresión génica (Gonçalves, 2005).

1.7.3.4 **Self complementary AAV**

Investigaciones iniciales sobre los pasos limitantes para la transducción con AAV, destacan la importancia de convertir el ADN de hebra simple (ssADN) del vector a ADN de doble hebra (dsADN), antes de la expresión génica (Figura 6). Este paso crítico puede ser evadido efectivamente a través del uso de vectores *self complementary* (scAAV).

Como todos los *parvovirus* el genoma de AAV es empacado como una molécula ssADN con terminales invertidos repetidos palindrómicos que forman una horquilla dsADN en cada extremo (Figura 4). Estas sirven como origen de replicación durante la infección y como partidores para la ADN polimerasa del huésped, para comenzar la síntesis *de novo*.

La necesidad de convertir a dsADN puede ser completamente evadida empacando ambas hebras como una única molécula, esto se logra utilizando la tendencia de algunos virus para producir genomas diméricos durante el ciclo de replicación de AAV. Si estos dímeros son suficientemente pequeños se pueden empacar de la misma manera que los genomas de AAV convencionales y las dos mitades de la molécula de ADN de cadena simple se pueden plegar y formar una molécula de ADN de doble hebra con la mitad de la longitud (Le Bec et al., 2006). Aunque esto restringe aún más la capacidad viral que ya es pequeña, ofrece un aumento sustancial en la eficiencia y la velocidad de la expresión transgénica, debido a la conversión independiente de la maquinaria de la célula huésped a dsADN (McCarty, 2008; Mccarty et al., 2001).

Los primeros estudios al respecto revelaron que si el largo del ADN recombinante era menos de la mitad que el del genoma *wild type* AAV, se podía empacar dentro del virus en forma de ADN de doble hebra (Mccarty et al., 2001). Luego se dilucidó que además del largo del gen recombinante, era necesario generar una mutación en el genoma viral, específicamente en la secuencia *trs* contenida en los ITRs virales (McCarty et al., 2003) (Figura 4).

La secuencia *trs* es reconocida por la endonucleasa viral Rep, la cual corta la secuencia *trs* del ITR río abajo, generando el genoma *wild type* AAV de hebra simple (ssADN), los genomas de doble hebra son generados cuando la endonucleasa Rep es incapaz de

cortar el *trs*, por lo que al eliminar o mutar esta secuencia de uno de los ITRs virales, la enzima Rep no puede realizar su acción, generando los *self-complementary* AAV, scAAV (McCarty, 2008) (Figura 7).

La mayor ventaja es que los genomas scAAV se pliegan rápidamente después de desempacarse comenzando desde el ITR que se encuentra en el centro del genoma. Esto forma una horquilla de doble hebra con un ITR cerrado covalentemente a un extremo y dos ITR abiertos en el otro extremo. La molécula plegada imita la estructura del AAV convencional después de la conversión a doble hebra, siendo permisivo para una transcripción activa (Figura 6).

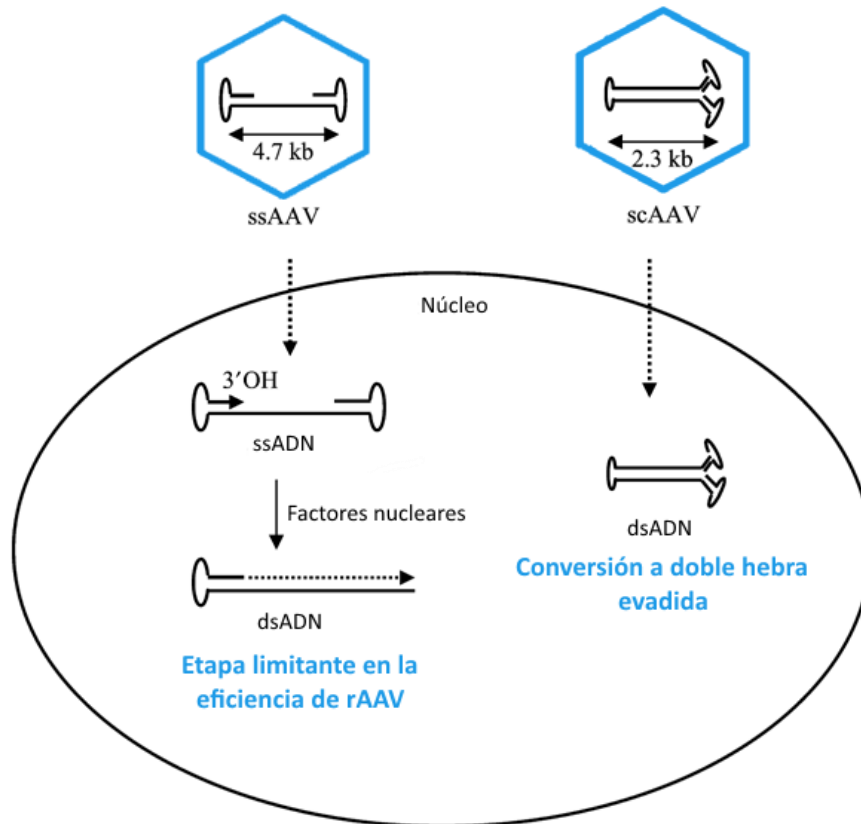


Figura 6. Genoma ssAAV y scAAV

El vector convencional (4,7 kb) contiene dos ITR flanqueando el *cassette* de expresión. El vector scAAV tienen una mutación en el sitio *trs* de uno de los ITR y el otro ITR está intacto, produciendo un genoma viral con la mitad del tamaño (2,3 kb). La conversión del genoma viral de hebra simple a hebra doble por factores nucleares es la etapa limitante en la eficiencia de infección de rAAV, esta conversión no es requerida en los vectores scAAV. Adaptado de (Le Bec et al., 2006).

El rendimiento en la obtención de genomas diméricos puede ser aumentado dramáticamente, inhibiendo la acción de la endonucleasa que hace un corte en el sitio de resolución terminal (*trs*) en uno de los ITRs. Esto se logra simplemente eliminando la secuencia *trs* de uno de los ITRs, por lo que la proteína Rep, que actúa como endonucleasa, no puede generar el corte esencial para formar el ssADN (Figura 7).

El complejo de replicación iniciado en el otro ITR entonces copia a través de la horquilla y de vuelta hacia el extremo iniciador (Figura 7, paso 5d). La replicación procede hasta el final del templado, dejando ADN de doble hebra con un ITR *wild type* en cada extremo y el ITR mutado en el centro (Figura 7, paso 6d). Esta conformación de doble hebra puede entonces someterse a rondas normales de replicación desde los dos extremos de ITR *wild type* (Figura 7, pasos 7d-9d). Cada cadena resultante comprende un ssADN con un ITR completo en cada extremo y un ITR mutado en el medio (Figura 7, paso 9d). La encapsidación de AAV se produce a partir del extremo 3'. La producción de scAAV a partir de un templado con un ITR mutado produce típicamente > 90% genomas diméricos (McCarty, 2008).

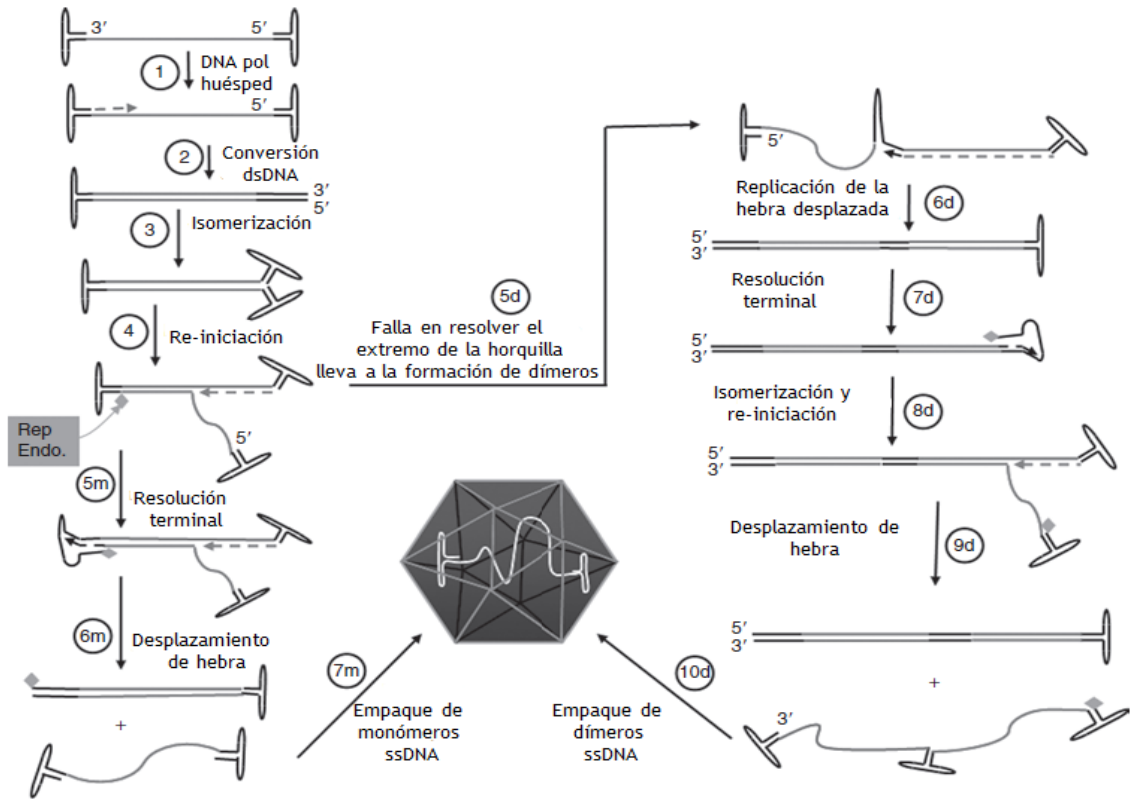


Figura 7. Ciclo de replicación del virus Adeno-asociado (AAV) y formación de genomas diméricos (scAAV).

El virión ssADN entra al núcleo de la célula huésped y el extremo 3' del ITR actúa como partidor para la ADN polimerasa del huésped (1). El partidor 3' ITR es elongado, desplazando y replicando hacia el extremo del ITR 5'. (2) El ITR dúplex es re-plegado en una configuración de doble horquilla por la ADN helicasa del huésped o la viral, formando un nuevo partidor para la síntesis de ADN. (3) Mientras el 3' ITR es elongado y la hebra complementaria es desplazada, la enzima AAV Rep endonucleasa reconoce y se une río abajo del ITR 3'. (4) Para generar genomas monoméricos completos, Rep endonucleasa corta el sitio de resolución terminal (trs) río abajo del ITR, iniciando un segundo complejo de replicación del ADN, para copiar el ITR antes de ser alcanzado por el complejo iniciado en el otro extremo. (5m) El complejo de replicación original desplaza a la hebra hija, incluyendo el nuevo sintetizado ITR, y completa la replicación hasta el final del genoma, recreando el templado para la isomerización en el paso 3. (6m) El genoma de hebra simple desplazado es empaquetado en la cápside AAV. (7m) Genomas diméricos son generados cuando Rep falla en cortar el trs antes de ser alcanzado por el complejo de replicación del otro extremo. (5d) La replicación continúa a través del ITR, y la hebra desplazada, para generar un templado dsADN dimérico (6d) el cual puede iniciar una nueva ronda de síntesis de ADN ya sea isomerizando el extremo abierto (como en el paso 4) o por la resolución terminal del extremo de la horquilla. (7d) La isomerización permite partir las síntesis de ADN desde el extremo resuelto (8d), y la replicación de los templados diméricos desplazan al genoma invertido repetido de hebra simple (9d), el cual puede ser empaquetado en el virión AAV (10d). ssADN: ADN hebra simple, dsADN: ADN hebra doble. (Adaptada de (McCarty, 2008)).

1.7.3.5 *Capacidad de los vectores scAAV*

La capacidad de empaque es un factor limitante para los vectores scAAV. Los vectores convencionales pueden encapsidar ~4,7 kb de material genético, mientras que los scAAV pueden sólo transportar la mitad. Aun así, 2,3 kb es suficiente para un gran número de aplicaciones, usando transgenes pequeños o terapias basadas en ARN (shARN, iARN, ribozimas). Por ejemplo, en los vectores scAAV se puede empacar un transgen de ~1000 pb, que codificaría una proteína de 40-55 kDa. Como el espacio es primordial, se han optimizado los elementos regulatorios de la transcripción y post-transcripción, para aumentar su eficiencia utilizando secuencias reducidas (McCarty, 2008).

El grupo de Wu (Wu et al., 2008) ha optimizado los elementos regulatorios para la expresión del factor de coagulación IX en el hígado, denominado scAAV-FIX y compararon su desempeño con el vector ssAAV-FIX, previamente caracterizado. Se compararon los niveles de expresión del factor de coagulación IX determinando el número de copias por célula y la expresión global del factor IX en el suero. Se observó un aumento de entre 2 a 4 veces del número de genomas de scAAV-FIX encontrados en el hígado, lo que permitió un aumento global de la expresión de FIX en el suero. Además, se encontró que la expresión del transgen se encontraba distribuido en todo el hígado, similar al patrón de un gen endógeno, mientras la expresión de ssAAV-FIX estaba restringida a un pequeño número de células. Se ha reportado que los scAAV son entre 5-140 veces más eficiente que ssAAV (McCarty et al., 2001).

Se han identificado varios serotipos naturales de AAV, basados principalmente en las proteínas que se encuentran en la superficie de la cápside, las cuales determinan tanto el tropismo y la eficiencia de transducción como la inmunogenicidad. El serotipo más común es por lejos el AAV2, el cual transduce efectivamente a varios tipos celulares. Como los humanos son el huésped natural de AAV2, este serotipo es altamente prevalente en la población en general, lo que puede disminuir la utilidad de AAV2 como vector terapéutico. Los resultados obtenidos en modelos animales, pueden no ser predictivos con respecto a la respuesta clínica de humanos (Mingozzi et al., 2007).

Otros serotipos como AAV8, que fue reconocido por su eficacia para transducir células hepáticas, son de baja prevalencia en la población. La prevalencia es importante porque si existe inmunidad preexistente al AAV8, disminuye considerablemente la eficacia de la transferencia génica. Se ha reportado que las proteínas de la cápside de los AAV8 son menos inmunogénicas que los AAV2 y además se desempacan más rápido después de transducir a una célula, proponiendo al serotipo 8 como una alternativa más efectiva que el serotipo 2 para la transducción de hígado (Thomas et al., 2004).

Diferentes serotipos de AAV han demostrado mediar en la transferencia de genes eficazmente hacia otros tejidos, tales como AAV8 hacia el timo, AAV6 para las células cardíacas, AAV1 para células madre hematopoyéticas y AAV3 hacia células tumorales hepáticas (Asokan et al., 2012).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis del trabajo

En el marco de búsqueda de un tratamiento no farmacológico para el alcoholismo, es posible inhibir la expresión de la enzima ALDH2 con moléculas silenciadoras codificadas y entregadas por vectores virales, provocando un aumento en los niveles de acetaldehído.

En base a este y otros antecedentes presentados en la introducción se plantea la siguiente hipótesis: Es posible utilizar vectores scAAV codificantes de un shRNA específico para inhibir la expresión de la enzima ALDH2 en líneas celulares humanas, produciendo una acumulación de acetaldehído.

2.2 Objetivo general

Estudiar los efectos de los vectores virales scAAV2, codificantes de un shRNA que tiene como blanco el ARNm *aldh2*, sobre la expresión a nivel de ARNm y proteína de la enzima ALDH2 en cultivos celulares humanos tratados, para el potencial desarrollo de una alternativa no farmacológica para el tratamiento del alcoholismo.

2.3 Objetivos específicos

- 1.- Utilizando librerías de shRNA existentes, seleccionar secuencias de shRNA que tengan complementaridad de bases con el mRNA de la ALDH2 y probar su capacidad para silenciar la expresión de la enzima ALDH2.
- 2.- Diseñar y generar los constructos plasmidiales que codifican el genoma de las partículas virales scAAV, que codificarán para un shRNA anti ALDH2.
- 3.- Realizar la producción y purificación de partículas virales scAAV serotipo 2 que codifican un shRNA anti ALDH2 con capacidad infectiva.
- 4.- Estudiar la capacidad de silenciamiento de la expresión del gen codificante de ALDH2 en líneas celulares humanas tratadas con las partículas virales scAAV desarrolladas, a nivel de mRNA y proteína.
- 5.- Evaluar el efecto del silenciamiento de ALDH2 en los niveles de acetaldehído en una línea celular hepática, metabolizadora de etanol, tratadas con las partículas virales que codifican el shRNA silenciador de la expresión de ALDH2.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño Experimental

El trabajo de tesis se enmarca en 4 áreas principales: biología molecular e ingeniería genética, cultivo de células animales, producción de vectores virales y análisis de expresión génica. En la siguiente figura se esquematiza el diseño experimental.

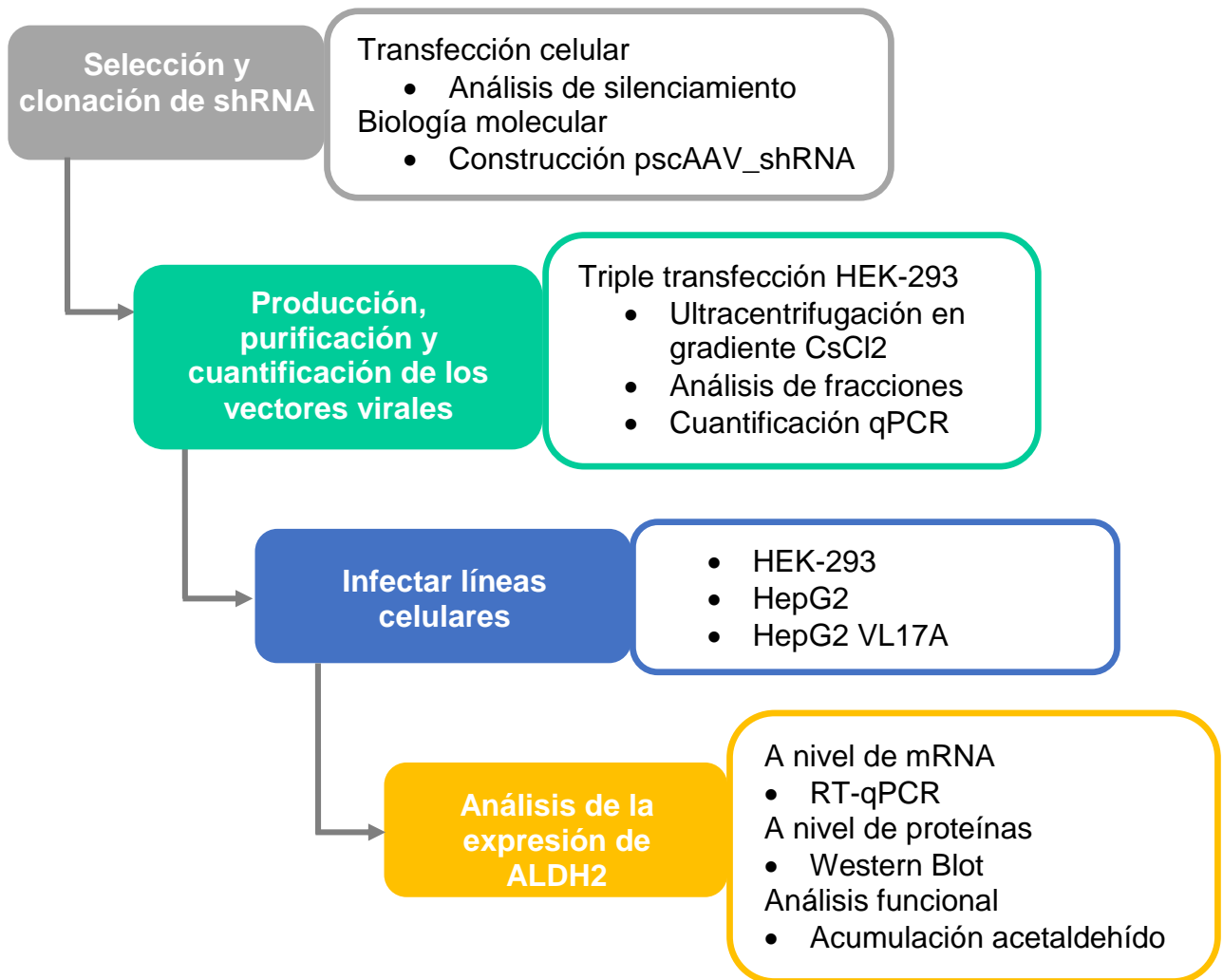


Figura 8. Diseño experimental del trabajo de tesis

El trabajo de tesis se divide principalmente en 4 etapas, de acuerdo a los objetivos planteados. Se detallan las técnicas empleadas en cada una de ellas.

A continuación se detallan las etapas indicadas en la Figura 8:

1.- Selección y clonación de secuencias codificantes para shRNA

Cinco secuencias de shRNA específicas para ALDH2, cada una clonada en un plasmidio pLX304-Blast-V5, se obtuvieron de *Lenti-shRNA Core Facility UNC*. Células HEK-293 se utilizaron como modelo por su facilidad de transfección. En experimentos independientes se co-transformaron las células con cada uno de los plasmidios codificantes de shRNA y con un plasmidio codificante de la enzima humana ALDH2. Luego de 48 h se visualizó, mediante Western Blot, la expresión de ALDH2 en cada uno de los casos. Se seleccionó la secuencia shRNA que presentó un mayor silenciamiento de la expresión proteica y se clonó en el plasmidio pscAAV, dentro de la región comprendida por los ITRs virales, bajo el control del promotor CMV.

2.- Producción, purificación y cuantificación de los vectores virales

Los vectores virales adeno-asociados se produjeron mediante la técnica de triple transfección en células HEK-293. Este método usa tres plasmidios (plasmidio rep/cap pXR2, plasmido helper pXX6-80 y el plasmidio que contiene el genoma de AAV psc_AAV_shRNA_ALDH2 (Figura 9). Las células fueron transfectadas utilizando polietilamina max (PEI-MAX) como transportador de ADN. Las células fueron colectadas 48 h después de la transfección y los virus fueron purificados por centrifugación en gradiente con cloruro de cesio, las fracciones seleccionadas se dializaron en PBS y se titularon mediante qPCR.

3.- Infección de líneas celulares

Para la transducción de las líneas celulares, las células fueron incubadas con los virus scAAV2 a la multiplicidad de infección deseada (MOI) por 1h, para luego ser sembradas en placas adecuadas para su crecimiento. La eficiencia de transducción fue seguida mediante la expresión de GFP. Luego de incubadas por el tiempo necesario para cada ensayo, fueron colectadas y lavadas con PBS y resuspendidas en el reactivo óptimo para el paso siguiente.

4.- Análisis de la expresión de ALDH2

El silenciamiento de la expresión de ALDH2 fue analizado a nivel de ARNm mediante RT-qPCR (*Retro transcription quantitative PCR*) utilizando la expresión de GAPDH como normalizador. A nivel de proteínas la expresión de ALDH2 se analizó mediante Western Blot, utilizando β -actina como normalizador. Además se realizó un ensayo funcional en una línea celular metabolizadora de etanol, en el cuál se midió la acumulación de acetaldehído en las células tratadas, mediante cromatografía de gases.

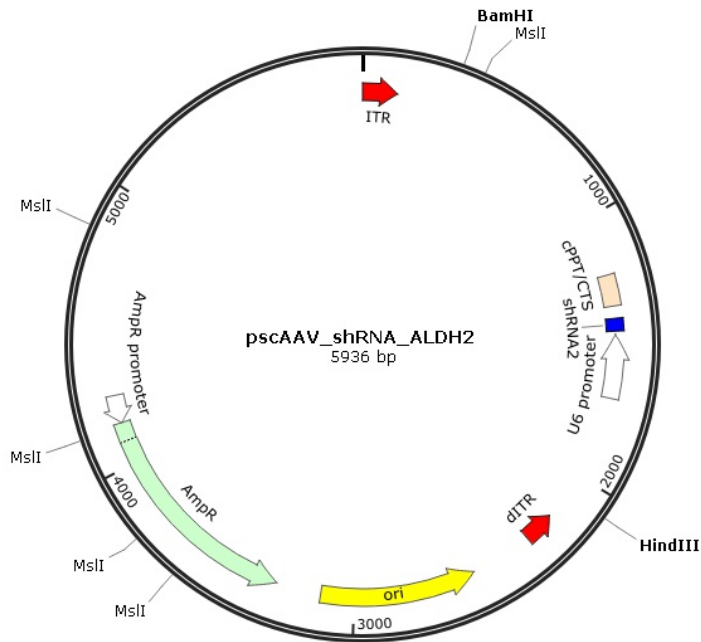


Figura 9. Plasmidio pscAAV_shRNA_ALDH2

En la parte superior se presenta el mapa circular del plasmidio que contiene el genoma viral, este se encuentra flanqueado por secuencias terminales invertidas repetidas ITR, señaladas en este caso con flechas rojas, además se señala con una flecha blanca la posición del promotor U6, en azul la secuencia que codifica para la horquilla de RNA y en rosa el tracto central de poli-purinas, que mejora la eficiencia de transducción, facilitando la importación nuclear del virus. En la parte inferior se muestra en detalle la secuencia del shRNA, destacando las secuencias sentido y antisentido.

3.2 Materiales y Reactivos

3.2.1 Cepas bacterianas

E. coli cepa TOP10, utilizada como célula quimio competente para realizar los constructos plasmidiales.

3.2.2 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies*, IDT y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Uso
GAPDH_F1	ACCACAGTCCATGCCATCAC	RT-PCR
GAPDH_R1	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	RT-PCR
ALDH2_F1	CGCCTCTTGTCAGCCGC	RT-PCR
ALDH2_R1	GTGTATGCCTGCAGCCCG	RT-PCR
GAPDH_F2	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	RT-qPCR
GAPDH_R2	TTCAGCTCAGGGATGACCTT	RT-qPCR
ALDH2_F2	TGTGTGGGTCAACTGCTATGA	RT-qPCR
ALDH2_R2	TCACTTCAGTGTATGCCTGCA	RT-qPCR
ITR1-F	AACATGCTACGCAGAGAGGGAGTGG	qPCR
ITR1-R	CATGAGACAAGGAACCCCTAGTGATGGAG	qPCR

3.2.3 Reactivos químicos generales

Tabla 5. Reactivos químicos utilizados

Proveedor	Reactivos
Agilent	Células competentes SURE
ATCC	TransfeX™ Transfection Reagent, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
Fisher	GE Healthcare Rainbow™ Molecular Weight Markers
Fermelo	Agarosa.
Invitrogen	dNTP, SuperScript™ III Reverse Transcriptase; Blasticidin
New England Biolabs	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Blunt/TA Ligase Master Mix, Quick Blunting™ Kit, Shrimp Alkaline Phosphatase, Enzimas de restricción, Gel Loading Dye, Purple (6X),
Invitrogen	T4 ADN ligase, PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit,
Thermo Fisher	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Bolt™ 12% Bis-Tris Plus Gels, 12-well Micro BCA protein assay kit, dithiothreitol ALDH2 Antibody (4G6A3), 1 Kb Plus DNA Ladder, Mammalian Protein Extraction Reagent, Opti-MEM® I Reduced Serum Medium in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), by SuperScript III RT, Lipofectamine 3000.
Qiagen (USA)	QIAEX II Gel Extraction, QIAGEN RNeasy kit y QIAprep Spin Miniprep Kit.
Sigma – Aldrich (USA)	Propionaldehído, Acetaldehído, Reactivo de Bradford
Roche Diagnostics	SYBR green Master Mix

3.2.4 Medios de cultivo

3.2.4.1 Medio Luria-Bertani

El medio LB utilizado para el crecimiento de *E. coli* contiene por cada 1 L de solución: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q y se ajustó a pH 7,0. Se esterilizó por autoclave y almacenó a temperatura ambiente.

Para la preparación de placas con medio sólido se agregó a los medios líquidos agar al 1,5% p/v. Los antibióticos se esterilizaron por filtración antes de ser agregados al medio de cultivo.

3.2.4.2 Medio DMEM/F12 y EMEM suplementados

Se utilizó para el crecimiento de células animales y consiste en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM (Gibco) con 59,3 mg/L penicilina (Gibco), 100mg/L estreptomycin (Gibco) y 10% suero fetal bovino SFB (Hyclone), pH 7,0. En algunos casos se utilizó el medio *Eagle's Minimum Essential Medium* 59,3 mg/L penicilina (Gibco), 100mg/L estreptomycin (Gibco) y 10% suero fetal bovino SFB (Hyclone), pH 7,0

3.3 Métodos

3.3.1 Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se realizaron en una cámara horizontal. Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con el amortiguador de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa a una concentración ajustada al tamaño del fragmento que se esperaba observar, estos se prepararon a concentraciones entre 0,7% y 1,5% p/v. La agarosa se preparó en amortiguador TAE 1X: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se incluyó un estándar de peso molecular de tamaño 1 kb. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 100 V. Se utilizó como amortiguador de corrida TAE 1X. Finalmente se observó el gel sobre un transiluminador UV y se fotografió.

3.3.2 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La banda de ADN se cortó del gel. Después se depositó en un tubo *Eppendorf* de 1,6 mL esterilizado por autoclave, para luego utilizar el sistema *QIAEX II Gel Extraction*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3.3 Purificación y concentración de fragmentos de ADN

Los productos de PCR y/o de digestiones se purificaron y concentraron con el sistema *QIAEX II Protocol for desalting and concentrating DNA solutions*, según las instrucciones del fabricante.

3.3.4 Ligación de fragmentos de ADN

Para la reacción de ligación se utilizó como inserto los productos de digestiones purificados desde geles de agarosa. La reacción de ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3.5 Transformación de células electrocompetentes

Se agregó 5 μ L de mezcla de ligación sobre 40 μ L de células electrocompetentes *E. coli* SURE o TOP10. Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 h y con agitación de 200 rpm. Luego se plaqueó 50 μ L sobre placas de LB agar estériles que contenían ampicilina 100 μ g/mL. Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante 16 h. Para su mantención se conservaron a 4°C.

3.3.6 Minipreparación de ADN plasmidial

El ADN plasmidial se obtuvo a partir de un inóculo en 4 mL de medio LB con ampicilina 100 μ g/mL, incubado por 16 h a 37°C a 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13.000 x por 1 min en un tubo Eppendorf de 1,6 mL (previamente esterilizado por autoclave) con 1 mL por vez. El proceso se repitió hasta obtener un precipitado de bacterias. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante.

3.3.7 Construcción de plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2

El plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2 (Figura 9) se construyó mediante la ligación del fragmento que contiene el promotor U6 y la secuencia de shRNA, obtenido del plasmidio pLKO.1_shRNA2 (Lenti-shRNA Cpre Facility,UNC) digerido con las enzimas de restricción MsiI y BamHI, en el plasmidio pSC-TTRmvmFIX digerido con las endonucleasas HindIII y BglII (esta digestión se realizó en reacciones consecutivas, con un paso intermedio de polimerización de los extremos cohesivos 5' para dejarlos como extremos romos)(Figura 10).

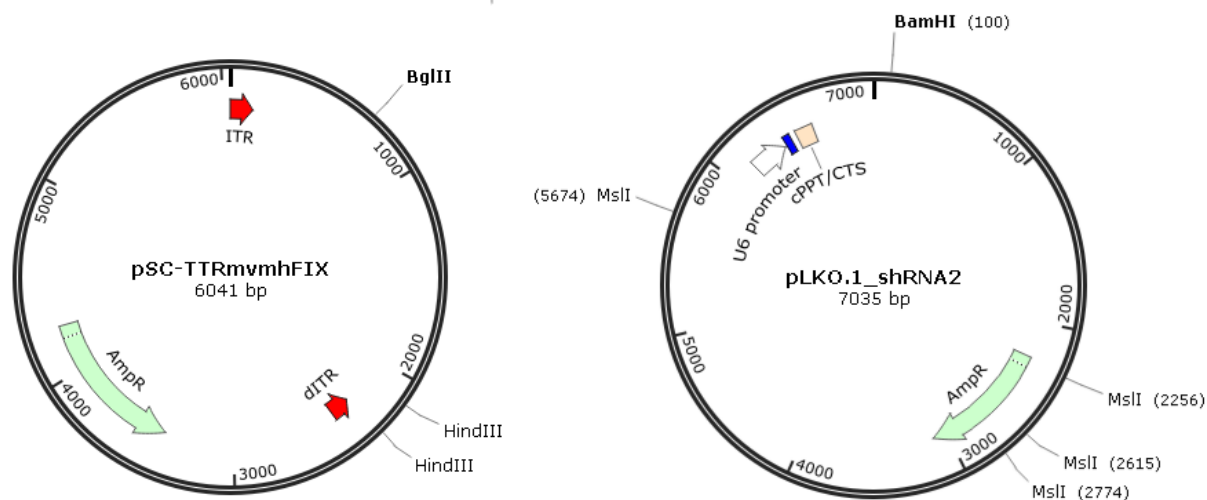


Figura 10. Mapa de los plasmidios pSC-TTRmvmhFIX y pLKO.1_ALDH2

A la izquierda se detallan los elementos del plasmidio pSC-TTRmvmhFIX (6241 pb), en rojo se destacan los ITR virales. A la derecha se presenta el plasmidio pLKO.1_ALDH2 (7035 pb), con una flecha blanca se destaca el promotor U6 y en un cuadro azul la secuencia para shRNA. Se señalan los sitios de restricción para las enzimas *Bgl*II, *Hind*III, *Bam*HI y *Msl*I.

3.3.8 Cultivo en adherencia

Las células HEK-293 se cultivaron según la necesidad en placas de 6 o 12 pocillos, frascos T de 75 o 150 mm, con un inóculo inicial de $0,3 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$, 3×10^6 y 5×10^6 células respectivamente, en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, SFB, (Hyclone) a pH 7,0. Células HepG2 y HepG2 VL17A se cultivaron en medio EMEM suplementado con 10% SFB. Las placas se mantuvieron a 37°C en incubadora a 95% de humedad y 5% de CO₂ hasta alcanzar entre 70 y 85% de confluencia. Posteriormente se realizó el pasaje de las células. Brevemente, se realizó un lavado con PBS, las células se despegaron con tripsina 0,25% p/v - EDTA 0,5 mM utilizando un décimo del volumen de cultivo, se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos, luego se resuspendió en el mismo medio de cultivo/SFB y se reinoculó en medio de cultivo/SFB fresco.

3.3.9 Transfección de células HEK-293

Las células HEK-293 se transfectaron utilizando Lipofectamina 3000 (ThermoFisher), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la generación de una línea celular estable (HEK-293/ALDH2) las células se transfectaron utilizando PEI MAX. Brevemente, la transfección se realizó cuando las células alcanzaron una confluencia del 70%; en cada placa de 10 cm se agregó: 250 µL de medio DMEM sin suero, 60 µL PEI MAX, se mezcló vigorosamente y se añadió 50 µg de ADN. Se volvió a mezclar y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se agregó gota a gota a las células adheridas a la placa. 48 h post-transfección se cambió el medio DMEM por un medio selectivo DMEM con Blastidina 10 µg/ul, de esta manera se seleccionaron aquellas células que adquirieron la resistencia al antibiótico. Como control se transformó células con un plasmidio GFP que no codifica resistencia a Blastidina, las que murieron al agregar

antibiótico al medio. Las células seleccionadas se mantuvieron en medio con Blastidina alcanzando una concentración máxima de 30 µg/ul, luego de 5 pasajes se verificó la expresión de ALDH2 por RT-PCR semicuantitativo y por Western Blot. El plasmidio utilizado para generar la cepa estable es pLX304-Blast-V5-ALDH2 (Figura 11), obtenido desde *Lenti-shRNA Core Facility, UNC*. El cADN de ALDH2 está contenido en un cassette lentiviral que es capaz de integrarse en el genoma celular.

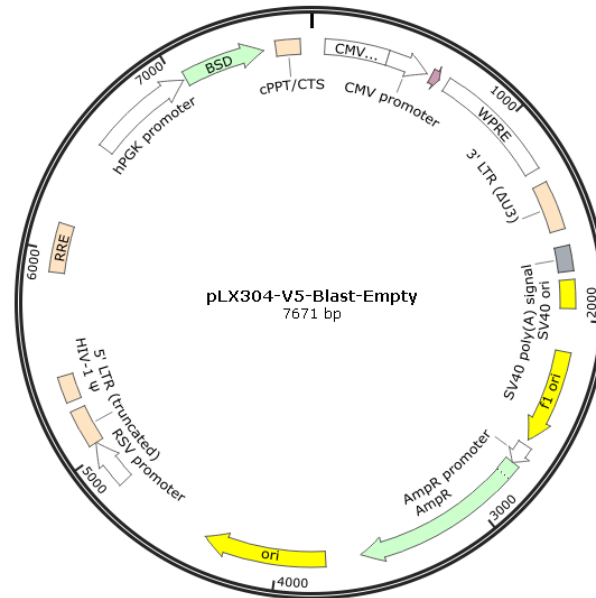


Figura 11. Mapa del plasmidio pLX304-V5-Blast-Empty

En este plasmidio está clonado el cADN de ALDH2, bajo el control del promotor CMV, posee resistencia a Blastidina (BSD) y elementos lentivirales (LTR) que permiten la integración del cassette contenido entre 5'LTR y 3'LTR.

3.3.10 Producción y purificación de partículas virales en HEK-293

Los virus adeno-asociados se produjeron en células HEK-293 según lo descrito en el método de triple transfección (Grieger et al., 2006). Este método usa 12 µg de plasmidio rep/cap pXR2, 15 µg de plasmido helper pXX6-80 y 9 µg del plasmidio que contiene el genoma de AAV psc_AAV_shRNA_ALDH2 (Figura 12). Las células fueron transfectadas utilizando 170 µL de polietilenamina max (PEI-MAX) como transportador de ADN y 500 µL de medio OPTIMEM. Para la producción de cada tipo de partícula viral se utilizaron entre 6 a 8 placas de 150 mm de células HEK-293. Las células fueron colectadas 48 h post-transfección, se lavaron con PBS, se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación y se sonicaron (30-40 pulsos). Los virus fueron purificados por centrifugación en gradiente con cloruro de cesio y se obtuvo aproximadamente 8 fracciones. Para seleccionar las fracciones se realizó un qPCR de cada una y se seleccionaron aquellas que presentaban una mayor concentración de genomas virales por mL. Las fracciones seleccionadas se dializaron en PBS y se titularon mediante qPCR.

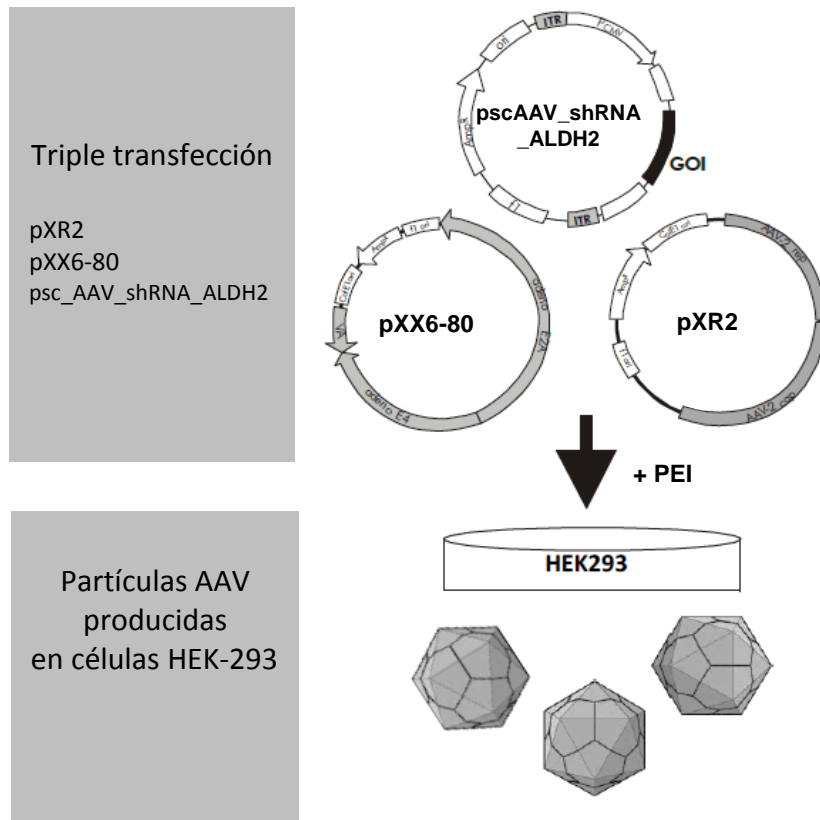


Figura 12. Plasmidios utilizados en la triple transfección

La triple transfección se realizó con PEI. Imagen adaptada de AAV Helper-free System Instruction Manual, Agilent.

3.3.11 Cuantificación de genomas virales

Las partículas virales fueron cuantificadas mediante qPCR, los resultados se informan como genomas virales por mililitro (vg/mL). 10 μ L de virus se incubaron durante una hora a 37°C en una solución con DNAsa 0,1 mg/mL en un volumen final de 100 μ L, luego se agregaron 6 μ L de EDTA 0,5M y se mezcló. Con el fin de desintegrar la cápside viral se agregaron 120 μ L de proteinasa K 0,1 mg/mL y se incubaron al menos por 2 h a 55°C, posterior a la incubación se inactiva la proteinasa K calentando la solución a 95°C por 10 min. La muestra tratada se diluyó 1:100 en agua y se utilizó como templado en la reacción de qPCR, cada reacción es de 10 μ L y se preparó utilizando el kit *SYBR Green Master Mix, Roche* en reacciones de 10 μ L que contenían 5 μ L de 2X SYBR mix, 0,25 μ L de cada partidor 20 μ M (ITR1-F e ITR1-R), 2,5 μ L de agua y 2 μ L de templado. Se utilizaron diluciones seriadas de plasmidio para preparar la curva estándar, partiendo de 50 pg/ μ L. La reacción se realizó en el equipo *LightCycler 480 SW, Roche*.

3.3.12 Transducción líneas celulares

Las preparaciones de AAV generadas se utilizaron para transducir líneas celulares HEK-293, HepG2 y HepG2 VL17A. Para realizar la transducción se cultivaron las células y al alcanzar una confluencia entre 70-80% se incubaron en suspensión con AAV durante una hora, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10^4 o 10^5 vg/cel, luego de este periodo se sembraron en placas, completando con medio suplementado con suero fetal bovino 10%. Las placas se mantuvieron a 37°C en incubadora a 95% de humedad y 5% de CO₂ durante el tiempo que fue requerido para cada experimento, luego las células se colectaron mediante centrifugación (1200 rpm por 5 min) y de acuerdo al uso posterior estas se resuspendieron en la solución adecuada.

Paralelamente a la infección con partículas virales portadoras del shRNA, las células fueron infectadas con virus que codifica para GFP. Las células se observaron con microscopía de fluorescencia en un microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara Hamamatsu. Todas las imágenes fueron adquiridas utilizando el objetivo 10X y se realizó un análisis cualitativo para determinar si la transducción fue exitosa.

3.3.13 Western Blot

La concentración de proteína total de la muestra se analizó mediante el método de Bradford (Sigma-Aldrich, USA). Para el Western blot, al lisado proteico se agregó el amortiguador de carga reductor 4x *Nupage*. La solución resultante se calentó a 100°C por 10 minutos y luego de ser enfriada se cargó en un gel en gradiente preteñido 4-12% Bis-tris. La electroforesis se realizó en amortiguador de corrida 1x MOPS y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa mediante *iBlot 2 Dry Blotting System* (Invitrogen). La membrana se bloqueó durante 1 h con leche descremada al 5% en solución PBST (0.5% Tween 20 in 1 x PBS). El anticuerpo para ALDH2 (4G6A3) (Thermo Fisher MA5-17029) se incubó con la membrana en una dilución de 1:2000 en PBST/leche durante dos horas y el anticuerpo para beta-actin (mAbcam 8226) se incubó toda la noche en a 4°C con agitación suave, en dilución 1:10000 en PBST/leche. Luego la membrana se lavó tres veces con PBST/leche y se incubó por una hora con un anticuerpo secundario (1:10000) conjugado a peroxidasa de rabanito en PBST/leche. Como reactivo de quimioluminiscencia se utilizó el reactivo *Western-Bright Sirius chemiluminescence reagent* (Advansta, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente los blots se revelaron en el equipo the Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). En caso de requerir re-incubar la membrana, esta se restauró utilizando Western Blot Stripping Buffer (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La intensidad de las bandas obtenidas mediante Western blot se cuantificaron con ImageJ 1.50i software (<https://imagej.nih.gov/ij>) (Schneider et al., 2012).

3.3.14 RT-PCR y RT-PCR cuantitativo

Para cuantificar los niveles de transcrito de ALDH2, se realizó una retro-transcripción de RNA (RT) mediante un RT-PCR semicuantitativo. El RNA se preparó el kit QIAGEN RNeasy de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN fueron tratadas con solución de DNasa (Promega). Para la síntesis de la primera hebra de cADN se realizó la retro-transcripción de 1 µg de RNA, por la Retro-transcriptasa SuperScript III RT (ThermoFisher), seguida de un tratamiento con RNase H (ThermoFisher). Para el PCR se usó la polimerasa Platinum Taq High fidelity DNA polymerase (ThermoFisher). La reacción de PCR fue la siguiente: denaturación por 5 min a 94°C, luego 25 ciclos de: denaturación a 94°C por 30s, seguido por la etapa de alineamiento de los partidores en temperaturas entre 62-54°C por 30 s y una etapa de extensión a 72°C por 2 min, con un paso final de extensión a 72°C por 10 min. Los partidores utilizados fueron: GAPDH_F1 y GAPDH_R1 (producto de 452 pb); ALDH2_F1 y ALDH2_R1 (producto de 1466 pb) (Tabla 4). Se incluyó un control sin transcriptasa reversa (-RT).

El RT-PCR cuantitativo (qPCR) se realizó en un equipo Lightcycler Roche 480 utilizando SYBR green Master Mix (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante para 10 µL. Cada reacción incluye 2 µL de cADN, 5 µL del Master Mix, 0,25 µL de cada partidore 20 µM y 2,5 µL de agua libre de RNasa/DNasa. Se incluyó un control negativo sin templado en cada PCR. La reacción se compone de un ciclo de denaturación a 95°C por 10 min y 45 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas de 95°C por 10 s, 60°C por 10 s y 72°C por 10 s. Los valores de la línea base y los cp (*crossing points*) fueron calculados por el *software* LC 1.5 (Roche Applied Biosystem). Las secuencias de los primers GAPDH_F2, GAPDH_R2, ALDH2_F2 y ALDH2_R2 están detalladas en la Tabla 4.

3.3.15 Determinación de etanol y acetaldehído mediante cromatografía de gases

Las células HepG2 VL17A (Proporcionadas amablemente por Dr. Dahn Clemens, University of Nebraska at Omaha, USA) se incubaron en placas selladas con 10, 25 o 100 mM etanol en medio EMEM por 24 h a 37°C. Luego de la incubación una alícuota de 60 µL del sobrenadante del cultivo fue analizado para determinar los niveles de etanol y acetaldehído utilizando un cromatógrafo de gases SRI 8610c (Torrance, CA). Las muestras se distribuyeron en tubos que contenían 375 µL de agua y 0,5 g de NaCl, se calentaron sellados en un baño de agua a 60°C por 10 min y 1,5 mL de gas fue removido e inyectado directamente en el cromatógrafo de gases, utilizando una columna Hayesep D a 140°C, la señal se detectó con un ionizador de llama.

La curva estándar para etanol tiene un rango de 0 a 100 mM y la de acetaldehído de 0 a 250 µM. Las áreas bajo la curva se analizaron con el *software* "SRI Peak Simple".

3.3.16 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test t *Student*. Un *p value* menor a 0,01 se consideró como una diferencia significativa y está marcada en las figuras con asterisco. Las barras de error representan la desviación estándar (DS).

4 RESULTADOS

4.1.1 Selección de una secuencia shRNA para silenciar la expresión de ALDH2

Se utilizaron shRNAs para silenciar la expresión del gen ALDH2 de humano. Se probaron cinco secuencias shRNA para verificar su potencial silenciador. Cada una de estas secuencias (Tabla 6) está codificada en un plasmidio pLKO.1 (obtenidos desde Lenti-shRNA Core Facility, UNC). Estos shRNA tienen como blanco el transcrito del gen ALDH2 de humano, no presentando coincidencias con secuencias de rata ni ratón. La eficiencia para silenciar se probó en células HEK-293, pero se ha demostrado que estas células no expresan una cantidad medible de ALDH2 (Cortínez et al., 2009), por lo tanto las células HEK-293 fueron co-transfectadas simultáneamente con un plasmidio que contiene y codifica la secuencia cADN de ALDH2 (pLX304-Blast-V5-ALDH2) y con uno de los plasmidios pLKO.1_shRNA. Como control de transfección se reemplazó el plasmidio pLKO.1_shRNA por un plasmidio en el que se había reemplazado de la secuencia del cADN de ALDH2 por la del gen de GFP (pLX304-Blast-V5-ALDH2). Como control de silenciamiento se reemplazó pLKO.1_shRNA, por un plasmidio que codifica para una secuencia *scramble* shRNA, la cual tiene la misma estructura general de shRNA, pero no es complementaria con la secuencia de ALDH2.

Las células se colectaron 48 h post-transfección. Se analizó la expresión de ALDH2 a nivel de mRNA mediante RT-PCR semicuantitativo (Figura 13A) y a nivel de expresión proteica por Western Blot (Figura 13B). Tres de los cinco shRNA probados tuvieron la capacidad de inhibir la expresión de ALDH2. Se seleccionó el shRNA2 para los experimentos siguientes, dado que es el que presentó una mayor eficiencia para silenciar. La secuencia codificante de shRNA2 se clonó en el plasmidio scAAV (pscAAV_shRNA2_ALDH2).

Tabla 6.- Secuencia de los shRNA y sus sitios de acción

N°	Secuencia	Región blanco*
shRNA1	GAGGACATCTATGATGAGTTT	985:1005
shRNA2	GCAGATCATTCCGTGGAATTT	540:560
shRNA3	CCCAACATCATCATGTCAGAT	871:891
shRNA4	GCAGGCATACACTGAAGTGAA	1497:1517
shRNA5	GCTGATAAGTACCACGGGAAA	457:477

*Según secuencia de referencia NCBI: NM_000690.2

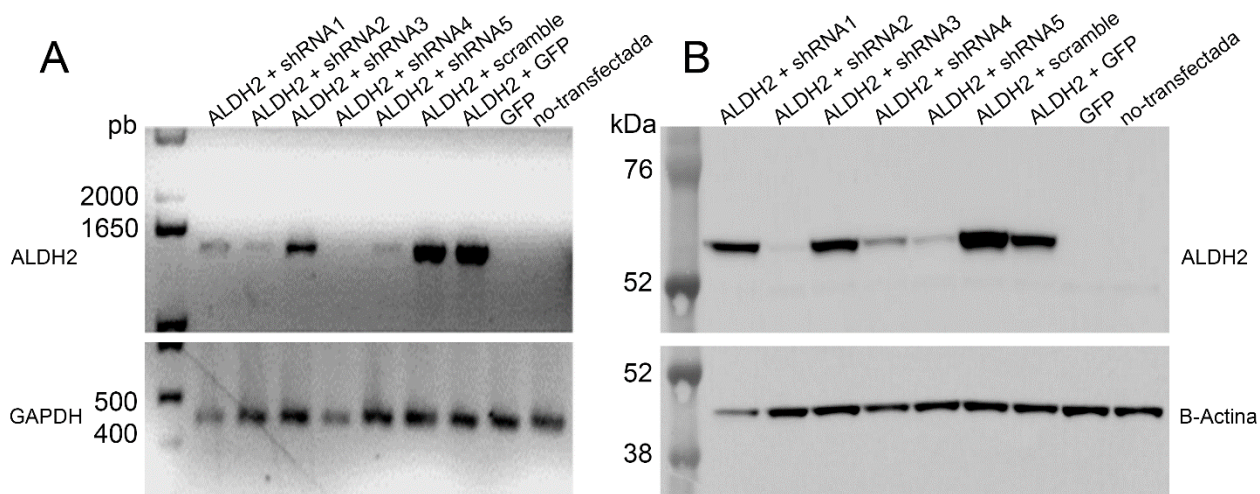


Figura 13. Expresión de ALDH2 en células HEK-293 para selección de shRNA

48 h post-transfección las células se colectaron, se extrajo RNA y proteínas. El cADN de ALDH2 fue co-transfectado con 5 plasmidios shRNA diferentes (carriles 1-5), como control se realizó co-transfección con scramble y GFP (carriles 6 y 7), transfección solo con GFP (carril 8) y células no transfectadas (carril 9). (A) Expresión de ALDH2 y GAPDH analizada mediante RT-PCR semicuantitativo. La expresión a nivel de proteína se analizó mediante Western blot (B), se muestran las bandas correspondientes a ALDH2 (56 kDa) y β -Actina (42 kDa, panel inferior) en células HEK-293 tratadas de acuerdo a lo descrito en la numeración de los carriles.

4.1.2 Construcción plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2

El plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2 (Figura 9) se construyó a partir del fragmento obtenido del plasmidio pLKO.1_shRNA2 digerido con las enzimas de restricción *MspI* y *BamHI* (fragmento de 1510 pb), ligado con el vector pSC-TTRmvmFIX digerido por las enzimas *HindIII* y *BglII* (4469 pb) (Figura 14), según lo descrito en la sección 3.3.7 de Materiales y Métodos (Figura 10). Los plasmidios fueron secuenciados y se verificó la correcta construcción del vector pscAAV_shRNA2_ALDH2 y que no existiesen mutaciones en las secuencias contenidas entre los ITR.

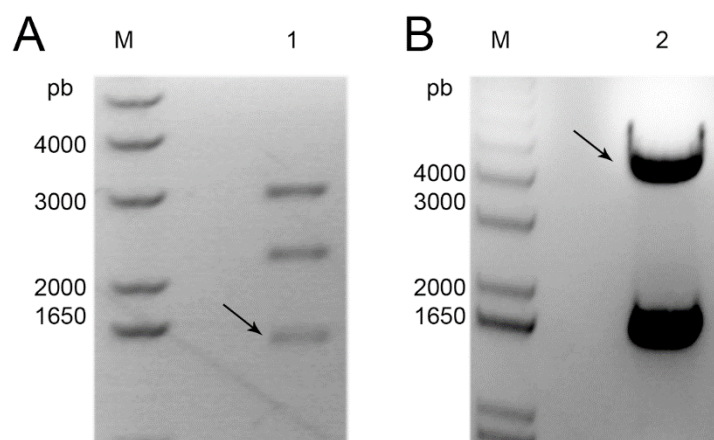


Figura 14. Digestión de plasmidios pLKO.1_shRNA2 y pSC-TTRmvmFIX

Los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Las bandas seleccionadas (señaladas con una flecha) de 1510 pb (panel A) y 4469 pb (panel B) se purificaron del gel y se ligaron para formar el vector pscAAV_shRNA2_ALDH2.

4.1.3 Generación de células HEK-293 que expresan ALDH2 en forma estable

Debido a que el alcohol es metabolizado en el hígado, la línea celular adecuada para probar la capacidad del shRNA para silenciar la expresión de ALDH2 *in vitro*, debería ser una línea celular hepática, como por ejemplo HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Sin embargo, la eficiencia de transfección de las células HepG2 es bastante reducida, con lo que resulta complejo visualizar correctamente el efecto de una molécula silenciadora. Debido a esta dificultad, se decidió utilizar como modelo para estudiar la capacidad silenciadora de shRNA, células de la línea celular HEK-293, ampliamente usada como modelo de estudio en cultivo celular. No obstante, las células HEK-293 no expresan constitutivamente ALDH2, por lo tanto, se desarrolló una línea celular HEK-293 que expresaba establemente la enzima ALDH2 (HEK-293/ALDH2) según lo descrito en Materiales y Métodos 3.3.9. La expresión estable de ALDH2 se validó comparando la expresión de ALDH2 en la línea transformada HEK-293/ALDH2 con la expresión en HEK-293 *wild type*, por RT-PCR semicuantitativo y con Western Blot (Figura 15). Se observa, con ambos métodos, que hay expresión de ALDH2 en la línea celular estable, la cual no se observa en las células *wild type*, indicando que fue posible obtener una línea celular que exprese ALDH2 constitutivamente. Utilizando en *software* ImageJ se comparó la densidad de pixeles de la banda correspondiente a ALDH2 con la banda correspondiente a β -actina y se obtuvo que ambas proteínas se expresan en la misma proporción (51 y 49%). Cabe destacar que Blastidina se utilizó solo para seleccionar las células que integraron el cassette en el genoma celular, por lo que después de la selección no fue necesario crecer las células bajo la presión selectiva de Blastidina, porque la integración cromosomal promueve una expresión estable en el tiempo.

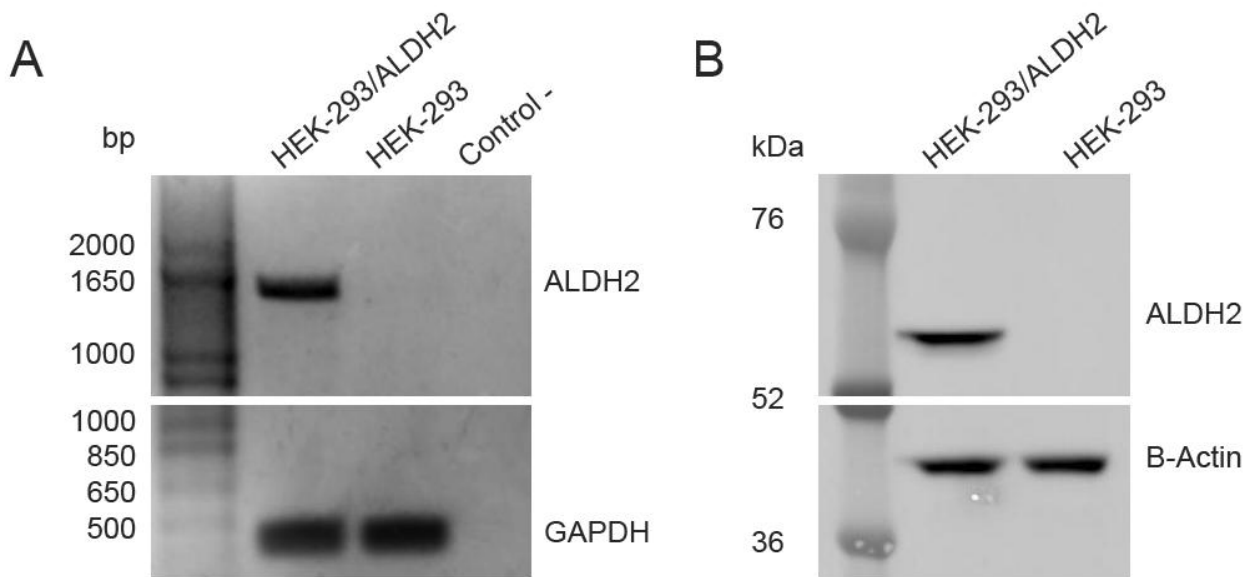


Figura 15. Expresión estable de ALDH2 en HEK-293

Luego de 5 pasajes posteriores a la transfección y selección de las células mediante Blastomicina, se validó la expresión de ALDH2 en células seleccionadas (HEK-293/ALDH2), comparando con células no transfectadas, mediante (A) RT-PCR semicuantitativo, esperando amplificar un fragmento de 1460 pb para ALDH2 y uno de 425 pb para GAPDH para verificar la integridad del RNA. Además se realizó un control negativo del RT-PCR (-RT). (B) Western blot para ALDH2 (56 kDa) y β -Actina (42 kDa) como control de expresión constitutiva. En A y B, se observó una banda correspondiente a ALDH2, presente en las células transfectadas y no en las nativas.

4.1.4 Silenciamiento de ALDH2 en células HEK-293/ALDH2 mediante transfección

Las células HEK-293/ALDH2, que expresan ALDH2, fueron transfectadas con el plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2, con el fin de corroborar si el shRNA2 clonado en el plasmidio que se utiliza para producción viral, era capaz de silenciar ALDH2. Además, para atribuir el silenciamiento a la acción específica del shRNA2, se utilizó como control células transformadas con el plasmidio pscAAV_scramble. En este plasmidio se reemplazó la secuencia del shRNA2_ALDH2 por una secuencia shRNA aleatoria que no tiene complementariedad de bases con ALDH2, ni con otra zona del genoma de HEK-293, por lo que genera un RNA de interferencia que no tiene un blanco celular. 48 h post-transfección las células fueron lisadas y se extrajo RNA y proteínas. Se realizó un RT-PCR semicuantitativo (Figura 16A), en el cuál se observó a nivel de mRNA, una reducción en la expresión de ALDH2 en las células transformadas con el plasmidio que codifica para el shRNA2 (pscAAV_shRNA2_ALDH2) comparada con las células tratadas con el plasmidio control (pscAAV_scramble). Los niveles de expresión proteica se analizaron mediante el análisis de Western Blot con el *software* ImageJ (Figura 16B), mostrando una reducción del 40% de la expresión de ALDH2 en las células tratadas con shRNA2 con respecto a las células transfectadas con pscAAV_scramble.

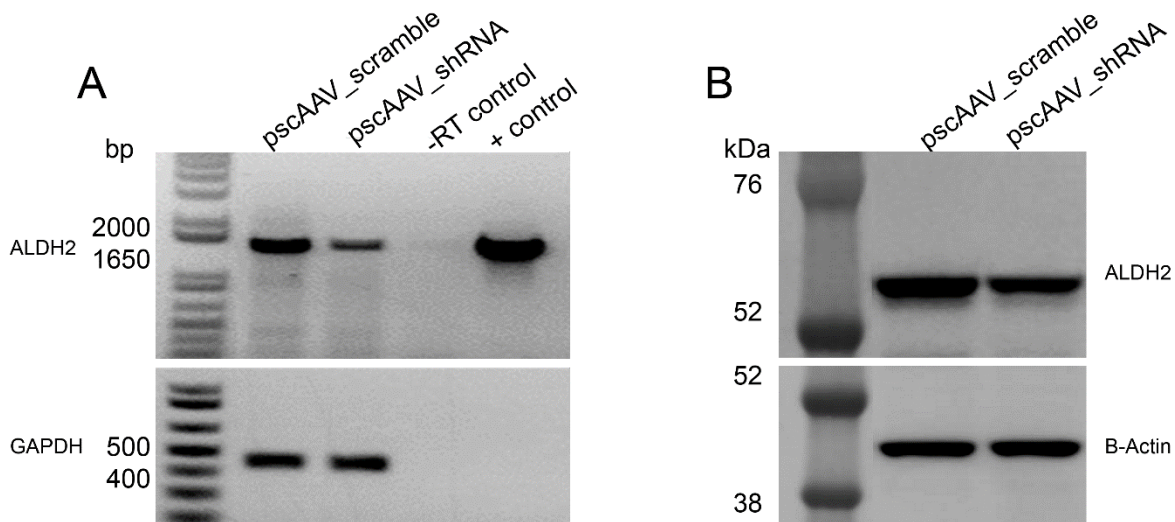


Figura 16. Silenciamiento de ALDH2 por plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2 en células HEK-293/ALDH2

Células HEK-293 que expresan establemente ALDH2 (HEK-293/ALDH2) fueron transfectadas por el plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2. RNA y proteínas se colectaron 48 h después de la transfección para evaluar la expresión de ALDH2. **(A)** RT-PCR semicuantitativo, células transfectadas con pscAAV_scramble fueron usadas como control negativo de silenciamiento (carril 1), las tratadas con shRNA2 (carril 2), -RT control (carril 3) y control positivo de PCR (carril 4). La integridad del RNA fue determinada amplificando una región de 425 pb del gen humano GAPDH. **(B)** Western Blot de ALDH2 (56 kDa) y β -Actina (42 kDa) de las células transfectadas con el control scramble (carril 1) y tratadas con el shRNA2 (carril 2).

4.1.5 Producción, purificación y cuantificación de partículas virales

Para la producción viral se utilizó el método de triple transfección descrito en Materiales y Métodos 3.3.9. Se prepararon tres tipos de partículas virales scAAV portadoras de: shRNA2, scramble y GFP. La eficiencia de transfección se visualizó observando las células transfectadas con pscAAV_GFP (además de los otros dos plasmidios). 48 h después de la transfección las células se observaron en el microscopio de fluorescencia y se detectó emisión de luz verde, considerando efectiva la transfección celular. Las partículas virales se colectaron y purificaron según lo descrito en Materiales y Métodos. De la purificación en gradiente con CsCl se obtuvo 6 fracciones. Para identificar en cuál de ellas estaban presentes las partículas virales se utilizaron 3 μ L de cada una de las fracciones de scAAV_GFP y se infectaron células HEK-293 en placas de 12 pocillos. Estas células se observaron en el microscopio con campo claro (BF por sus siglas en inglés *Bright Field*) y se compararon con las observadas con emisión de fluorescencia (GFP), con el fin de identificar la eficiencia de células infectadas (Figura 17). En las fracciones 3 y 4 se observa una infección de casi el 100% de las células, sin embargo, para no perder partículas virales se seleccionaron las fracciones 2, 3, 4 y 5 para ser mezcladas en un volumen total de 4 mL y se cuantificaron mediante qRT-PCR obteniendo las concentraciones descritas en la Tabla 7.

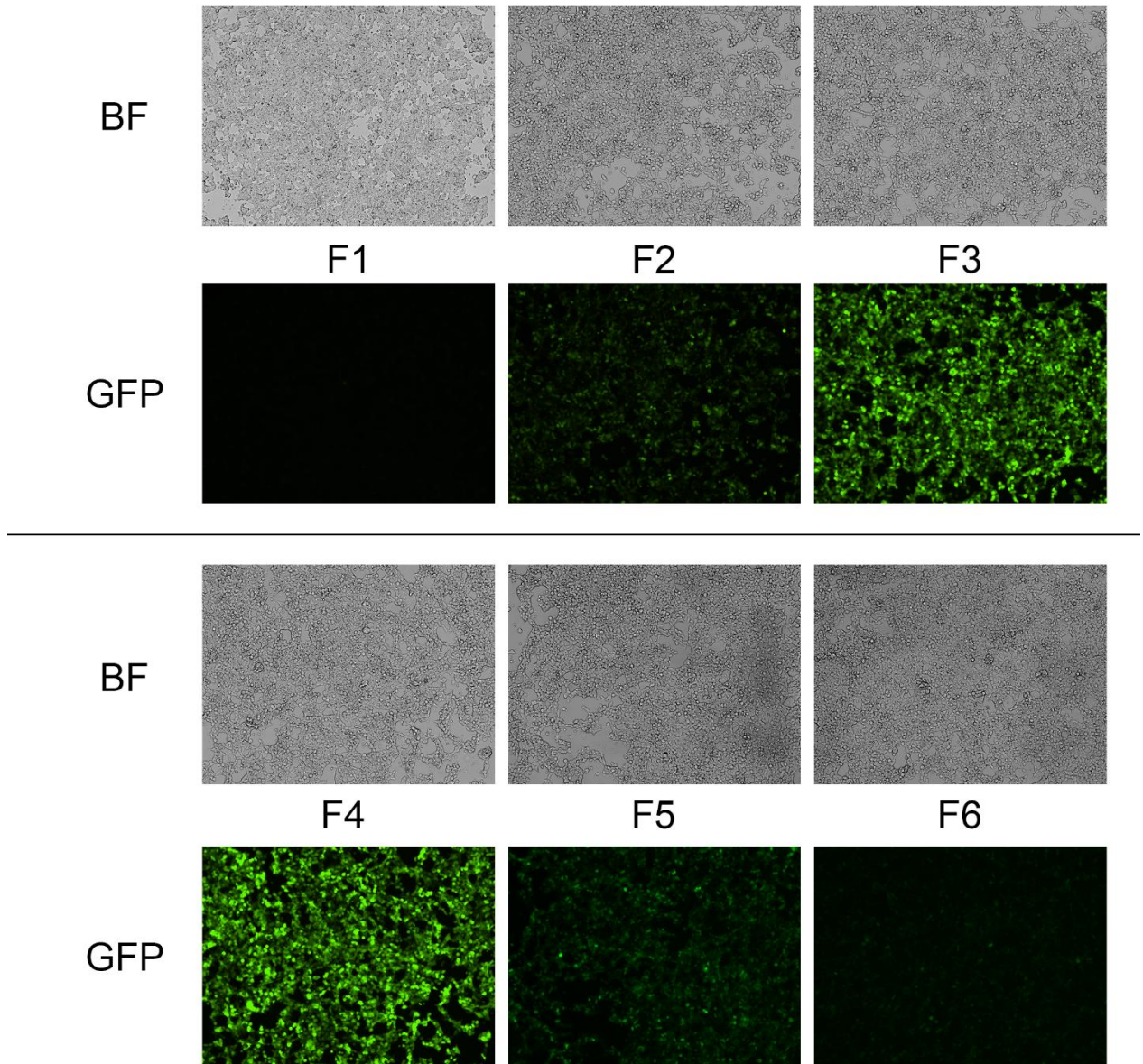


Figura 17. Identificación de fracciones con partículas virales mediante microscopía de fluorescencia

Seis fracciones se obtuvieron de la ultracentrifugación de las partículas virales GFP producidas (F1-F6). Una alícuota de 3 μ L de cada fracción se utilizó para infectar células HEK-293 48 h después se observaron en un microscopio de fluorescencia comparando las células en BF y con GFP (con un aumento de 10X, 160 ms). Se observa emisión de fluorescencia entre las fracciones 2 y 5.

Tabla 7. Concentraciones partículas virales (genomas virales/mL)

Partícula Viral	Concentración (vg/mL)
scAAV2_GFP	9,95e11
scAAV2_scramble	3,76e11
scAAV2_shRNA2	7,91e11

4.1.6 Silenciamiento de ALDH2 con partículas virales en células HEK-293/ALDH2

Para examinar si el shRNA portado por el vector viral AAV era capaz de silenciar la expresión de ALDH2, este se empacó en un virus AAV de doble hebra del serotipo 2, scAAV2/shRNA. Se utilizó como modelo celular HEK-293/ALDH2 en el cual se probaron dos concentraciones virales 1×10^4 y 1×10^5 vg/cel, definidas como MOI (por sus siglas en inglés multiplicity of infection), para transducir (infectar) las células. Como control, se infectaron células con scAAV2 portador de una secuencia shRNA scramble, scAAV2/scramble. La eficiencia de transducción fue evaluada en células infectadas con scAAV2/GFP, estimando el porcentaje de las células observadas en campo claro que expresan GFP al ser expuestas a luz de longitud de onda de 475 nm. Como se observa en la Figura 18, la eficiencia de transducción se estimó mayor al 90%. Es importante notar que aquellas células transducidas con mayor MOI, emiten más fluorescencia que las infectadas con menos partículas virales, pero en ambos casos, se comienza a observar fluorescencia desde el día 1 post-infección (p.i.), siendo esta más notoria a partir del día 3.

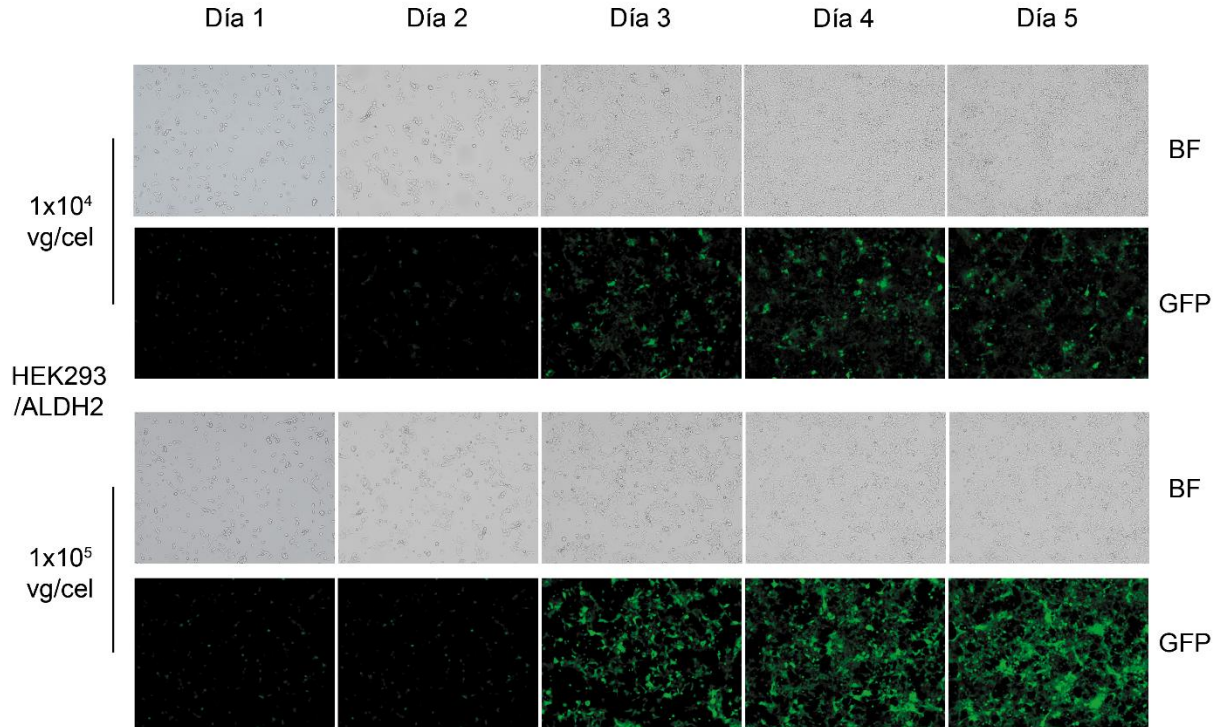


Figura 18. Eficiencia de transducción en HEK-293/ALDH2

Células HEK-293/ALDH2 fueron transducidas con scAAV2_GFP a dos diferentes MOI, 1×10^4 vg/cel panel superior y 1×10^5 vg/cel panel inferior. Para estimar la eficiencia de transducción, se observaron al microscopio en BF y GFP (con un aumento de 10X, 50 ms exposición), durante 5 días consecutivos p.i.

Luego de confirmar que la transducción fue eficiente, se evaluó la expresión de ALDH2 a nivel de transcrito y de proteínas en los 3 y a los 5 días p.i. de las células infectadas con scAAV2/shRNA y de aquellas células infectadas con el virus control scAAV2/scramble. Los transcritos de ALDH2 fueron cuantificados por una transcripción reversa, seguida de un PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) y se comparó con las células tratadas con scAAV2/scramble. A los 3 días p.i. se observó una reducción del 66 y 84% para los MOIs 1×10^4 y 1×10^5 vg/cel, respectivamente. Para los niveles de RNA medidos 5 días p.i. se logró una reducción del 83 y 90% para los MOIs probados (Figura 19A). La expresión de ALDH2 fue evaluada por Western blot. El análisis de imagen correspondiente mostró una reducción mayor al 90% en cada una de las cuatro condiciones probadas y se muestra en la Figura 19B.

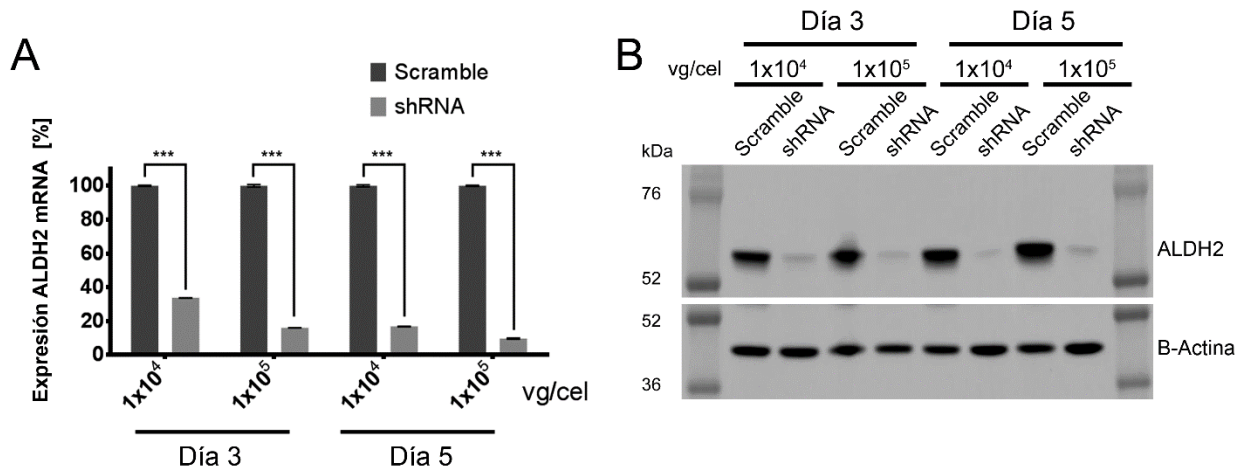


Figura 19. Expresión de ALDH2 en células HEK-293/ALDH2 tratadas con scAAV2/shRNA
 Células HEK-293/ALDH2 fueron infectadas a MOIs 1x10⁴ y 1x10⁵ vg/cel de scAAV2, portador de una secuencia scramble o de shRNA. RNA y proteínas fueron extraídas a los 3 y 5 días p.i. (A) La inhibición en la expresión de ALDH2 por scAAV2/shRNA fue analizada para los transcritos por RT-qPCR, el número de copias de ALDH2 mRNA fue normalizado con respecto a GAPDH. (B) Western blot de la expresión proteica de ALDH2 normalizada por β -Actina. ***p < 0,001 comparado con las células tratadas con scAAV2/scramble.

4.1.7 Silenciamiento de la expresión de ALDH2 en células de hepatoma humano

El blanco final de esta terapia es silenciar la expresión de ALDH2 en el hígado. El serotipo 2 de AAV ha mostrado *in vitro* tener una buena eficiencia de transducción en las células de hepatoma humano HepG2 (Ellis et al., 2013). Por lo tanto, se utilizó el virus portador del shRNA del serotipo 2, scAAV2/shRNA, para infectar HepG2. Igualmente, se siguió la eficiencia de transducción mediante la expresión de GFP por 5 días en células HepG2 infectadas con scAAV2/shRNA. Las células infectadas expresaron GFP desde el primer día p.i. alcanzando la máxima expresión al tercer día, seguido por una disminución en la expresión de GFP (Figura 20).

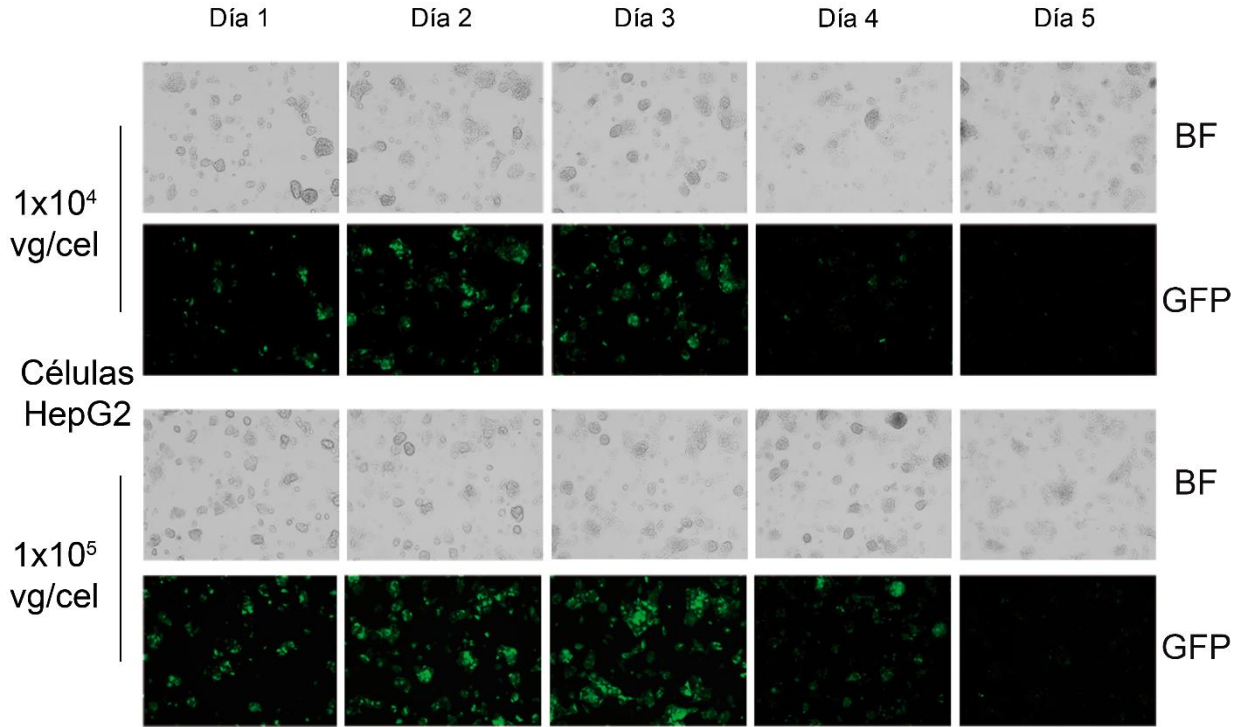


Figura 20. Eficiencia de transducción en HepG2

Células HepG2 fueron transducidas con scAAV2/GFP a dos concentraciones virales 1×10^4 y 1×10^5 vg/cel. Se visualizaron durante 5 días consecutivos p.i. y se fotografiaron (10X, exposición 150 ms). Como control se visualizan las células en campo claro (BF) y se comparan con las que emiten fluorescencia.

RNA y proteínas se extrajeron de las células HepG2 infectadas con dos MOIs 1×10^4 y 1×10^5 vg/cel, en el tercer y quinto día p.i. y se realizó un RT-qPCR. Como se observa en la Figura 21A, se alcanzó una reducción del transcrito de Aldh2 del 66 y 74%; en las células infectadas con 1×10^4 vg/cel, a los 3 y 5 días p.i., respectivamente. Para las infectadas con 1×10^5 vg/cel se observó una reducción del 89 y 90% para los mismos tiempos. La expresión de proteínas se evaluó mediante Western blot. En el caso de esta línea celular se detectaron dos bandas con el anticuerpo para ALDH2, pudiendo corresponder a dos isoformas de la enzima. Para el análisis de imagen se consideró solo la banda de menor peso molecular. Al día 3 p.i. se observó una reducción de la expresión de ALDH2 del 20 y 37 % para los MOIs probados (1×10^4 y 1×10^5 vg/cel). Para las mismas concentraciones virales, la expresión de proteína fue reducida en un 33 y 52% al quinto día p.i. (Figura 21B).

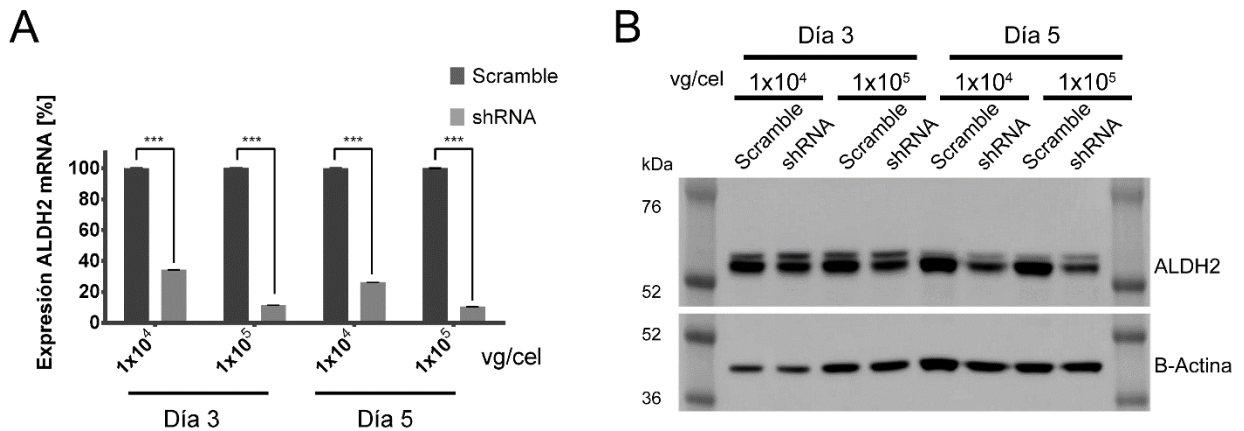


Figura 21. Inhibición de la expresión de ALDH2 en células HepG2 tratadas con scAAV2/shRNA

Células HepG2 fueron infectadas con 1×10^4 o 1×10^5 vg/cel de un scAAV2 portador de la secuencia control (scramble) o de la secuencia de shRNA. En los días 3 y 5 p.i. se colectaron las células y se extrajo RNA y proteínas. La inhibición de la expresión de ALDH2 por scAAV2/shRNA fue analizada por (A) RT-qPCR, el mRNA de ALDH2 se normalizó con GAPDH. (B) Western blot de ALDH2 y β -Actina como normalizador. Las barras de error indican la DS. *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas con el control.

4.1.8 Medición de niveles de acetaldehído en células HepG2 metabolizadoras de etanol

Como ensayo funcional, células de la línea HepG2 fueron expuestas a etanol y se midió la acumulación de acetaldehído. Sin embargo, las células HepG2 no expresan enzimas Alcohol deshidrogenasa (ADH) y la citocromo 2E1 (CYP2E1), las cuales son las responsables de la oxidación de etanol a acetaldehído (Figura 1). Como alternativa se utilizaron células HepG2 VL17A, las cuales expresan constitutivamente las enzimas mencionadas, por lo que se comportan como hepatocitos en respuesta a etanol. El silenciamiento de ALDH2 fue evaluado en las células VL17A transducidas con 1×10^5 vg/cel en el tercer día p.i. mediante RT-qPCR y Western Blot (Figura 22 A y B), mostrando una reducción de la expresión de ALDH2 del 40% en ambos análisis, al comparar con las células tratadas con las partículas virales control scAAV2/scramble. Paralelamente, células tratadas se incubaron con etanol en distintas concentraciones (0, 10, 25 y 100 mM) y se midió la acumulación de acetaldehído mediante cromatografía de gases. Las células incubadas sin etanol no presentaron cantidades medibles de acetaldehído. Las muestras tratadas con el virus portador del shRNA mostraron un aumento de los niveles de acetaldehído de 50, 30 y 40% para cada concentración de etanol ensayada (Figura 22 C).

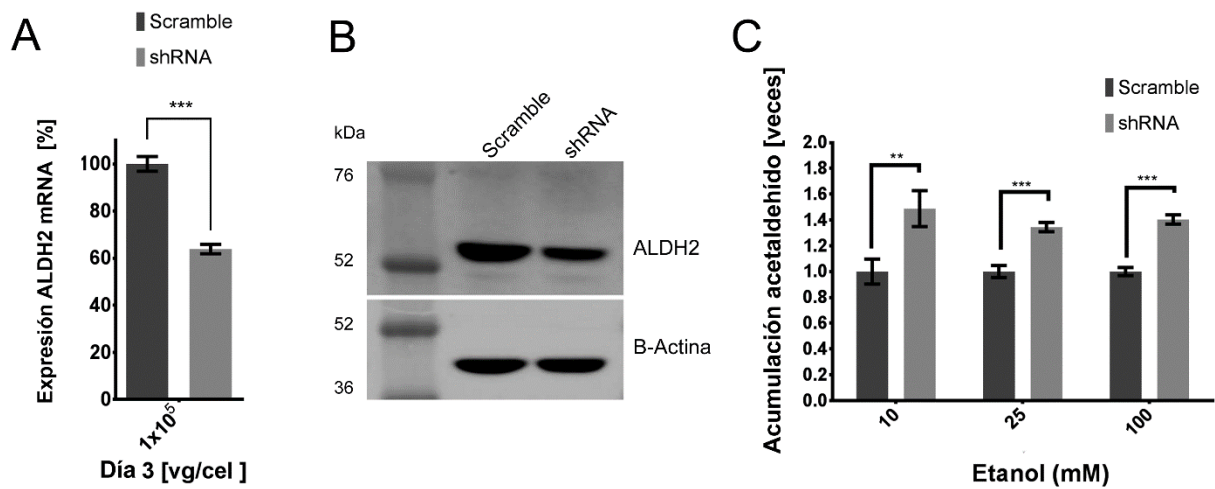


Figura 22. Silenciamiento de ALDH2 en células VL17A HepG2 y acumulación de acetaldehído

Células VL17A HepG2 fueron infectadas con 1×10^5 vg/cel de scAAV/scramble o scAAV/shRNA durante 3 días, en todos los casos se compararon las células tratadas con las partículas virales terapéuticas portadoras del shRNA con las tratadas con la secuencia control scramble. La expresión del transcrito de ALDH2 mRNA fue cuantificado por (A) RT-qPCR, normalizado por la expresión de GAPDH. La expresión de proteínas fue visualizada mediante (B) Western blot, normalizado con la expresión de β -Actina. La respuesta al etanol de las células VL17A HepG2 fue analizada por (C) Acumulación de acetaldehído medido por cromatografía de gases en presencia de concentraciones de etanol de 10, 25 y 100 mM. Las barras de error indican la DS. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas con el control.

5 DISCUSIÓN

La relevancia de este estudio es que hemos demostrado *in vitro* que un único shRNA fue efectivo para inhibir la expresión la enzima Aldehído deshidrogenasa mitocondrial, utilizando como vehículo de entrega virus adeno-asociados *self complementary* serotipo 2, en líneas celulares humanas.

El silenciamiento de la expresión de ALDH2 conlleva a una disminución en la tasa de metabolización del acetaldehído produciendo su acumulación, la cual genera efectos disfóricos. El consumo de alcohol en personas que tienen dañado el metabolismo del acetaldehído se conoce como “fenotipo asiático”, el cual presenta una intolerancia al consumo de alcohol y previene el abuso de su consumo (Garver et al., 2001).

Varios estudios han mostrado que la terapia génica puede ser una alternativa para el tratamiento del alcoholismo. Estos estudios han utilizado diferentes metodologías de silenciamiento para reducir la expresión de la ALDH2. El primer acercamiento fue mediante el uso de nucleótidos-fosforotioatos antisentido de vida media corta, por lo que requieren una administración repetitiva y no resultan ser una buena alternativa como tratamiento (Garver et al., 2001). Otro enfoque fue el uso de antisentidos largos, entregados por Adenovirus, los cuales presentan una mayor vida media, sin embargo, debido al largo de su secuencia (>1000 pb) y a la existencia de varias isoformas de ALDH, estas moléculas podrían silenciar no exclusivamente la expresión de la isoforma mitocondrial ALDH2, principal encargada del metabolismo del acetaldehído proveniente de la oxidación del etanol (Karahanian et al., 2005; Ocaranza et al., 2008).

Debido a las desventajas que presentan las moléculas silenciadoras mencionadas anteriormente, los shRNA emergen como una mejor alternativa para silenciar la expresión de ALDH2 (Cortínez et al., 2009), puesto que están diseñados para reconocer solo una región específica de un mRNA. Otra herramienta que ha sido utilizada para silenciar ALDH2 son *hairpin ribozymes*, esta estrategia ha mostrado una buena eficiencia reduciendo la actividad de ALDH2 *in vitro* e *in vivo* usando roedores como modelo de estudio, logrando una reducción del 47% del consumo voluntario de alcohol (Sapag et al., 2016).

Es importante destacar que las herramientas de silenciamiento descritas solo se han probado en ratas o en líneas celulares provenientes de ratas, pero no han sido diseñadas para silenciar la expresión del gen humano de Aldh2. A pesar de la gran homología entre el gen de rata y humano (88% identidad), es necesario probar el potencial para silenciar el gen humano, especialmente cuando la molécula terapéutica es diseñada para mejorar la especificidad para reconocer solo un gen y no afectar la expresión de genes similares u otras isoformas de la misma proteína. En este trabajo de tesis solo se probó la eficacia para reducir la expresión de la isoforma ALDH2, como trabajo futuro sería interesante analizar la especificidad de esta molécula para verificar si el shRNA diseñado afecta la expresión de otras isoformas de ALDH.

Se han establecido algunas reglas y guías para el diseño de moléculas de shRNA activas (Bofill-De Ros et al., 2016; Elbashir et al., 2002; Reynolds et al., 2004) y además existen varias librerías comerciales disponibles. Sin embargo, la eficiencia de una secuencia de shRNA para silenciar la expresión de un gen blanco debe ser verificada. En este trabajo se probaron cinco secuencias, de las cuales tres de ellas mostraron actividad silenciadora en las condiciones ensayadas.

Estudios han mostrado que a pesar de la pequeña capacidad de empaque de los virus AAV, especialmente de los scAAV (2,3 kb) (McCarty et al., 2001), múltiples secuencias pueden ser clonadas consecutivamente flanqueadas por las secuencias virales ITR (Grimm et al., 2006). En este trabajo de tesis se probaron, por separado, cinco secuencias de shRNA que tenían como blanco el transcrito de ALDH2; cada una de estas mostró una eficiencia diferente para silenciar la expresión de ALDH2 ya sea a nivel de transcrito o a nivel de expresión de proteína. Por simplicidad, se eligió probar solo una de estas secuencias shRNA y fue clonada en el plasmidio que posteriormente se utilizó en el método de triple transfección para producción de las partículas virales (Figura 10). En futuros experimentos se podrían probar combinaciones de secuencias de shRNA, para ver si existe un efecto aditivo al usar más de un shRNA para silenciar la expresión de ALDH2, esta estrategia ha sido probada para inhibir la expresión de genes de VIH mostrando resultados prometedores (Choi et al., 2015).

Los virus adeno-asociados han mostrado ser una opción prometedora como vectores para terapia génica. Se han realizado varios estudios clínicos que utilizan AAV como portadores de la terapia en diversas enfermedades cardiovasculares, infecciosas, neurológicas, inflamatorias, cáncer y desordenes monogénicos como son la hemofilia A y B (Ginn et al., 2013; Mingozzi et al., 2011; Nathwani et al., 2011). En las pruebas clínicas realizadas se han utilizado diferentes serotipos y variantes con tropismo específico para infectar los tejidos seleccionados de acuerdo a la necesidad de partículas de cada enfermedad (Asokan et al., 2012). Hasta el momento se ha establecido que el serotipo 8 es el mejor para transducir el hígado *in vivo*, pero muestran una capacidad reducida para infectar la línea celular hepática humana HepG2 (Davidoff et al., 2005). Para estudios *in vitro* los AAV del serotipo 2 han mostrado la mayor capacidad para transducir diferentes tipos de células, incluyendo HepG2 (Ellis et al., 2013). Los AAV *self complementary* han mostrado tener una transducción mejorada en comparación con los AAV tradicionales y han surgido como una alternativa para ser elegidos como vehículos portadores de herramientas silenciadoras, como los shRNA (C. Li et al., 2011; McCarty et al., 2003; Wu et al., 2008).

En este trabajo de tesis se utilizaron scAAV2 portadores de un shRNA para la hALDH2 para transducir líneas celulares humanas, con el fin de probar su capacidad para reducir la expresión de la enzima Aldehído deshidrogenasa. Para comenzar las pruebas se utilizaron como modelo células de la línea HEK-293 debido a que son fáciles de manipular y cultivar en adherencia, además es sabido que son transducidas eficientemente por scAAV2 (Ellis et al., 2013). Debido a que las células HEK-293 no expresan constitutivamente ALDH2, se desarrolló una línea celular que expresa establemente ALDH2 (HEK-293/ALDH2), la cual se infectó con partículas virales scAAV2 portadoras del shRNA. En las células tratadas, la expresión a nivel de proteínas de ALDH2 fue

reducida al mínimo (> 90%) al quinto día p.i., incluso cuando las células fueron infectadas con una baja concentración de partículas virales (1×10^4 vg/cel). A causa de su efectividad para silenciar la expresión de ALDH2 en esta línea celular, se podrían utilizar dosis virales menores, produciendo mejores perfiles de seguridad para futuras pruebas clínicas (Nair et al., 2014).

La línea celular HepG2 se utilizó como modelo para representar el metabolismo del acetaldehído, porque expresa constitutivamente cantidades medibles de ALDH2 (Clemens et al., 1995; Donohue et al., 2006). La isoforma 2 de la ALDH tiene localización mitocondrial. Es sabido que las proteínas mitocondriales son sintetizadas como un precursor que tiene una extensión N-terminal, la cual es procesada por peptidasas específicas (Gakh et al., 2002). La información sobre la secuencia de ALDH2 presentada en UNIPROT reporta que la secuencia es procesada a una forma madura (<http://www.uniprot.org/uniprot/P05091#sequences>). Adicionalmente, la secuencia aminoacídica fue analizada en el servidor web MitoFates, disponible en <http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/> (Fukasawa et al., 2015), el cual predijo un sitio de corte. La isoforma inmadura sería la proteína antes de ser procesada (517 aa) con un peso molecular predicho de 56,381 kDa, correspondiendo a la banda de mayor peso molecular, pero menos intensa del Western Blot de la Figura 21. La forma madura (501 aa) tiene un peso molecular predicho de 54,558 kDa y es representada por la banda más intensa del Western Blot, correspondiendo a la enzima de localización mitocondrial.

Se analizó mediante Western blot la expresión de ALDH2 en las células HepG2 transducidas por scAAV/shRNA con 1×10^5 vg/cel, alcanzando una reducción de un 52% en la expresión al quinto día p.i., comparada con la expresión en las células infectadas con el virus control. El silenciamiento producido en las células tratadas con scAAV2/shRNA fue menos eficiente en HepG2 comparado con el obtenido al tratar HEK-293/ALDH2. La diferencia puede ser explicada por la eficiencia de los virus para transducir diferentes tipos celulares lo cual se refleja en la capacidad para entregar la molécula terapéutica shRNA, además los niveles de expresión del shRNA y la vida media de la proteína ALDH2 puede ser diferente en las líneas celulares probadas, resultando en que se deben silenciar diferentes niveles de ALDH2 en cada caso. Estudios previos han mostrado que la reducción alrededor de un 40% de la expresión de ALDH2 resultan en una apreciable reducción en el consumo de alcohol en modelos animales (ratas UchB) (Garver et al., 2001; Ocaranza et al., 2008). Esta reducción moderada de la actividad de ALDH2 puede alcanzar el efecto deseado de disminuir el consumo de alcohol, minimizando los riesgos que podrían surgir de un silenciamiento completo del gen (Sapag et al., 2016).

La línea celular HepG2 se utilizó para estudiar la expresión/inhibición de la enzima ALDH2, sin embargo esta línea celular no se comporta como un hepatocito al metabolizar etanol, debido a que no expresa en cantidades medibles las enzimas ADH y CYP2E1, principales encargadas de metabolizar el etanol (Clemens et al., 1995). Para cumplir con los objetivos de este trabajo era necesario medir la acumulación de acetaldehído en células tratadas con el shRNA en presencia de etanol. Debido a que las células HepG2 no permiten realizar este análisis fue necesario encontrar otra línea celular que pudiese procesar el etanol de manera apropiada. En el artículo publicado por Clemens y col.,

2006, se desarrolló una línea celular a partir de HepG2 que expresa establemente las enzimas ADH y CYP2E1, esta línea, HepG2 VL17A, responde como un hepatocito en presencia de etanol, oxidándolo a acetaldehído (Donohue et al., 2006).

Como ensayo funcional se midió la acumulación de acetaldehído utilizando cromatografía de gases en células HepG2 VL17A infectadas con scAAV2/shRNA. Estas células fueron cultivadas con etanol, en tres diferentes concentraciones, simulando consumidores sociales, moderados y dependientes de alcohol (Eckardt et al., 1998; Jones et al., 1992). Para cada caso la concentración de acetaldehído aumento un 50, 30 y 40%, en comparación con aquellas infectadas con el control scAAV2/scramble.

Como trabajo futuro sería interesante analizar la especificidad del shRNA usado para verificar si este afecta la expresión de otras isoformas de ALDH.

En este trabajo de tesis se demostró que vectores scAAV2 que codifican un único shRNA para ALDH2 son efectivos para disminuir la expresión de la isoforma mitocondrial de la enzima Aldehído deshidrogenasa en líneas celulares HEK-293/ALDH2, HepG2 y HepG2 VL-17A y aumentan los niveles de acetaldehído.

6 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se propuso demostrar que la terapia génica es una estrategia con la cual es posible silenciar la expresión de la ALDH2 en líneas celulares humanas. Se utilizaron como vehículos de entrega virus adeno-asociados de doble hebra, debido a su perfil de seguridad y su alta eficiencia de transducción. Como herramienta silenciadora se eligió utilizar shRNA dirigidos a la isoforma mitocondrial de la enzima ALDH.

A partir de un análisis cualitativo de la expresión de ALDH2, en células HEK-293 co-transfectadas con un plasmidio codificante para ALDH2 y uno codificante del shRNA se observa que 3 de las 5 secuencias de shRNA probadas disminuyen la expresión de ALDH2 a nivel de RNA y proteína, esto a pesar de haber sido diseñadas con ese fin. A partir de estos resultados se concluye que es necesario probar empíricamente las secuencias de shRNA dispuestas en librerías, para seleccionar las que efectivamente ejercen actividad silenciadora. Será interesante identificar, en trabajos posteriores, los criterios de diseño que mejor contribuyen a producir shRNAs más efectivos en la práctica.

Se construyó el plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2 el cual codifica para la secuencia de shRNA2 que mostró mayor efectividad para silenciar la expresión de ALDH2. Este plasmidio contiene los elementos genéticos necesarios para la transcripción de shRNA codificados dentro de los ITR virales. La construcción plasmidial es estable, permite la producción de las partículas virales scAAV y la expresión del gen de interés. Además se construyó el plasmidio pscAAV_scramble, el cual tiene las mismas características, con la diferencia que codifica un shRNA que no tiene blanco putativo dentro de la célula, lo que permite utilizarlo como control negativo en los experimentos en que se analiza la reducción de la expresión de ALDH2.

La línea celular HEK-293 no expresa ALDH2 en cantidades medibles, por lo que se desarrolló la línea celular estable HEK-293/ALDH2 que expresa constitutivamente ALDH2.

Al transfectar la línea celular HEK-293/ALDH2 con el plasmidio pscAAV_shRNA2_ALDH2, se observó mediante RT-PCR semicuantitativo, una reducción de la expresión del mRNA, mientras que mediante Western blot se observó una reducción del 40% de la expresión proteica de ALDH2, respecto a la expresión en células tratadas con el control pscAAV_scramble. El protocolo de transfección utilizado fue efectivo, es posible visualizar diferencias con el control y permite realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la expresión de ALDH2 en la línea celular desarrollada.

Se concluye que esta línea celular es una herramienta útil para el estudio de expresión/silenciamiento de ALDH2 tanto a nivel de ARN como de proteína. Permite estimar la capacidad de un shRNA para silenciar la expresión de ALDH2, ya sea, entregado por un plasmidio o por partículas virales del tipo scAAV2, debido a que se puede transfectar o transducir fácilmente.

Con el método de triple transfección se produjeron partículas virales de doble hebra del serotipo 2, scAAV2, portadoras de secuencias de GFP, scramble o shRNA. Este método de producción y posterior purificación por ultracentrifugación en gradiente, permite obtener, a escala de laboratorio, partículas virales infectivas en concentraciones suficientes para ensayos *in vitro*, sin requerir pasos de purificación y/o concentración adicionales. Es importante destacar que es un método laborioso y requiere de práctica para obtener resultados satisfactorios.

Se midió la capacidad de silenciamiento de la expresión de ALDH2 a nivel de RNA y proteínas, comparando los niveles de las células tratadas con el shRNA específico y con el scramble. En ambas líneas celulares tratadas se logró reducir la expresión de ALDH2 tratadas con una baja o moderada dosis de partículas virales, con lo que se concluye que los virus adeno-asociados del serotipo 2 son capaces de infectar y de entregar la molécula terapéutica y que esta es procesada por la maquinaria celular para producir un shRNA efectivo para inhibir la expresión del gen deseado. Las dosis y los tiempos empleados permiten observar diferencias, sin embargo, pueden existir otros parámetros que permitan observar mejor el fenómeno, por lo que se proponer probar diferentes dosis y tiempos, y realizar una curva dosis respuesta en diferentes líneas celulares.

Finalmente, además de inhibir la expresión enzimática, como ensayo funcional se midió la concentración de acetaldehído en un modelo celular hepático capaz de metabolizar el etanol y convertirlo en acetaldehído. De este ensayo se puede concluir que la reducción de la expresión enzimática resulta en una acumulación de acetaldehído, debido a una metabolización incompleta del etanol

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que es posible imitar el efecto del polimorfismo observado en el fenotipo asiático utilizando terapia génica para entregar mediante scAAV2 un shRNA específico para inhibir la expresión del gen codificante de ALDH2 humano en cultivos celulares, y que se acumula acetaldehído en células hepáticas metabolizadoras de etanol. Con esto se sientan las bases para el potencial desarrollo de un tratamiento no farmacológico para el alcoholismo.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Antabuse (disulfiram) Data Sheet. (2017).
- Asokan A., Schaffer D. V., Samulski R. J. (2012). The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol. Ther.*, 20(4), 699–708.
- Bebb H. T., Houser H. B., Witschi J. C., Littell A. S., Fuller R. K. (1971). Calorie and nutrient contribution of alcoholic beverages to the usual diets of 155 adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24(9), 1042–52.
- Bofill-De Ros X., Gu S. (2016). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*, 103, 157–166.
- Brändén C. I., Eklund H., Nordström B., Boiwe T., Söderlund G., et al. (1973). Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9-angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70(8), 2439–42.
- Carr G. D. (2011). Alcoholism: a modern look at an ancient illness. *Prim. Care*, 38(1), 9–21.
- Cederbaum A. I. (2012). Alcohol metabolism. *Clin. Liver Dis.*, 16(4), 667–685.
- Center for Substance Abuse Treatment. (2009a). Chapter 2, Acamprosate. In *Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice. A Treatment Improvement Protocol* (49th ed.).
- Center for Substance Abuse Treatment. (2009b). Chapter 4, Oral Naltrexone. In *Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice. A Treatment Improvement Protocol* (49th ed.).
- Center for Substance Abuse Treatment. (2009c). Chapter 5, Extended-Release Injectable Naltrexone. In *Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice. A Treatment Improvement Protocol*.
- Chen C. C., Lu R. B., Chen Y. C., Wang M. F., Chang Y. C., et al. (1999). Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism. *Am. J. Hum. Genet.*, 65(3), 795–807.
- Choi J. G., Bharaj P., Abraham S., Ma H., Yi G., et al. (2015). Multiplexing seven miRNA-Based shRNAs to suppress HIV replication. *Mol Ther*, 23(2), 310–320.
- Clemens D. L., Halgard C. M., Miles R. R., Sorrell M. F., Tuma D. J. (1995). Establishment of a recombinant hepatic cell line stably expressing alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 321(2), 311–318.
- Cortínez G., Sapag A., Israel Y. (2009). RNA interference against aldehyde dehydrogenase-2: development of tools for alcohol research. *Alcohol*, 43(2), 97–104.
- Crabb D. W., Bosron W. F., Li T.-K. (1987). Ethanol metabolism. *Pharmacol. Ther.*, 34, 59–73.
- Crabbe J. C., Phillips T. J., Harris R. A., Arends M. A., Koob G. F. (2006). Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. *Addict. Biol.*, 11, 195–269.

- Crystal R. G. (2014). Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.*, 25(1), 3–11.
- Davidoff A. M., Gray J. T., Ng C. Y. C., Zhang Y., Zhou J., et al. (2005). Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol. Ther.*, 11(6), 875–888.
- Daya S., Berns K. I. (2008). Gene therapy using Adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(4), 583–93.
- Deitrich R. (2011). Ethanol as a Prodrug: Brain Metabolism of Ethanol Mediates Its Reinforcing Effects – A Commentary. *Alcohol*, 35(4), 581–583.
- Dick D. M., Bierut L. J. (2006). The genetics of alcohol dependence. *Curr. Psychiatry Rep.*, 8(2), 151–7.
- Donohue T. M., Osna N., Clemens D. L. (2006). Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38(1), 92–101.
- Dudley R. (2000). Evolutionary origins of human alcoholism in primate frugivory. *Quartely Rev. Biol.*, 75(1), 3–15.
- Eckardt M., File S., Gessa G., Grant K., Guerri C., et al. (1998). Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 22, 998–1040.
- Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26(2), 199–213.
- Ellis B. L., Hirsch M. L., Barker J. C., Connelly J. P., Steininger R. J., et al. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology*, 10(1), 74.
- Emanuele M. A., Emanuele N. V. (1998). Alcohol's Effects on Male Reproduction. *Alcohol Res. Heal.*, 22(3), 195–201.
- Emanuele M. A., Wezeman F., Ph D., Emanuele N. V. (2002). Alcohol's Effects on Female Reproductive Function. *Alcohol Res. Heal.*, 26(4), 271–281.
- Enoch M.-A. (2008). The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 90(1), 95–104.
- Farres J., Wang X., Takahashi K., Cunningham S. J., Wang T. T., et al. (1994). Effects of Changing Glutamate 487 to Lysine in Rat and Human Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol.*, 269(19), 13854–60.
- Fukasawa Y., Tsuji J., Fu S.-C., Tomii K., Horton P., et al. (2015). MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics*, 14(4), 1113–1126.
- Fuller R. K., Gordis E. (2004). Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? *Addiction*, 99(1), 21–4.

- Gakh O., Cavadini P., Isaya G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1592(1), 63–77.
- Garver E., Tu G., Cao Q., Aini M., Zhou F., et al. (2001). Eliciting the low-activity aldehyde dehydrogenase Asian phenotype by an antisense mechanism results in an aversion to ethanol. *J. Exp. Med.*, 194(5), 571–80.
- Ginn S. L., Alexander I. E., Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update Samantha. *J. Gene Med.*, 15(2), 65–77.
- Go V. L. W., Gukovskaya A., Pandol S. J. (2005). Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol*, 35(3), 205–11.
- Gonçalves M. A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol. J.*, 5, 1–17.
- Grieger J. C., Choi V. W., Samulski R. J. (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat. Protoc.*, 1(3), 1412–1428.
- Grimm D., Kay M. (2006). Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Ther.*, 13(6), 563–75.
- Jelski W., Szmitkowski M. (2008). Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin. Chim. Acta*, 395(1–2), 1–5.
- Johnsen J., Morland J. (1991). Disulfiram Implant: A Double-Blind Placebo Controlled Follow-Up on Treatment Outcome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15(3), 532–536.
- Johnson B. A. (2008). Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Biochem. Pharmacol.*, 75(1), 34–56.
- Jones A., Sternebring B. (1992). Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcohol.*, 27(6), 641–647.
- Jung Y.-C., Namkoong K. (2006). Pharmacotherapy for alcohol dependence: anticraving medications for relapse prevention. *Yonsei Med. J.*, 47(2), 167–78.
- 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(8), 1384–1389.
- Karahanian E., Quintanilla M., Tampier L., Rivera-Meza M., Bustamante D., et al. (2011). Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 35(4), 606–12.
- Kendler K. S., Schmitt E., Aggen S. H., Prescott C. a. (2008). Genetic and environmental influences on alcohol, caffeine, cannabis, and nicotine use from early adolescence to middle adulthood. *Arch. Gen. Psychiatry*, 65(6), 674–82.
- Krishnamoorthy S., Lip G. Y. H. H., Lane D. A. (2009). Alcohol and illicit drug use as precipitants of atrial fibrillation in young adults: a case series and literature review. *Am. J. Med.*, 122(9), 851–856.e3.
- Lands W. E. M. (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 15(2), 147–160.
- Le Bec C., Douar A. (2006). Gene therapy progress and prospects--vectorology: design

- and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther.*, 13, 805–813.
- Li C., Xiao P., Gray S. J., Weinberg M. S., Samulski R. J. (2011). Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(34), 14258–14263.
- Li T. K. (2000). Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. *J. Stud. Alcohol*, 61(1), 5–12.
- Li T. K., Bosron W. F., Dafeldecker W. P., Lange L. G., Vallee B. L. (1977). Isolation of pi-alcohol dehydrogenase of human liver: is it a determinant of alcoholism? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(10), 4378–81.
- Lieber C. S. (2009). The Influence of Alcohol on Nutritional Status. *Nutr. Rev.*, 46(7), 241–54.
- Litten R. Z., Allen J., Fertig J. (1996). Pharmacotherapies for alcohol problems: a review of research with focus on developments since 1991. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20(5), 859–876.
- Lu Y., Cederbaum A. I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic. Biol. Med.*, 44(5), 723–38.
- Lucero A. T., Mercado S. A., Sánchez A. C., Contador C. A., Andrews B. A., et al. (2017). Purification of adenoviral vector serotype 5 for gene therapy against alcoholism using anion exchange chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (February).
- Luczak S. E., Glatt S. J., Wall T. L. (2006). Meta-analyses of ALDH2 and ADH1B with alcohol dependence in Asians. *Psychol. Bull.*, 132(4), 607–21.
- Mark T. L., Kranzler H. R., Song X., Bransberger P., Poole V. H., et al. (2003). Physicians' opinions about medications to treat alcoholism. *Addiction*, 98(5), 617–26.
- Martin P. R., Singleton C. K., Hiller-Sturmhöfel S. (2003). The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res. Health*, 27(2), 134–142.
- McCarty D. M. (2008). Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol. Ther.*, 16(10), 1648–1656.
- McCarty D. M., Fu H., Monahan P. E., Toulson C. E., Naik P., et al. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.*, 10(26), 2112–2118.
- McCarty D. M., Monahan P. E., Samulski R. J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.*, 8(16), 1248–1254.
- McKillop I. H., Schrum L. W. (2005). Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, 35(3), 195–203.
- Miller P. M., Book S. W., Stewart S. H. (2011). Medical treatment of alcohol dependence: a systematic review. *Int. J. Psychiatry Med.*, 42(3), 227–66.
- Mingozzi F., High K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev.*, 12(5), 341–355.

- Mingozzi F., Maus M. V, Hui D. J., Sabatino D. E., Murphy S. L., et al. (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.*, 13(4), 419–22.
- Ministerio de Salud de Chile. Estrategia Nacional sobre Alcohol: Reducción del consumo de riesgo y sus consecuencias sociales y sanitarias (2010).
- Mizoi Y., Tatsuno Y., Adachi J., Kogame M., Fukunaga T., et al. (1983). Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18 Suppl 1, 127–133.
- Morales P., Herrera-marschitz M. (2013). Gene specific modifications unravel ethanol and acetaldehyde actions. *Behav. Neurosci.*, 7(July), 1–8.
- Morrall N., O'Neal W., Rice K., Leland M., Kaplan J., et al. (1999). Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *PNAS*, 96(22), 12816–21.
- Möykkynen T., Korpi E. R. (2012). Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 111(1), 4–13.
- Nair N., Rincon M. Y., Evens H., Sarcar S., Dastidar S., et al. (2014). Computationally designed liver-specific transcriptional modules and hyperactive factor IX improve hepatic gene therapy. *Blood*, 123(20), 3195–9.
- Naldini L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5), 457–63.
- Nathwani A. C., Tuddenham E. G. D., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., et al. (2011). Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.*, 365(25), 2357–2365.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2014). Treatment for alcohol problems: finding and getting help. *NIH Publ.*, 1, 14–7974.
- NIAA. (2017). National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIH Publications. What is a standard drink?
- Ocaranza P., Quintanilla M., Tampier L., Karahanian E., Sapag A., et al. (2008). Gene therapy reduces ethanol intake in an animal model of alcohol dependence. *Gene Ther.*, 32(1), 52–57.
- Olavarría M., Acevedo S., Andrade C., Pino J. (2009). *Estudio Nacional sobre costos humanos, sociales y económicos de la drogas en Chile 2006*.
- Peng G.-S., Yin S.-J. (2009). Effect of the allelic variants of aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 and alcohol dehydrogenase ADH1B*2 on blood acetaldehyde concentrations. *Hum. Genomics*, 3(2), 121–7.
- Pettinati H. M., Rabinowitz A. R. (2005). Recent advances in the treatment of alcoholism. *Clin. Neurosci. Res.*, 5(2–4), 151–159.
- Quintanilla M., Israel Y., Sapag A., Tampier L. (2006). The UChA and UChB rat lines: Metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict. Biol.*, 11(3–4), 310–323.

- Quintanilla M., Rivera-Meza M., Berríos-Cárcamo P., Cassels B. K., Herrera-Marschitz M., et al. (2016). (R)-Salsolinol, a product of ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake. *Addict. Biol.*, 21(6), 1063–1071.
- Quintanilla M., Tampier L., Karahanian E., Rivera-Meza M., Herrera-Marschitz M., et al. (2012). Reward and relapse: complete gene-induced dissociation in an animal model of alcohol dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 36(3), 517–22.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., et al. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 22(3), 326–30.
- Rietschel M., Treutlein J. (2013). The genetics of alcohol dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1282, 39–70.
- Robbins T. W., Murphy E. R. (2006). Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27(3), 141–8.
- Rundio A., Jr A. R. (2013). Understanding alcoholism. *Nurs. Clin. North Am.*, 48(3), 385–90.
- Sapag A., Irrazábal T., Lobos-González L., Muñoz-Brauning C. R., Quintanilla M., et al. (2016). Hairpin Ribozyme genes curtail alcohol drinking: from rational design to in vivo effects in the Rat. *Mol. Ther. Acids*, 5(7), e335.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9(7), 671–675.
- Smith M., Hopkinson D. A., Harris H. (1971). Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann. Hum. Genet.*, 34(3), 251–271.
- Sophos N., Pappa A., Ziegler T. L., Vasiliou V. (2001). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem. Biol. Interact.*, 130–132(1–3), 323–37.
- Strachan T., Read A. (1999). Chapter 22, Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches. In *Human Molecular Genetics 2nd edition* (2nd ed.). New York: Wiley-Liss.
- Thomas C. E., Storm T. A., Huang Z., Kay M. A. (2004). Rapid Uncoating of Vector Genomes Is the Key to Efficient Liver Transduction with Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors. *Society*, 78(6), 3110–3122.
- Thomasson H. R., Edenberg H. J., Crabb D. W., Mai X. L., Jerome R. E., et al. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am. J. Hum. Genet.*, 48(4), 677–81.
- To S. E. (2007). Alcohol dependence patterns and their impact on New York City. *MedGenMed*, 9(1), 23.
- Tu G. C., Israel Y. (1995). Alcohol consumption by orientals in North America is predicted largely by a single gene. *Behav. Genet.*, 25(1), 59–65.
- Vallari R., Pietruszko R. (1982). Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science (80-)*, 216(4546), 637–639.

- Vasiliou V., Pappa A., Petersen D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact.*, 129(1–2), 1–19.
- Wagner F. W., Parés X., Holmquist B., Vallee B. L. (1984). Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH. *Biochemistry*, 23(10), 2193–9.
- Wang J.-C., Kapoor M., Goate A. M. (2012). The genetics of substance dependence. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 13, 241–61.
- Warnock J., Al-Rubeai M. (2014). Viral vectors for gene therapy. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (pp. 1–23).
- Wecker L., Watts S., Faingold C., Dunaway G., Crespo L. (2010). Gene Therapy and Emerging Molecular Therapies. In *Brody's Human Pharmacology* (5 th, pp. 5, 49–56).
- Williams K. L., Schimmel J. S. (2008). Effect of naltrexone during extinction of alcohol-reinforced responding and during repeated cue-conditioned reinstatement sessions in a cue exposure style treatment. *Alcohol*, 42(7), 553–63.
- Wu Z., Sun J., Zhang T., Yin C., Yin F., et al. (2008). Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of Hemophilia B at low vector dose. *Mol. Ther.*, 16(2), 280–289.
- Xiao Q., Weiner H., Crabb D. W. (1996). The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. *J. Clin. Invest.*, 98, 2027–2032.
- Zhang R., Iyer R. P., Yu D., Tan W., Zhang X., et al. (1996). Pharmacokinetics and tissue disposition of a chimeric oligodeoxynucleoside phosphorothioate in rats after intravenous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278(2), 971–9.
- Zindel L. R., Kranzler H. R. (2014). Pharmacotherapy of alcohol use disorders: seventy-five years of progress. *J. Stud. Alcohol Drugs. Suppl.*, 75 Suppl 1(Suppl 17), 79–88.
- Zintzaras E., Stefanidis I., Santos M., Vidal F. (2006). Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? *Hepatology*, 43(2), 352–61.

8.1 Publicaciones realizadas durante el doctorado

Sanchez A. C., Li C., Andrews B. A., Asenjo J. A., Samulski R. J. (2017). AAV gene therapy for alcoholism: Inhibition of mitochondrial Aldehyde dehydrogenase enzyme expression in Hepatoma cells. *Hum. Gene Ther.*, doi: 10.1089/hum.2017.043, [Ahead of print].

Lucero A. T., Mercado S. A., Sánchez A. C., Contador C. A., Andrews B. A., et al. (2017). Purification of adenoviral vector serotype 5 for gene therapy against alcoholism using anion exchange chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, doi:10.1002/jctb.5255, [Publicado].

RESEARCH ARTICLE

**AAV Gene Therapy for Alcoholism:
Inhibition of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase****AU1 ▶ Enzyme Expression in Hepatoma Cells****AU2 ▶** Anamaria C. Sanchez,¹ Chengwen Li,² Barbara Andrews,¹**AU3 ▶** Juan A. Asenjo,^{1,*} and R. Jude Samulski²**AU4 ▶** ¹Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB), Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile; ²Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina.

Most ethanol is broken down in the liver in two steps by alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2) enzymes, which metabolize down ethanol into acetaldehyde and then acetate. Some individuals from the Asian population who carry a mutation in the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2*2) cannot metabolize acetaldehyde as efficiently, producing strong effects, including facial flushing, dizziness, hypotension, and palpitations. This results in an aversion to alcohol intake and protection against alcoholism. The large prevalence of this mutation in the human population strongly suggests that modulation of ALDH2 expression by genetic technologies could result in a similar phenotype. scAAV2 vectors encoding ALDH2 small hairpin RNA (shRNA) were utilized to validate this hypothesis by silencing ALDH2 gene expression in human cell lines. Human cell lines HEK-293 and HepG2 were transduced with scAAV2/shRNA, showing a reduction in ALDH2 RNA and protein expression with the two viral concentration assayed (1×10^4 and 1×10^5 vg/cell) at two different time points. In both cell lines, ALDH2 RNA levels were reduced by 90% and protein expression was inhibited by 90% and 52%, respectively, 5 days post infection. Transduced HepG2 VL17A cells (ADH+) exposed to ethanol resulted in a 50% increase in acetaldehyde levels. These results suggest that gene therapy could be a useful tool for the treatment of alcoholism by knocking down ALDH2 expression using shRNA technology delivered by AAV vectors.

Keywords: gene therapy, AAV, alcoholism, ALDH2, shRNA**INTRODUCTION**

ALCOHOL IS THE MOST commonly used addictive substance in the world, causing approximately 3.3 million deaths every year (or 5.9% of all deaths).¹ The cost of excessive alcohol consumption in the United States reached almost \$250 billion in 2010, mainly due to loss of productivity, healthcare, and associated societal ills.^{2,3} The major health problems associated with alcohol abuse are liver-related diseases such as fibrosis, cirrhosis, hepatitis, and cancer. Others problems are brain and cardiovascular damage.⁴⁻⁶

Ethanol is metabolized in the liver in two steps, starting with the oxidation of ethanol to produce acetaldehyde, a reaction catalyzed by the cytosolic

enzyme alcohol dehydrogenase (ADH). Acetaldehyde is then converted to acetate by a different enzyme called aldehyde dehydrogenase, mainly by its mitochondrial isoform (ALDH2).⁷

Approximately 50% of the Asian population are heterozygous and have a normal copy of the ALDH2 gene and a mutant copy that encodes for an inactive mitochondrial isoenzyme (ALDH2*2).^{8,9} These individuals have a diminished capacity to metabolize acetaldehyde. Therefore, acetaldehyde accumulates in the blood after ethanol consumption,¹⁰ producing effects including facial flushing, dizziness, hypotension, and palpitations.¹¹ This promotes a reduction in alcohol consumption and protection against alcoholism.^{12,13}

AU5 ▶ *Correspondence: Prof. Juan A. Asenjo, Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB), Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Chile, Beauchef 851, Santiago, Chile. E-mail: juasenjo@ing.uchile.cl

Currently, only three types of medication have been approved in the United States to treat alcohol dependence: disulfiram, naltrexone, and acamprosate.^{14,15} Unfortunately, none of these medications is widely prescribed due to the limited efficacy, side effects, poor levels of patient compliance, and variable response. This has increased the efforts to identify new medications for the treatment of alcohol use disorder (AUD).¹⁶⁻¹⁹

Gene therapy has emerged as an alternative treatment for AUD. Several proof-of-principle studies indicate that gene therapy using antisense or small hairpin RNA (shRNA) technology can be employed to reduce ALDH2 expression and accumulate acetaldehyde in treated cells or animal models. In 2008, a study in rats by Ocaranza *et al.* showed that a single intravenous administration of an anti-Aldh2 antisense gene carried by an adenoviral vector reduced liver ALDH2 activity and inhibited voluntary ethanol intake by 50%, achieving a long-term reduction of alcohol intake in alcohol-dependent animals.^{12,20-22}

Several delivery vehicles have been used for gene therapy, including adenovirus, retrovirus, vaccinia virus, lipofection and adeno-associated virus (AAV). AAV is one of the most promising vectors because of its lack of pathogenicity, long-term expression, and broad tissue tropism. Thirteen human serotypes of AAV and >100 genomic variants have been discovered with different tropism. Among these, serotype 2 (AAV2) is the most widely used and described.²³

Recent advances in vector development have provided new delivery reagents to test *in vitro* and *in vivo*. Self-complementary AAV2 (scAAV2) were used for the delivery of an ALDH2 shRNA in human cell lines. Self-complementary vectors have overcome the transduction rate-limiting step of conversion of a single-stranded (ss) to a double-stranded (ds) genome prior to expression.^{24,25} In addition, AAV vectors have shown great efficiency for transducing liver and hepatic cells, resulting in six clinical trials to date in humans. Of the various AAV serotypes, AAV2 is very efficient at transducing HepG2 cells.²⁶

Small interfering RNA (siRNA) technology has been used to inhibit the expression of a target gene by degrading mRNA. One disadvantage of siRNA is its short half-life, decreasing its capability to regulate gene expression efficiently. To prolong the siRNA life-span, shRNA have been developed. shRNAs are endogenously processed into siRNAs *in vivo*. shRNA molecules are cleaved by Dicer, a dsRNA nuclease, producing a 21 nt dsRNA that forms a ribonucleoprotein

complex called the RNA induced silencing complex (RISC) to exert their function.²⁷

In this study, an ALDH2 shRNA delivered by a scAAV2 was tested to silence the expression of the ALDH2 enzyme in HEK-293 and HepG2 human cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Production of AAV vectors

AAV virus was produced in HEK-293 cells, as previously described, by the triple transfection method.²⁸ This method uses three plasmids: the rep/cap plasmid pXR2, the helper plasmid pXX6-80, and the plasmid containing the AAV genome pscAAV_shRNA_ALDH2. Plasmid pscAAV_shRNA_ALDH2 was constructed by swapping the fragment containing the U6 promoter and the shRNA sequence digested with MsiI and BamHI, from the plasmid pLKO_ALDH2 (provided by the Lenti-shRNA Core Facility, University of North Carolina) into the pSC-TTRmvmFIX digested with endonucleases HindIII and BglII. Cells were transfected employing polyethylenimine max (PEI) as DNA transporter. Forty-eight hours later, cells were collected, and the virus was purified by cesium chloride density gradient centrifugation. Peak fractions were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS), titered by quantitative polymerase chain reaction (PCR), and stored at -80°C for further experiments.

Cell lines and culture conditions

HEK-293, HepG2, and HepG2-VL17A cells were maintained at 37°C in a humidified incubator at 5% CO₂. HEK-293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) and HepG2 cells in Eagle's minimum essential medium (EMEM; ATCC). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin (100 IU/mL). HEK-293 cells expressing human ALDH2 were developed by transfecting cells with the plasmid pLX304-Blast-V5_ALDH2 (provided by the Lenti-shRNA Core Facility, University of North Carolina). Cells were transfected with PEI and selected in the presence of 30 µg/uL of blasticidin. The cell line designated HEK-293/ALDH2 showed ALDH2 expression by Western blot analysis.

Cell transfection and AAV infection

For cell transfection, HEK-293 cells were plated into a six-well plate and were transfected as described by Longo *et al.*²⁹ using PEI max (linear, MW 25,000; Polysciences, Inc.). For AAV transduction, cells were incubated with AAV at a multiplicity of

infection (MOI) of 10^4 or 10^5 vg/cell for 1 h before cells were plated. Cell transfection/transduction was followed by GFP expression. After the desired time, cells were collected, washed twice with PBS, and resuspended in M-PER reagent (Thermo Scientific) for western blotting or in Qiagen buffer for RNA extraction.

Western blot

Protein concentration was determined by Bradford (Sigma–Aldrich). For Western blot, $4\times$ Nupage reducing buffer was added to the protein lysate. The resulting solution was boiled for 10 min, chilled, and run in a 4–12% Bis-tris pre-cast gel. The gel was run in $1\times$ MOPS running buffer and transferred to a nitrocellulose membrane via iBlot 2 Dry Blotting System (Invitrogen). The membrane was blocked for 1 h with 5% nonfat milk in PBST solution (0.5% Tween 20 in $1\times$ PBS). ALDH2 Antibody (4G6A3) (Thermo Fisher MA5-17029) at 1:2,000 dilution in PBST or beta-actin antibody (mAbcam 8226) at 1:10,000 dilution in PBST were added to the membrane, and it was incubated overnight at 4°C with gentle agitation. The membrane was washed three times with PBST, and then incubated for an additional hour with a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody at 1:10,000 dilution in PBST-5% nonfat dry milk. Western-Bright Sirius chemiluminescence reagent (Advansta) was used according to the protocol, and blots were developed in the Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). Membranes were stripped for re-probing using Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce) according to the manufacturer's instructions. Western blot band intensity was quantified with the ImageJ 1.50i software (<https://imagej.nih.gov/ij>).³⁰

Reverse transcription PCR and real-time reverse transcription PCR

To quantify the levels of shRNA-targeted ALDH2 RNA transcript, a semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) was performed. RNA was prepared using a Qiagen RNeasy kit according to the manufacturer's protocol. RNA samples were treated with DNase solution (Promega). For first-strand cDNA synthesis, $1\ \mu\text{g}$ of RNA was used for retro transcription by SuperScript III RT (Thermo Fisher), followed by a RNase H treatment (Thermo Fisher). PCR was performed with Platinum Taq High fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher). The reaction has a first denaturation step at 94°C for 5 min, then 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, gradient annealing $62\text{--}54^\circ\text{C}$ for 30 s, and

extension at 72°C for 2 min, with a final step at 72°C for 10 min. The sequences of primers were as follows: GAPDH forward: ACCACAGTCCATGC CATCAC; GAPDH reverse: TCCACCACCCTGT TGCTGTA (product length: 452 bp); ALDH2 forward: CGCCTTTGTCAGCCGC and ALDH2 reverse: GTGTATGCCTGCAGCCCG (product length: 1466 bp). A minus-reverse transcriptase control was included.

Quantitative RT-PCR was performed on a Roche 480 Lightcycler instrument using SYBR green Master Mix (Roche), following the manufacturer's protocol in $10\ \mu\text{L}$ of reaction volume. Each reaction included $2\ \mu\text{L}$ of cDNA, $5\ \mu\text{L}$ of the probe master mix ($2\times$), $0.25\ \mu\text{L}$ of $20\ \mu\text{M}$ forward and reverse primers, and $2.5\ \mu\text{L}$ of RNAase/DNAase free water. A negative control without template was included in each run. The reaction has a hot start step at 95°C for 10 min for one cycle and 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s and annealing at 60°C for 10 s and extension at 72°C for 10 s. The baseline and the cp (crossing points) values were already calculated by the LC software 1.5 (Roche Applied Biosystems). The sequences of primers were as follows: GAPDH forward: ACCCAGAAGACTGT GGATGG; GAPDH reverse: TTCAGCTCAGGGA TGACCTT; ALDH2 forward: TGTGTGGGTCAA CTGCTATGA and ALDH2 reverse: TCACTTCAG TGTATGCCTGCA.

Ethanol and acetaldehyde measurements by gas chromatography

VL17-A Hepg2 cells (kindly provided by Dr. Dahn Clemens, University of Nebraska at Omaha) were incubated in sealed wells with 10, 25, or 100 mM of ethanol in EMEM for 24 h at 37°C . After incubation, a $60\ \mu\text{L}$ aliquot of cell culture supernatant was analyzed for acetaldehyde and ethanol levels using a SRI 8610c gas chromatograph (Agilent Technologies). The ethanol standard curve ranged from 0 to 100 mM, and the acetaldehyde standard curve ranged from 0 to $250\ \mu\text{M}$. Samples were distributed into tubes containing $375\ \mu\text{L}$ of water and 0.5 g of NaCl. Samples were heated in a water bath at 60°C for 10 min, and a 1.5 mL sample of headspace gas was removed and injected directly into the GC. Samples were run at 140°C through a Hayesep D column and detected with a flame ionization detector.

Hydrogen gas, carrier gas, and internal air generator flow rates were 13.3, 25, and $250\ \text{mL}/\text{min}$, respectively. Areas under the curve were analyzed with SRI PeakSimple software and converted to mM for ethanol and μM for acetaldehyde based on the standard curves.

— —
— 0
— +

Table 1. shRNA sequences and target regions

N°	Sequence	Target region (NM_000690.2)
shRNA1	GAGGACATCTATGATGAGTTT	985:1005
shRNA2	GCAGATCATTCCGTGGAATTT	540:560
shRNA3	CCCAACATCATCATGTCAGAT	871:891
shRNA4	GCAGGCATACACTGAAGTGAA	1497:1517
shRNA5	GCTGATAAGTACCACGGGAAA	457:477

Statistical analysis

Statistics were performed using Student's *t*-test. A *p*-value of <0.01 was considered a significant difference and is marked in the figures with asterisks.

RESULTS

Knocking down effect of shRNA on ALDH2 in HEK-293 cells

shRNAs were used for knocking down the expression of the human ALDH2 gene. Five different shRNA-expressing pLKO.1 plasmids were tested for their potential to silence ALDH2 gene expression (Table 1). These shRNA sequences are specific to the human ALDH2 transcript. HEK-293 cells do not express a measurable amount of ALDH2 protein. Therefore, HEK-293 cells were co-transfected with a plasmid encoding the ALDH2 cDNA and with each shRNA plasmid, including a scramble-shRNA control and a GFP plasmid (as transfection efficiency control).

After 48 h, cells were collected, and ALDH2 gene expression was detected by RT-PCR (Fig. 1A) and Western blot (Fig. 1B). Three of the five shRNA

plasmids exerted ALDH2 silencing. shRNA2 was chosen for further experiments and was cloned into the scAAV plasmid (pscAAV_shRNA), which was encapsidated into the AAV serotype 2 virion.

pscAAV_shRNA plasmid transfection to knock down ALDH2 in HEK-293/ALDH2 cells

A suitable cell line for testing shRNA should be a hepatic cell line because alcohol is metabolized in the liver, but HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma) are difficult to transfect. To test that shRNA, HEK-293 cells could be used, although as they do not express enough enzyme, a stable ALDH2-expressing cell line was developed (HEK-293/ALDH2). ALDH2 expression in the selected cells was validated by RT-PCR and by Western blot (data not shown).

ALDH2-expressing HEK-293 cells were transfected with pscAAV_shRNA to corroborate that shRNA was still silencing ALDH2 expression. RNA and protein were extracted from the transfected cells and a semi-quantitative RT-PCR (Fig. 2A) and a Western blot were performed. Cells treated with the pscAAV_shRNA plasmid showed a reduction in ALDH2 expression compared to cells treated with the pscAAV_scramble control plasmid. A 40% reduction in ALDH2 expression was estimated by Western blot image analysis (Fig. 2B).

scAAV2/shRNA transduction to silence ALDH2 in HEK-293/ALDH2 cells

To examine whether the shRNA carried by the AAV viral vector was able to silence the ALDH2

T1 ▶

F1 ▶

◀ F2

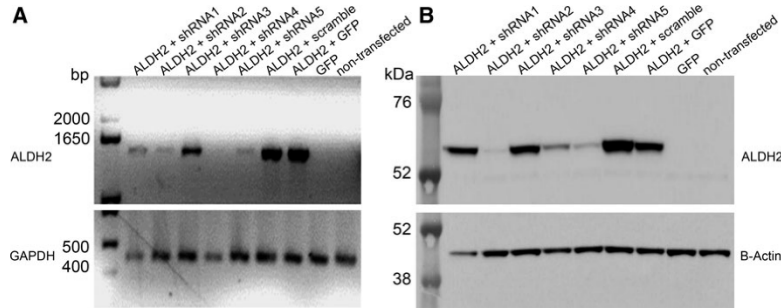


Figure 1. Small hairpin RNA (shRNA) sequence selection. HEK-293 cells were collected 48 h post transfection, and RNA and protein were extracted. Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) cDNA was co-transfected with five different shRNA plasmids (lanes 1–5); scramble and GFP plasmids co-transfection were used as ALDH2 expression control (lanes 6–7). GFP transfection (lane 8) and non-transfected cells (lane 9). (A) Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). ALDH2 expression was determined using primers designed to amplify a 1,460 bp product. Integrity of RNA was determined by amplifying a 425 bp region of the human GAPDH gene and is shown in the bottom panel. (B) Western blot of ALDH2 (56 kDa) and β -actin (42 kDa, bottom panel) in the HEK-293 cells treated as described above.

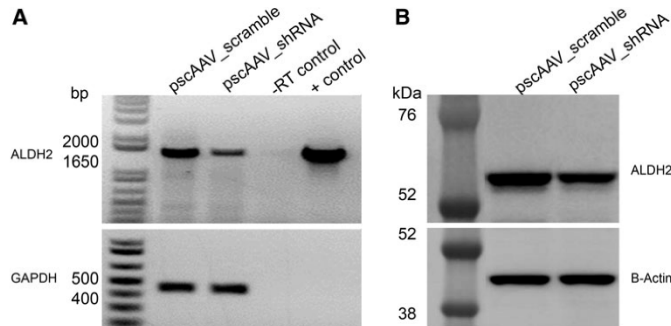


Figure 2. ALDH2 silencing by adeno-associated virus (AAV) plasmid in HEK-293/ALDH2 transfected cells. ALDH2 stable-expressing HEK-293 cells were transfected with pscAAV_shRNA plasmid. After 48 h of transfection, RNA and proteins were collected for evaluation of ALDH expression. **(A)** ALDH2 RNA expression was evaluated by a semi-quantitative RT-PCR. pscAAV_scramble transfected cells were used as control (lane 1), pscAAV_shRNA transfected (lane 2), RT control (lane 3), and positive PCR control (lane 4). Integrity of RNA was determined by amplifying a 425 bp region of the human GAPDH gene and is shown in the *bottom panel*. **(B)** Western blot of ALDH2 (56 kDa) and β -actin (42 kDa, *bottom panel*) in the HEK-293/ALDH2 cells. Scramble control (lane 1) and shRNA treated (lane 2).

gene, ALDH2 shRNA was packaged into double-stranded AAV serotype 2 (scAAV2/shRNA). HEK-293/ALDH2 cells were transduced at two different MOIs (1×10^4 and 1×10^5 vg/cell), and ALDH2 transcript and protein expression were evaluated at days 3 and 5 post infection (p.i.). As a control, cells were transduced with a scAAV2 carrying a scramble shRNA sequence (scAAV2/scramble). Transduction efficiency was >90%, as shown by GFP expression in HEK-293/ALDH2 cells transduced with scAAV2/GFP virus (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online

at www.liebertpub.com/hum). Aldh2 transcripts were quantified by reverse transcription followed by real-time PCR and compared to the scAAV2/scramble-treated cells. A reduction of 66% and 84% was observed 3 days p.i. for 1×10^4 and 1×10^5 vg/cell, respectively. For the RNA levels measured 5 days p.i., a reduction of 83% and 90% was achieved for the assayed MOIs (Fig. 3A). ALDH2 silencing was also evaluated at protein level by Western blot (Fig. 3B), and image analysis showed a reduction >90% for each of the four tested conditions.

SF1

F3

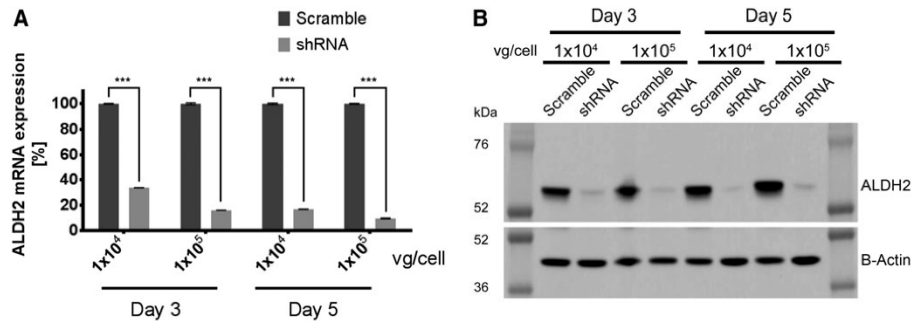


Figure 3. The knockdown efficiency of scAAV2/shRNA in HEK-293/ALDH2 cells. HEK-293/ALDH2 cells were infected with 1×10^4 or 1×10^5 vg/cell of scAAV2 carrying a scramble or shRNA sequence. At days 3 and 5 post infection, RNA and proteins were collected. The inhibition of scAAV2/shRNA on ALDH2 expression was analyzed by **(A)** real-time RT-PCR for ALDH2 transcript expression, where the ALDH2 mRNA copy number was calculated with normalization to GAPDH, and **(B)** Western blot of ALDH2 protein expression normalized by β -actin. Error bars indicate standard deviation. *** $p < 0.001$ compared to scramble-shRNA treated cells.

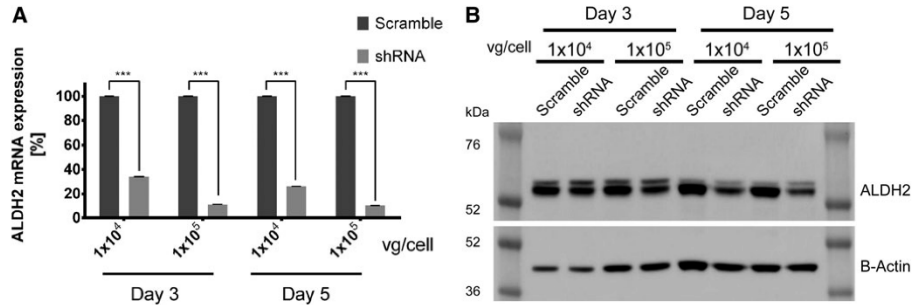


Figure 4. Inhibition of scAAV2/shRNA on ALDH2 expression in HepG2 cells. HepG2 cells were infected with 1×10^4 or 1×10^5 vg/cell of scAAV2 carrying a scramble or shRNA sequence. At days 3 and 5 post infection, RNA and proteins were collected. The inhibition of scAAV2/shRNA on ALDH2 expression was analyzed by (A) real-time RT-PCR for ALDH2 transcript expression, where the ALDH2 mRNA was normalized to GAPDH, and (B) Western blot of ALDH2 protein expression normalized by β -actin. Error bars indicate standard deviation. *** $p < 0.001$ compared to scramble-shRNA-treated cells.

scAAV2/shRNA transduction to knock down ALDH2 in HepG2 cells

The final target of this therapy was silencing ALDH2 expression in the liver. AAV2 has shown *in vitro* a good transduction efficiency for the hepatic cells HepG2.²⁶ Therefore, scAAV2/shRNA virus was used to infect HepG2 cells. Cell transduction efficiency was followed by GFP expression for 5 days. Transduced cells expressed GFP from the first day p.i., reaching the highest expression at the third day, followed by decaying GFP expression, as observed by fluorescent microscopy (Supplementary Fig. S2). RNA and protein were extracted from infected HepG2 cells infected (MOI

1×10^4 and 1×10^5 vg/cell) on the third and fifth day p.i. Real-time RT-PCR and Western blot were performed. Aldh2 transcript reduction of 66% and 74% was reached for 1×10^4 vg/cell on the third and fifth day p.i. respectively, and 89% and 90% reduction was observed for 1×10^5 vg/cell at both assayed time points (Fig. 4A). Protein expression was evaluated by Western blotting. For HepG2 cells, two bands were visualized for ALDH2 antibody. This might be due to the expression of different ALDH isoforms. For image analysis, only the small size band was considered. At day 3 p.i., a reduction of ALDH2 expression of 20% and 37% was achieved for the assayed MOIs (1×10^4 and 1×10^5 vg/cell).

SF2 ▶

◀ P4

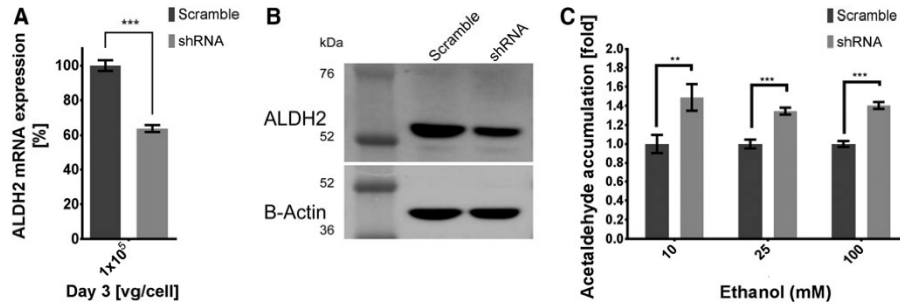


Figure 5. Acetaldehyde accumulation by ALDH2 knockdown in VL-17A HepG2 cells. VL-17A HepG2 cells were infected with 1×10^5 vg/cell of scAAV2/shRNA for 3 days. Inhibition on ALDH2 mRNA transcript was quantified by (A) real-time RT-PCR normalized with GAPDH expression. Silencing by scAAV2-carried shRNA of ALDH2 protein expression was compared to scramble-treated cells by (B) ALDH2 Western blot normalized by β -actin. VL-17A HepG2 hepatocyte-like ethanol response in shRNA treated cells compared to scramble treated cells was assayed by (C) acetaldehyde accumulation measured via gas chromatography at 10, 25, and 100 mM ethanol concentrations. Error bars indicate standard deviation. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to scramble-shRNA treated cells.

For the same assayed MOIs, protein expression was reduced by 33% and 52% on the fifth day p.i. (Fig. 4B).

scAAV2 delivery of shRNA increases acetaldehyde levels

F5 ▶ As a functional assay, HepG2 cells were exposed to ethanol, and acetaldehyde accumulation was measured. However, HepG2 cells do not express ADH and CYP2E1, the enzymes responsible for ethanol oxidation to acetaldehyde.³¹ VL-17A HepG2 cells were kindly provided by Dr. Dahn Clemens (Omaha, NE), and this cell line exhibits hepatocyte-like characteristics in response to ethanol. ALDH2 silencing was evaluated in VL-17A HepG2 cells transduced with 1×10^5 vg/cell on the third day p.i. by real time RT-PCR (Fig. 5A) and Western blot (Fig. 5B), showing an expression reduction of 40% compared to the scramble control in both analyses. Cells were incubated with ethanol (10, 25, and 100 mM) and acetaldehyde accumulation was measured by gas chromatography after 24 h of incubation. Samples treated with the scAAV2/shRNA virus showed an increase of acetaldehyde levels of 50%, 30%, and 40% for each ethanol concentration assayed (Fig. 5C).

DISCUSSION

This study has demonstrated that a single shRNA was effective at inhibiting ALDH2 enzyme expression *in vitro* using scAAV in human cell lines.

ALDH2 silencing is transduced in a lower acetaldehyde metabolism, inducing its accumulation and dysphoric effects. Drinking alcohol with an impaired acetaldehyde metabolism is known as an Asian phenotype, resulting in an intolerance to alcohol consumed and thus preventing alcohol abuse.²⁰

Several studies have shown that gene therapy could be an alternative for alcoholism treatment. These studies have used different silencing methodologies for reducing ALDH2 expression. The first approach was the use of molecules with a short half-life such as phosphorothioate nucleotides, but these were not a good alternative, since they required continuous administration.²⁰ Another approach was the use of long antisense molecules delivered by adenovirus showing a longer half-life, but due to their long sequence and the existence of several ALDH isoforms, these molecules do not exclusively silence ALDH2 expression.^{12,22,32}

Due to the disadvantages of the silencing molecules mentioned above, shRNA appears to be a better alternative for knocking down ALDH2

expression,²¹ since it is designed to target only one specific region of the mRNA. Another tool used for silencing ALDH2 are hairpin ribozymes.³² This strategy has shown a good efficacy at reducing ALDH2 activity *in vitro* or *in vivo* using a well-established rodent as model,³³ showing a reduction of voluntary alcohol intake of 50%.¹² It is important to highlight that the different silencing tools have never been tested for the human gene of Aldh2.

In spite of the great homology between the rat and human gene (88% identity), it is important to test the knocking down potential for the human gene, especially when the therapeutic molecule is designed to improve the specificity for targeting only one gene and not to affect the expression of relative genes or isoforms of the same protein. Some rules and guides have been established for the design of active shRNA molecules^{27,34,35} and many shRNA commercial libraries are available. Nevertheless, the efficiency of a shRNA sequence for knocking down the expression of a desired gene must be tested. In this work, five sequences were tested, of which three showed activity in the assayed conditions.

Studies have shown that despite the small packaging capacity of the scAAV (2.3 kb),³⁶ multiple shRNA sequences could be cloned in tandem between the ITR viral sequences.³⁷ This study have tested five shRNA sequences separately, showing different efficiency for knocking down ALDH2 expression at the RNA and protein level. For simplicity, only one of the tested shRNA was chosen to be cloned into the scAAV plasmid. Further experiments could use a combination of these shRNA sequences in the search for an additive effect to knock down ALDH2 expression.

AAVs have shown to be a promising choice as vectors for gene therapy. Several clinical trials have been conducted using AAV for many diseases, including hemophilia B.³⁸⁻⁴⁰ Different serotypes and variants have been described to target many tissues.²³ Serotype 8 is the best for transducing liver *in vivo*, showing a reduced capacity to transduce the HepG2 cell line.⁴¹ For *in vitro* studies, AAV2s have shown the greatest ability to transduce different cell types.²⁶ scAAV vectors have shown an enhanced transduction over AAV and have emerged as an important vehicle for delivering the shRNA sequence.^{24,42,43}

scAAV2 carrying an shRNA for hALDH2 were used to transduce human cell lines in order to test their efficacy for reducing ALDH2 expression. HEK-293 cells were chosen, since they are easy to grow in culture and are known to be efficiently transduced by AAV2.

— —
— 0
— +

A stable ALDH2-expressing HEK-293 cell line was established and transduced with scAAV2/shRNA viral particles. Protein expression was reduced to minimal levels at 5 days p.i., even when cells were infected at low MOI (1×10^4 vg/cell). Due to the effectiveness for knocking down the ALDH2 expression in this cell line, a lower viral dose could be used, providing a safer profile for future clinical trials.⁴⁴

HepG2 cells have been used as a model for ethanol metabolism and express constitutively measurable amounts of ALDH2.^{31,45} It is known that mitochondrial proteins are synthesized as larger precursors carrying a N-terminal extension that is cleaved off by specific peptidases.⁴⁶ UNIPROT information of ALDH2 protein sequence reports that the displayed sequence is further processed into a mature form (www.uniprot.org/uniprot/P05091#sequences). ALDH2 protein sequence was analyzed by the MitoFates web server (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/>),⁴⁷ and a cleavage site was predicted. The immature isoform of ALDH2 would be the complete protein (517 aa) with a predicted molecular weight of 56.381 kDa, corresponding to the higher and less intense band of the Western blot, and the mature form (501 aa) with a predicted molecular weight of 54.558 kDa, the lower and more intense band of the Western blot.

HepG2 cells were transduced by scAAV2/shRNA at 1×10^5 vg/cell. ALDH2 expression was analyzed by Western blotting, reaching 52% protein expression inhibition on day 5 p.i. The scAAV2/shRNA was more efficient at knocking down the ALDH2 expression in the HEK-293/ALDH2 cell line compared to HepG2 cells. The difference could be explained by the efficiency of the virus to transduce and deliver the shRNA, the expression levels of the shRNA, and the half-life of the ALDH2 protein could be different in the tested cell lines, resulting in different levels of ALDH2 silencing. Previous studies have shown that a reduction >40% in ALDH2 activity resulted in a noticeable inhibi-

tion of alcohol intake in a rat model.^{12,20} This moderate reduction of ALDH2 activity can achieve the desirable effect of reducing alcohol consumption, minimizing the risks of complete silencing.³²

As a functional assay, acetaldehyde accumulation was measured by gas chromatography in scAAV2/shRNA transduced cells. Transduced cells were cultured at three ethanol concentrations simulating light, moderate, and alcohol-dependent consumers.^{48,49} Acetaldehyde concentration increased by 50%, 30%, and 40%, respectively, compared to samples treated with the scramble control vector.

The present study has shown that scAAV2 vectors encoding a single ALDH2 shRNA are effective in decreasing mitochondrial ALDH2 in HEK-293/ALDH2, HepG2, and VL-17A HepG2 cell lines and increases acetaldehyde levels.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dahn L. Clemens for providing the HepG2 VL17A cells, and Violeta Zaric, Darin Knapp, Melisa Soland, Matthew Hirsch, Xinghua Zeng, Matthew Smith, Ping Zhang, Alicia Lucero, and Sergio Mercado for their excellent technical assistance. A.C. Sanchez received National PhD Scholarships (#21120422) and Visiting Scholar Scholarships (2015) from the National Commission for Scientific and Technological Research (CONICYT). This work was partially supported by the Basal Programme of Conicyt (Chile) for funding of the Centre for Biotechnology and Bioengineering, CeBiB (project FB0001), by PAI project from Conicyt (Chile 2015 #7815120002), and by National Institutes of Health Grants R01DK084033 and R01AI117408 (to C.L. and R.J.S.), R01HL125749 (to C.L.), and P01HL112761 and R01AI072176 (to R.J.S.).

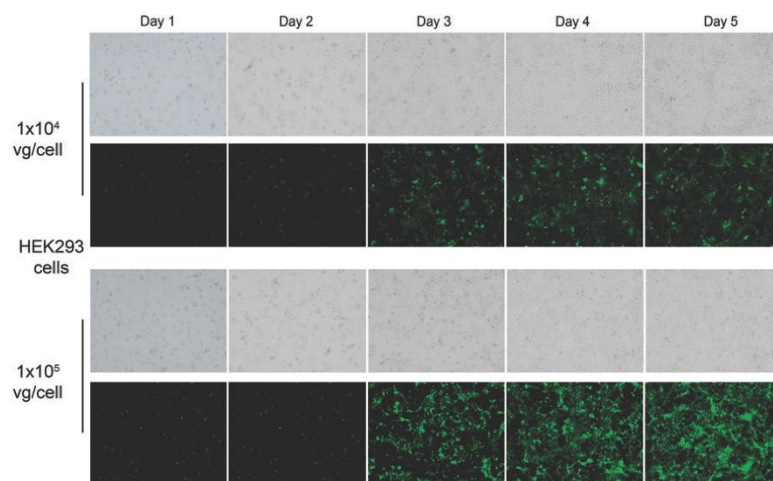
AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interests exist.

REFERENCES

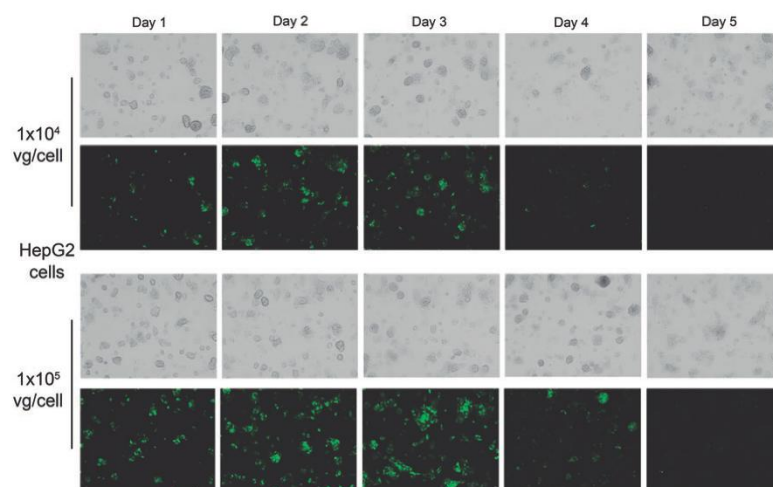
- World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2014. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2014.
- Sacks JJ, Gonzales KR, Bouchery EE, et al. 2010 National and state costs of excessive alcohol consumption. *Am J Prev Med* 2015;49:e73–e79.
- Carr GD. Alcoholism: a modern look at an ancient illness. *Prim Care* 2011;38:9–21.
- Rundio A Jr. Understanding alcoholism. *Nurs Clin North Am* 2013;48:385–390.
- McKillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver cancer. *Alcohol* 2005;35:195–203.
- Go VLW, Gukovskaya A, Pandolfi SJ. Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol* 2005;35:205–211.
- Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 2012;16:667–685.
- Peng G-S, Yin S-J. Effect of the allelic variants of aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 and alcohol dehydrogenase ADH1B*2 on blood acetaldehyde concentrations. *Hum Genomics* 2009;3:121–127.
- Chen CC, Lu RB, Chen YC, et al. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism. *Am J Hum Genet* 1999;65:795–807.

Supplementary Data



Supplementary Figure S1. Transduction efficiency in HEK-293/ALDH2 cells. ALDH2 stable expressing HEK-293 cells were transduced with eGFP scAAV serotype 2 at two different MOIs: 10,000 or 100,000 vg/cell. Cells pictures were taken at 10 \times magnification for five consecutive days post infection. Bright field is shown as control for each MOI, and transduction efficiency was visualized with fluorescent microscopy (50 ms exposure).

— -
— 0
— +



Supplementary Figure S2. Transduction efficiency in HepG2 cells. HepG2 cells were transduced with eGFP scAAV serotype 2 at two different MOIs: 10,000 or 100,000 vg/cell. Cells pictures were taken at 10× magnification for five consecutive days post infection. Bright field is shown as control for each MOI, and transduction efficiency was visualized with fluorescent microscopy (150 ms exposure).

Purification of adenoviral vector serotype 5 for gene therapy against alcoholism using anion exchange chromatography

Alicia T Lucero, Sergio A Mercado, Anamaría C Sánchez, Carolina A Contador, Barbara A Andrews and Juan A Asenjo*

Abstract

BACKGROUND: Gene therapy is a potent alternative for long-lasting inhibition of alcohol consumption. This study compares the purification of a recombinant adenoviral vector serotype 5 (rAdV5) for use in gene therapy against alcoholism using two anion-exchange methods.

RESULTS: Two anion-exchange chromatography methods using fast protein liquid chromatography were compared using a packed-bed column (Q-Sepharose™ XL) and two monolithic columns (CIM™ QA-1 and CIM™ DEAE-1). An improved and reproducible separation of recombinant adenovirus type 5 from cell lysate contaminants was achieved using the two strong anion-exchange columns in a two-step gradient chromatography. Higher adenovirus yields were achieved using the CIM QA-1 tube monolithic column at sample volumes of both 1 and 10 mL compared with the Q-Sepharose XL column. At higher flow rates, the CIM QA-1 tube monolithic column achieved better separation of the target fraction. Process recovery was improved from 28% using the Q-Sepharose XL column to 34% with the CIM QA-1 tube monolithic column quantified as vector genome. Analysis by SDS-PAGE demonstrated a purity of 70% for purified adenovirus using the CIM QA-1 tube monolithic column.

CONCLUSION: This study indicated that the use of a CIM QA-1 tube monolithic column is a better alternative than Q-Sepharose XL, and CIM DEAE-1 tube monolithic columns for the primary purification process of rAdV5 carrying the human aldehyde dehydrogenase-2 antisense gene. This purification strategy has been used as a basis to scale-up a GLP process for the production of material at the National Research Council of Canada to be used in preclinical trials of this gene therapy against alcoholism.

© 2017 Society of Chemical Industry

Keywords: adenovirus serotype 5; alcoholism; anion-exchange; columns; gene therapy; purification

ABBREVIATIONS

ALDH2	mitochondrial aldehyde dehydrogenase
anti-Aldh2	antisense RNA molecules that inhibit ALDH2 gene expression
CV	column volumes
FPLC	fast protein liquid chromatography
hALDHfw	forward primer fragment ALDH
hALDHrev	reverse primer fragment ALDH
MOI	multiplicity of infection
rAdV5	recombinant adenovirus serotype 5
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
TEM	transmission electron microscopy.

INTRODUCTION

Alcoholism is a chronic disease that causes very serious social and economic problems worldwide.¹ Numerous studies have shown that only two genes are associated as protective genetic factors against alcoholism: a gene coding for a slow form of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2), and one for a fast form of alcohol dehydrogenase (ADH).^{2–4} ALDH2 is involved in the oxidation of acetaldehyde to acetate, acetaldehyde is a toxic metabolite of

alcohol, acetate is excreted. A single dominant negative mutation in the gene coding for mitochondrial ALDH2 can provide protection against alcohol abuse.⁵ Those who have this mutation cannot degrade acetaldehyde into acetate and show marked elevations in blood acetaldehyde levels when consuming ethanol. This leads to a strong reaction that deters further alcohol intake. Existing pharmacological therapies for treating alcoholism include administration of drugs that inhibit ALDH such as disulfiram. Disulfiram is the most efficient drug in the treatment of alcoholism and has been used to treat alcohol dependence for over 50 years.^{6,7} However, the prescription of disulfiram has decreased in recent years due to its high toxicity and low patient compliance.^{8,9}

An attractive alternative for long-lasting inhibition of ethanol consumption is the administration of vectors that code for anti-Aldh2 antisense RNA molecules thus inhibiting ALDH2 gene expression. Several *in vitro* and *in vivo* studies support

* Correspondence to: JA Asenjo, Centre for Biotechnology and Bioengineering, CeBiB, Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile. E-mail: juasenjo@ing.uchile.cl

Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile

this approach.^{5,10,11} Ocaranza *et al.* showed in rats that a single intravenous administration of the Δ E1-adenoviral vector (AdV) carrying the rat anti-Aldh2 antisense gene reduced ALDH2 activity in the liver by 85% and inhibited voluntary ethanol consumption by 50% for 34 days in alcohol-dependent rats. These promising results suggest that gene therapy is a potent alternative for long-lasting inhibition of alcohol consumption.

Adenoviral vectors offer an appealing vehicle for gene transfer and vaccine delivery because of their broad tissue tropism, large transgene packaging capacity, and the high level of transgene expression elicited in the host.¹² Although adenoviruses often induce humoral, mucosal and cellular immune responses to antigens encoded by the inserted foreign genes, these vectors have been widely investigated for gene delivery in numerous clinical protocols and they are still considered among the most effective vaccine vectors.^{13–16} To date, approximately 25% of all gene therapy trials have involved Δ E1 adenoviral vector.¹⁷

A relevant factor in viral vector production is downstream processing. For clinical trials, viral vector preparations need to comply with stringent standards, which are forcefully scrutinized by regulatory agencies. Downstream processing is focused on eliminating impurities from host cells or culture media. Contaminants and impurities can induce immunological response, so must be removed. Moreover, infective vectors must be separated from empty capsids.¹⁸ In addition, scalable upstream and downstream processes need to be implemented. Consequently, the downstream processing steps are designed to achieve high recovery yields of viral vectors with defined critical quality attributes.¹⁹

The classical method for purifying viral vectors in the laboratory is density gradient centrifugation using cesium chloride (CsCl). However, CsCl-density gradient centrifugation is not easily scaled-up, and it involves high costs for large-scale applications. In contrast to traditional processes using CsCl, liquid chromatography offers a direct linear scale-up, and procedures for purifying up to around 10^{14} particles.²⁰ Anion-exchange chromatography has been applied to large-scale adenovirus preparations, with particle-based resins such as Q-Sepharose XL, Resource Q and Source 15Q being the most frequent.^{19,21} However, a different generation of chromatography media that does not require packed beads has been developed for downstream processing of viruses, VLP, phages, pDNA and large proteins.²² Monoliths are homogenous columns with a continuous porous bed matrix interlaced with channels. These channels are large in size (1–5 μ m) when compared with typical resins of packed-bed pore size (5–100 nm), increasing the potential binding capacity of macromolecules such as adenoviruses. Monolithic columns are distinguished for their high flow that is independent of the performance. These columns achieve faster separation, concentration and purification, covering the principal issues for the scale-up viral vector production.^{23,24}

Even when several purification methods have been described for adenoviral vectors, an optimization of the purification process is important for the yield and quality of adenoviral vectors.^{17,19} At present, there is no therapeutic vaccine for alcoholism treatment. In order to develop and validate this gene therapy against alcoholism in humans, it is necessary to develop a protocol for the purification of anti-Aldh2 antisense adenoviral vector for pre-clinical trials. This study compares the purification of recombinant adenoviral vectors serotype 5 using a packed-bed column (Q-Sepharose XL) and two monolithic columns (CIM QA-1 tube monolithic and CIM DEAE-1 tube monolithic) for use in gene therapy to treat alcoholism.

MATERIALS AND METHODS

Cell line

The fast growing HEK-293-F cell line (Invitrogen) was used for adenovirus production. Cells were grown at 37 °C in a humidified incubator (Shel Lab Model TC2323) at 5% CO₂. Cells were propagated until reaching 70–85% confluent monolayers, as determined by microscopic observation (Olympus CK2), and were maintained at the exponential growth phase by passaging every 2 days in 75 cm² tissue culture flasks. The passage was recorded according to the propagation. They were subcultured to 0.3×10^6 cells per mL three times a week.

Culture media and culture conditions for HEK-293-F cell line

HEK-293-F cells were grown as an attached culture in medium developed in house, which consisted of DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen), 5 mM L⁻¹ penicillin/streptomycin (Invitrogen), 2.44 g L⁻¹ sodium bicarbonate (Sigma), 10 mg L⁻¹ ascorbic acid (Sigma), 1 mg L⁻¹ putrescine (Sigma), 0.02% p/v Pluronic F68 (Sigma), 0.01% v/v ethanolamine (Sigma), 5 mg L⁻¹ sodium selenite (Sigma) and 1.65 mL L⁻¹ mercaptoethanol (Sigma) as previously described.²⁵ The pH of the medium was 7.0 and phenol red was used as a pH indicator.

Cell viability was determined using a haemocytometer-based trypan blue dye exclusion assay.

Recombinant adenoviral production

Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 with the first generation rAdV5 vector containing the human anti-Aldh2 antisense RNA molecules, which inhibit ALDH2 gene expression under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The rAdV5 vector was kindly provided by Dr Yedy Israel. Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ incubator (Shel Lab Model TC2323). Typically, 48 hours after infection, cells were collected by centrifugation (BOECO C-28), resuspended in fresh medium, and subjected to three cycles of freeze–thaw. Cells and debris were removed by centrifugation (BOECO C-28) and the supernatant, containing liberated adenovirus, was stored at –80 °C.

Anion-exchange adenoviral purification

Fast protein liquid chromatography (FPLC) purification was conducted using an AKTA system (GE Healthcare). Buffer A was 20 mmol L⁻¹ Tris–HCl (Sigma) pH 7.5 and buffer B was 20 mmol L⁻¹ Tris–HCl (Sigma), 2 mol L⁻¹ NaCl (Merk) pH 7.5. Viral vectors were purified using three different anion exchange columns: the strong anion-exchanger Q-Sepharose XL (HR5/5, 1 mL, GE Healthcare), the strong anion-exchanger CIM QA-1 tube monolithic, and the weak anion-exchanger CIM DEAE-1 tube monolithic (1 mL each, BIASeparation). For the Q-Sepharose XL and CIM DEAE-1 tube monolithic columns, separations were carried out with a flow rate of 1 mL min⁻¹ and for CIM QA-1 tube monolithic at 1, 5 and 10 mL min⁻¹.

Linear and two-step gradient elution were adapted from the literature.^{21,22} The columns were equilibrated with buffer A and after sample loading (filtered crude lysate of 1 or 10 mL) linear gradient elution was carried out with a linear gradient of NaCl from 0 to 1 mol L⁻¹ in buffer A for 30 column volumes (CV). Two-step gradient elution was achieved with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.35 mol L⁻¹ in buffer A for 4 CV, a subsequent hold at this point for 6 CV, a second gradient of NaCl from 0.35 to 1.2 mol L⁻¹ in

buffer A for 10 CV, and a final hold to 1.2 mol L^{-1} NaCl for 10 CV. All samples to be assayed were filtered at $0.45 \mu\text{m}$ beforehand. After each analytical run, columns were cleaned by elution with 2 CV of 0.5 N sodium hydroxide (Winkler).²⁶

Quantification of total virus particles (vp) was determined by UV absorbance at 260 nm (A260) using the conversion factor 1.1×10^{12} particles per absorbance unit at 260 nm .^{21,27}

Viral vector structural analysis by TEM

The adenovirus vector morphology and integrity were evaluated by transmission electron microscopic (TEM) visualization of negatively stained virions. Briefly, $10 \mu\text{L}$ of undiluted sample were put on Parlodion[®] coated grids for 15 s. After staining in 1% uranyl acetate for 1 min, grids were evaluated and photomicrographed with a Phillips Tecnai operated at 12 to 80 kV. Images were captured on Kodak EM film SO-163, and the negative was scanned at 300 dpi in an Epson Perfection 3170 Photo Scanner to a TIF file.

Quantitative amplification of adenovirus by RT-PCR

The inserted gene was quantified by using RT-PCR assay. Real-time PCR was performed using a LightCycler[®] Nano System (Roche Diagnostics) with SYBR green dye, according to the manufacturer's instructions. The reaction mixture ($20 \mu\text{L}$) contained $5 \mu\text{L}$ of adenoviral DNA extract, $10 \mu\text{L}$ of 2X Fast Start Essential DNA Green Master mix (Roche Diagnostics), $1 \mu\text{L}$ each of both forward and reverse primers ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), and $3 \mu\text{L}$ of nuclease free water. Viral DNA was extracted using High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics).

The PCR protocol was as follows: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 600 s and 50 cycles of $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 s to denature the template DNA, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 s for primers to anneal, and $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 s for primer extension.

Two ALDH internal primers, hALDHfw $5' \text{ GGCTGGGCTGATAAGT ACCAC } 3'$ and hALDHrev $5' \text{ CAGGTTGGCCACATAGACGGC } 3'$ produced a 200 bp DNA fragment. In each real-time PCR assay, a standard curve was calculated using serial dilutions of a standard plasmid that carries the anti-Aldh2 antisense. All samples were analyzed in duplicate.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate (Calbiochem) 12.5% polyacrylamide gels were prepared to resolve the proteins. Fifteen microliters of samples were prepared according to previous protocols and loaded to the gel.²⁸ The gel was stained with Coomassie blue solution for 1 hour and destained by several washes with a destaining solution. Finally, the gel was washed with distilled water and photographed. Each gel contained $5 \mu\text{L}$ of prestained protein molecular weight ladder (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas).

The molecular weight of the bands was calculated using GelAnalyzer 2010 software (Copyright 2010 by Istvan Lazar and Dr Istvan Lazar).

RESULTS

Production of recombinant adenovirus serotype 5 (rAdV5)

For production of rAdV5, HEK-293-F cells were infected at a MOI of 10 using an adenoviral stock and maintained at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a 5% CO_2 incubator. A negative control culture (i.e. no infection) was prepared for simultaneous observation. The progress of rAdV5 production in the culture was observed via phenotypic changes to the HEK-293-F cell culture, and color change in the medium from

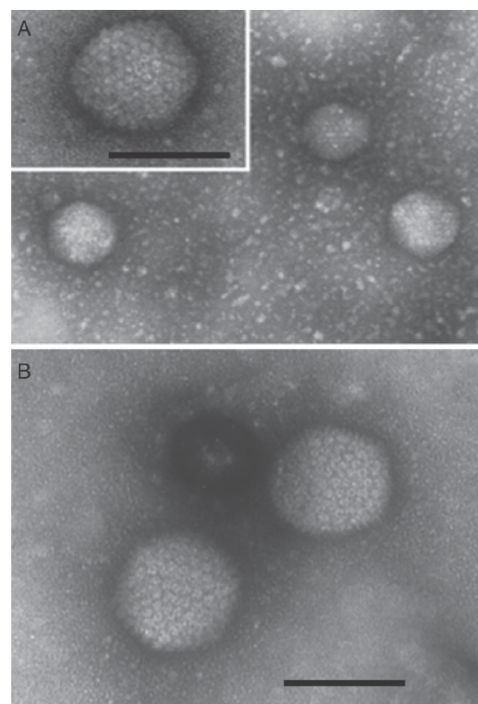


Figure 1. Structural analysis of rAdV5 by transmission electron microscopy. (A) Non-purified virion particles from cellular homogenate. Bar insert 100 nm. (B) Purified virion particles using CIM QA-1 tube monolithic columns, flow rate of 1 mL min^{-1} , 10 mL sample. Bar insert 100 nm.

red to orange or yellow. After 24 hours, infected cells exhibited a cytopathic effect when compared with the negative control (data not shown) indicative of the presence of the adenovirus; some of the cells adopted a round shape and detached from the plate, and could be seen floating in the medium. Generally, 2 days after transfection was the optimal point to prepare rAdV5 stocks since a substantial cytopathic effect was observed.

To ensure the integrity of the virus, a structural analysis was performed using transmission electron microscopic (TEM) visualization of the rAdV5 from the crude extract and purified (Fig. 1). TEM of crude lysates from HEK-293-F cells after negative staining revealed typical adenovirus particles of icosahedral structure and approximately 85 to 100 nm diameter. Little aggregation was observed, 90% of the virions were present as single virions as shown in Fig. 1(A). Cell debris or proteinaceous species were observed in crude homogenate.

Comparison of rAdV5 purification by linear gradient chromatography

Three anion-exchange columns were evaluated for rAdV5 purification and the same batch of produced virus was used to compare the purification methods. For that purpose, cell lysate supernatant was initially purified with a linear gradient using Q-Sepharose XL, CIM QA-1 tube monolithic and CIM DEAE-1 tube monolithic columns. Samples of 1 mL were applied to the columns at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

Figure 2 shows adenovirus purification profiles by linear gradient chromatography. Adenovirus bound readily to Q-Sepharose XL, CIM QA-1 tube monolithic and CIM DEAE-1 tube monolithic columns at pH 7.5, and the adenovirus was eluted in the salt concentration ranges 0.56–0.58, 0.47–0.51 and 0.52–0.59 mol L⁻¹ NaCl, respectively. As previously reported by Whitfield *et al.* sample components eluted as multiple peaks, with varying 260/280 nm absorbance ratios due to the protein and adenovirus. The flow-through (FT) peak had an A260/280 ratio >1, indicative of adenoviruses. Then, a fraction of rAdV5 was lost in the FT. rAdV5 was mainly eluted in the last peak as highlighted in Fig. 2. From Fig. 2, it is observed that a poor resolution was obtained using both monolithic columns compared with Q-Sepharose XL to quantify virus particles (vp). 2.2×10^9 vp were purified using Q-Sepharose XL. When comparing the monolithic columns, there is a notable increase in separation of the target fraction from the starting material in the strong anion-exchange CIM QA-1 tube monolithic column. On the other hand, the positive charge of the CIM DEAE-1 tube monolithic column is not sufficient for optimal binding of rAdV5, which is negatively charged at pH 7.5, as this is a weak anion exchange column.

Comparison of rAdV5 purification by two-step gradient chromatography

As limited component separation was achieved following a single linear gradient for monolithic columns, a two-step gradient elution method was used to increase baseline resolution of the rAdV5 particles from host cell contaminants as described by Whitfield *et al.*

Purification using a two-step gradient was performed for the three columns to compare their performance. Adenovirus bound to the different columns at pH 7.5 and it was eluted in the same conductivity range as with the linear gradient. As shown in Fig. 3, virus purification was achieved in each case. Three distinct peaks were observed using the Q-Sepharose XL column with a two-step gradient, the largest of which contained adenoviral vector. In addition, total virus particles were 1.9×10^{10} vp. In CIM QA-1 tube monolithic chromatography profiles, it is clear that adenovirus was separated from other contaminants with an improved resolution compared with linear gradient chromatography. In this case, 2.5×10^{10} vp were obtained, which is higher than the value achieved using the Q-Sepharose XL column. In the case of the CIM DEAE-1 tube monolithic column, rAdV5 still contain contaminating proteins since a defined peak is not observed in the chromatography profile.

With Q-Sepharose XL, and CIM QA-1 tube monolithic columns it can be seen that adenovirus peaks are more distant from peaks of major contaminants compared with the linear gradient protocol.

Purification of rAdV5 using two-step gradient chromatography at different flow rates

1.5 mL min^{-1} is the maximum flow rate of the Q-Sepharose XL HR5/5 column used in this study. In contrast, it is well known that monolithic columns support higher pressures and operate at higher flow rates.^{22,23} Therefore, purification was performed at three different flow rates using the CIM QA-1 tube monolithic column to analyze the elution profile in each case. The sample for analysis was 1 mL of supernatant cell lysate and a two-step gradient protocol as described above was used at 1, 5 and 10 mL min⁻¹. Figure 4(A), (B) and (C) showed the elution profiles at the respective rates. For the three flow rates we were able to accomplish the separation of intact adenovirus particles from contaminants

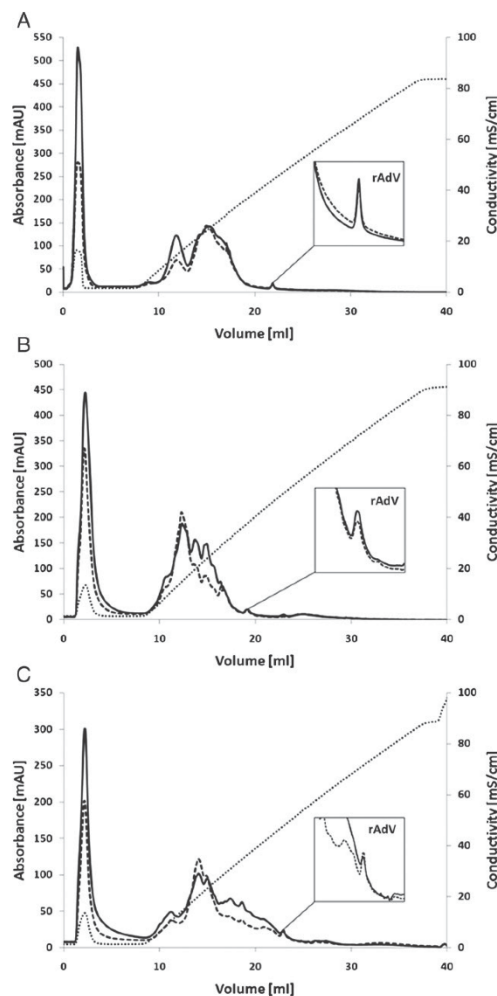


Figure 2. Elution profiles of rAdV5 cellular lysate by anion-exchange. (A), (B), (C) show linear gradient using Q-Sepharose XL column, CIM QA-1 tube monolithic column and CIM DEAE-1 tube monolithic column, respectively. Flow rate 1 mL min^{-1} , sample volume 1 mL. Each figure shows a magnification of the chromatogram with the elution of rAdV5. The solid line is UV260 nm, segmented line is UV280 nm and dotted line is mobile phase conductivity.

with similar elution profiles. However, it is observed that adenovirus eluted in a wider conductivity range at higher flow rates. In each case, chromatography profiles showed 2 eluting peaks of adenovirus near each other and it can be seen that as the flow rate increases these peaks elute closer together. The peak eluting at 18.6 min (Fig. 4(A)) has a better resolution at 1 mL min^{-1} than with the other flow rates tested. The second peak is obtained in fractions with a lower virus concentration. Despite this, the results obtained with all flow rates are adequate, since they were able to separate major contaminants and reduce the time of chromatography.

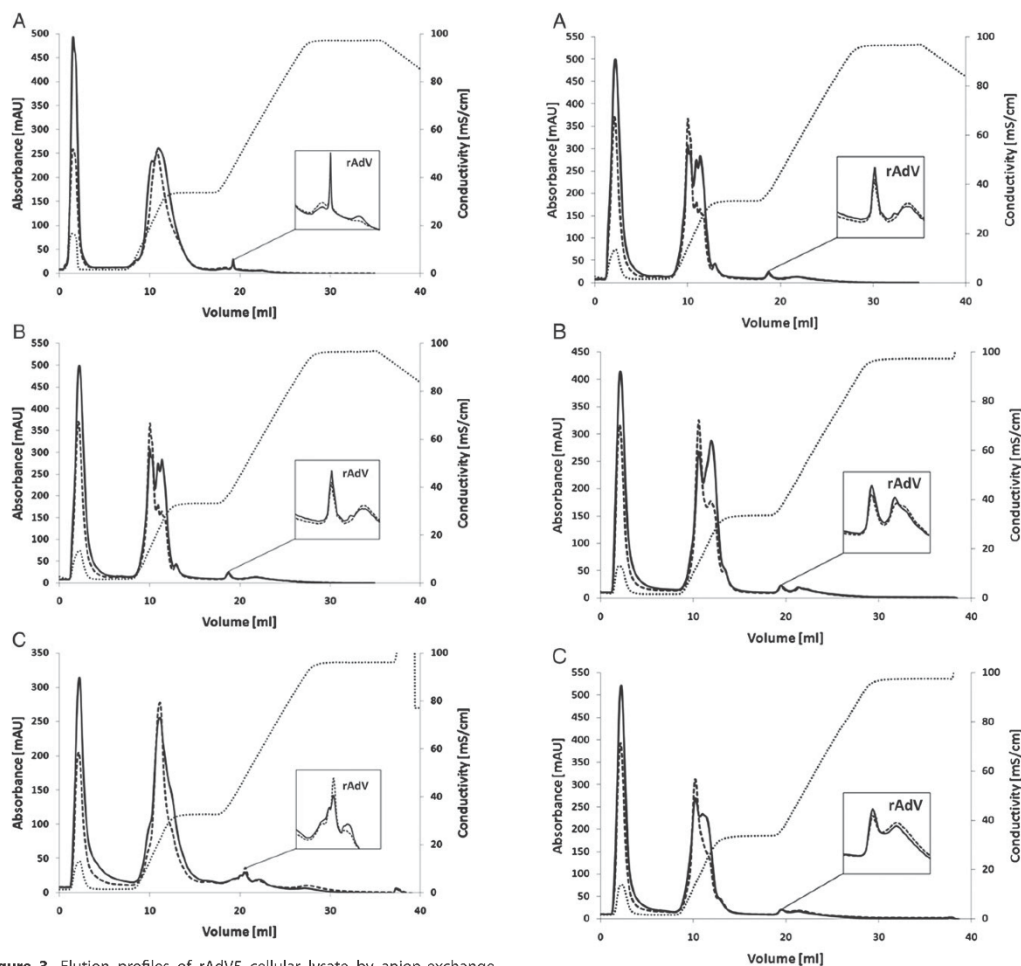


Figure 3. Elution profiles of rAdV5 cellular lysate by anion-exchange. (A), (B), (C) show 2-step gradient using Q-Sepharose XL column, CIM QA-1 tube monolithic column and CIM DEAE-1 tube monolithic column, respectively. Flow rate 1 mL min^{-1} , sample volume 1 mL . Each figure shows magnification of the chromatogram with the elution of rAdV5. The solid line is UV260 nm, segmented line is UV280 nm and dotted line is mobile phase conductivity.

Figure 4. Elution profiles of rAdV5 cellular lysate by anion-exchange using 2-step gradient and different flow rates with CIM QA-1 column. (A) Elution profile at a flow rate of 1 mL min^{-1} . (B) Elution profile at a flow rate of 5 mL min^{-1} . (C) Elution profile at a flow rate of 10 mL min^{-1} . Sample volume 1 mL . Each figure shows a magnification of the chromatogram with the elution of rAdV5. The solid line is UV260 nm and dotted line is mobile phase conductivity.

In addition, the number of virus particles was 80% and 48% higher at 5 mL min^{-1} and 10 mL min^{-1} compared with the previous elution at 1 mL min^{-1} . These values indicate that the recovery increases at higher flow rates. Also, this relationship is not linear since a higher recovery was obtained at 5 mL min^{-1} than 10 mL min^{-1} . The maximum flow rate recommended by the manufacturer is 10 mL min^{-1} .

For any of the three flow rates a second polishing step is required to achieve the desired level of purity for therapeutic purposes.¹⁹

Purification of rAdV5 using two-step gradient chromatography at different sample volumes

All analyses presented above were conducted with a sample volume of 1 mL to compare elution profiles of different

columns with different gradient conditions and flow rates. Yet, for large-scale virus production it is necessary to find the maximum sample volume that can be loaded onto the columns without reducing resolution while maintaining performance. Furthermore, it is known that monolithic columns have higher dynamic binding capacity for large molecules compared with traditional columns.^{22,23} Hence a comparison was made of the purification of a sample volume of 10 mL using Q-Sepharose XL and CIM QA-1 tube monolithic columns, with a two-step gradient. Adenovirus eluted as multiple peaks in both cases as shown by Fig. 5(A) and (B). At $\sim 28 \text{ mL}$ the magnitude of the peak for rAdV5 increased using Q-Sepharose XL. In the case of CIM QA-1 tube monolithic column, rAdV5 eluted at ~ 27 and 29 mL . Higher adenovirus recovery was

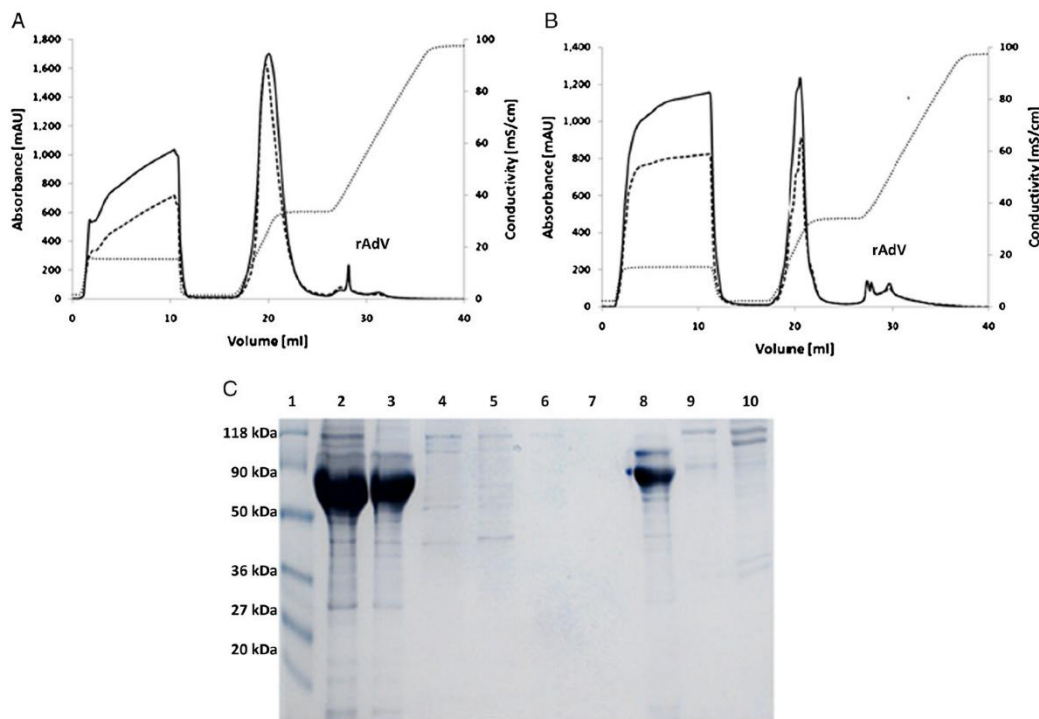


Figure 5. Analysis of rAdV5 cellular lysate by anion-exchange columns using 2-step gradient and higher sample volumes. (A) and (B) show elution profile of Q-Sepharose XL column and CIM QA-1 tube monolithic column, respectively. Flow rate 1 mL min^{-1} , sample volume 10 mL. The solid line is UV260 nm, segmented line is UV280 nm and dotted line is mobile phase conductivity. (C) shows SDS-PAGE. Lane 1: Ladder, Lane 2: cellular lysate supernatant, Lane 3: flow-through using CIM QA-1 tube monolithic column, Lane 4 to 7: elution volumes of 27, 28, 29 and 30 mL, respectively, of CIM QA-1 tube monolithic column chromatography. Lane 8: flow-through using Q-Sepharose XL. Lane 9 to 10: elution volumes of 28 and 29 mL, respectively, of Q-Sepharose XL chromatography.

achieved using CIM QA-1 monolithic column (3.3×10^{11} vp) when compared with Q-Sepharose XL (2.6×10^{11} vp). The lower dynamic binding capacity of Q-Sepharose XL has been mentioned as a possible reason for the lower recovery.²⁹ From Fig. 3(A) and 5(A), the elution profile for Q-Sepharose XL was similar for sample volumes of 1 mL and 10 mL. By increasing the sample volume, the recovery of Q-Sepharose XL increases by 35%. The same behavior was observed for the CIM QA-1 tube monolithic column (Fig. 3(B) and 5(B)). In this case, the recovery increased by 28% (Fig. 5(B)).

rAdV5 samples eluted were examined using SDS-PAGE. Analysis of these gels demonstrated a purity of 66% and 70% for purified adenovirus using Q-Sepharose XL and CIM QA-1 tube monolithic column, respectively (Fig. 5(C)). rAdV5 eluted in fractions 4, 5 and 6 for CIM QA-1 tube monolithic column, and in fraction 9 for Q-Sepharose XL. In lanes 4, 5, 6, and 9 from Fig. 5(C), characteristic protein bands corresponding with rAdV5 are observed, with the hexon protein of 108 kDa from rAdV5 highlighted from others. In addition, RT-PCR was used to compare relative quantity of rAdV5 in eluted fractions containing adenovirus. Process recovery was improved from 28% using the Q-Sepharose XL column to 34% with the CIM QA-1 tube monolithic column using a two-step gradient, quantified as vector genome (vg). As stated above, it was found by transmission electron microscopy that the use of different columns and flow rates resulted in a vector structurally intact after

purification (Fig. 1(B)). Similar images were obtained with other columns and flow rates (data not shown).

DISCUSSION

In this study, an anion-exchange method for the purification of adenoviral vector serotype 5 (AdV5) was developed for use in gene therapy against alcoholism. Although membrane adsorbers and monolith columns have been reported for the purification of adenoviral vectors, a purification strategy is crucial to optimize the yield and quality of adenoviral vectors for use in clinical protocols.^{17,19} To the best of our knowledge, no study has compared the performance of Q-Sepharose XL, and CIM QA-1 and DEAE tube monolithic columns to purify AdV5 under the same operational conditions. In order to select the most suitable chromatography techniques for purification of $\Delta E1$ -adenoviral vector (AdV) carrying the human Aldh2 antisense gene, experiments were carried out using different chromatography supports. Three anion-exchange columns were evaluated for rAdV5 purification: Q-Sepharose XL, CIM QA-1 tube monolithic and CIM DEAE-1 tube monolithic columns. These columns have different ligands and matrices and were evaluated under the same conditions of elution with a linear and two-step salt gradient. For comparison of the purification methods, the same batch of virus was used. As

described by Whitfield, it was observed with the three columns that application of a two-step gradient method enhanced separation of adenoviral particles and is a reproducible process. These factors are crucial to achieve high recovery yields of rAdV5 particles for preclinical and clinical applications.^{29–31}

In addition, our results show an improved separation of rAdV5 from cell lysate contaminants using both strong anion-exchange columns by two-step gradient chromatography compared with the weak anion-exchange column. One reason for a good column performance for chromatography of rAdV5 is the functional group. When comparing Q-Sepharose XL and CIM QA-1 tube monolithic columns, it is not clear how adenovirus size (90–100 nm) affects the dynamic capacity of the columns. It has been reported that Q-Sepharose XL offers advantages for separation of adenovirus in comparison with other packed-bed columns such as Source 15Q.²¹ However, low dynamic capacity has been associated to the pore size distribution.²⁹ On the other hand, channels of the monolithic column are large in size (1.3 µm) increasing the potential binding capacity of macromolecules such as adenoviruses. Dynamic binding capacity of Q-Sepharose XL and CIM QA-1 tube monolithic columns for Ad5 have been reported.^{32,33} In this study, all experiments were carried out within the reported ranges.

At different sample volumes, both Q-Sepharose XL and CIM QA-1 tube monolithic columns were able to separate rAdV5 from contaminants achieving high-grade purity. By increasing the sample volume, higher adenovirus yields were achieved using the CIM QA-1 monolithic column compared with Q-Sepharose XL. It is known that monolithic columns have a higher dynamic binding capacity of large molecules compared with traditional columns.^{23,34} Furthermore, at higher flow rates, the CIM QA-1 tube monolithic column achieved a better separation of the target fraction. These columns achieve faster separation, concentration and purification, covering the principal issues for the scale-up of viral vector production. The purification method provides separation of structurally intact rAdV5 particles from other cellular components under different columns and flow rates. Thus, the CIM QA-1 monolithic column is a better alternative than Q-Sepharose XL and CIM DEAE-1 tube monolithic columns for this type of unit operation.

However, it is important to highlight that any column choice must take into account several other variables including what the follow-on unit operation will be and how compatible it is with the upstream operation, as well as the degree to which a packed column versus monolithic column based unit operation might be scaled. The results obtained in the laboratory on the purification studies were used as a basis for a GLP process for the production of material at the National Research Council, Canada, to be used in pre-clinical trials. This process consisted of an anion exchange chromatography of Q-Sepharose HP (480 mL) with a capacity of 1.04×10^{12} vp mL⁻¹ followed by a size exclusion chromatography using a Sephacryl S-400 HR column. In this case, Q-Sepharose HP was used since the mean particle size allows for greater capacity based on particle surface adsorption.³² The production of the rAdV5 was conducted in a 60 L bioreactor with a final culture volume of 45 L. Titer of the harvested culture (broth) was 2.4×10^{10} viral particles mL⁻¹. Volume of the final purified rAdV5 was 166 mL with total viral particle concentration of 2.4×10^{12} VP mL⁻¹, and infectious viral particle concentration, 1.8×10^{11} IFU mL⁻¹. The recovery of the total viral particles in the process was 37%. The VP:IFU ratio was 13:1, this value of VP:IFU range is well-accepted for FDA as an indicator of product potency.³³

Pre-clinical trials are presently underway and have been almost completed at the test facility of SA-FORD, Sanctuary for Research

and Development in Mumbai, India. So far, they have been very successful.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the University of Chile, FONDEF project D0811051, CONICYT Doctoral Scholarship, the Millennium Scientific Initiative 'Institute for Cell Dynamics and Biotechnology' Millennium Institute, and also CONICYT for the Fondo Basal FB0001 CeBiB. Also, the authors would like to thank Dr Yedy Israel, Dr Casilda Mura, Patricia Lozada, and BIASeparation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

REFERENCES

- To SE, Alcohol dependence patterns and their impact on New York City. *Med Gen Med* **9**:23 (2007).
- Tu GC and Israel Y, Alcohol consumption by Orientals in North America is predicted largely by a single gene. *Behav Genet* **25**:59–66 (1995).
- Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, Mai XL, Jerome RE, Li TK *et al.*, Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am J Hum Genet* **48**:677–681 (1991).
- Neumark YD, Friedlander Y, Durst R, Leitersdorf E, Jaffe D, Ramchandani VA *et al.*, Alcohol dehydrogenase polymorphisms influence alcohol-elimination rates in a male Jewish population. *Alcohol Clin Exp Res* **28**:10–14 (2004).
- Ocaranza P, Quintanilla ME, Tampier L, Karahanian E, Sapag A and Israel Y, Gene therapy reduces ethanol intake in an animal model of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **32**:52–57 (2008).
- Fuller RK, Branchey L, Brightwell DR, Derman RM, Emrick CD, Iber FL *et al.*, Disulfiram treatment of alcoholism. A Veterans administration cooperative study. *JAMA* **256**:1449–1455 (1986).
- Chick J, Gough K, Falkowski W, Kershaw P, Hore B, Mehta B *et al.*, Disulfiram treatment of alcoholism. *Br J Psychiatry* **161**:84–89 (1992).
- Fuller RK and Gordis E, Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? *Addiction* **99**:21–24 (2004).
- Mark TL, Kranzler HR, Song X, Bransberger P, Poole VH and Crosse S, Physicians opinions about medications to treat alcoholism. *Addiction* **98**:617–626 (2003).
- Karahanian E, Ocaranza P and Israel Y, Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity in hepatoma cells is reduced by an adenoviral vector coding for an ALDH2 antisense mRNA. *Alcohol Exp Res* **29**:1384–1389 (2005).
- Quintanilla ME, Tampier L, Valle-Prieto A, Sapag A and Israel Y, Complex I regulates mutant mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity and voluntary ethanol consumption in rats. *FASEB J* **19**:36–42 (2005).
- Strachan T and Read A, Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches. Chapter 22 in *Human Molecular Genetics*. Wiley-Liss, New York (1999).
- Danthinne X and Imperiale MJ, Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* **7**:1707–1714 (2000).
- Graham F, Smiley R, Russell WC and Nairn R, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59–72 (1977).
- Volpers C and Kochanek S, Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6**:S164–S171 (2004).
- St George JA, Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* **10**:1135–1141 (2003).
- Burova E and Ioffe E, Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. *Gene Ther* **12**:S5–S17 (2005).
- Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, Tai A, Cataniag F, McDonnell J *et al.*, Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods* **140**:183–192 (2007).
- Merten OW, Schweizer M, Chahal P and Kamen A, Manufacturing of viral vectors: part II. Downstream processing and safety aspects. *Pharm Bioprocess* **2**:237–251 (2014).

- 20 Green AP, Huang JJ, Scott MO, Kierstead TD, A new scalable method for the purification of recombinant adenovirus vectors. *Human Gene Therapy* **13**:1921–1934 (2002).
- 21 Blanche F, Cameron B, Barbot A, Ferrero L, Guillemin T, Guyot S et al., An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. *Gene Ther* **7**:1055–1062 (2000).
- 22 Whitfield RJ, Battom SE, Barut M, Gilham DE and Ball PD, Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of adenovirus type 5 particles with a prototype anion-exchange analytical monolith column. *J Chromatogr A* **1216**:2725–2729 (2009).
- 23 Jungbauer A and Hahn R, Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *J Sep Sci* **27**:767–778 (2004).
- 24 Strancar A, Podgornik A, Barut M and Necina R, Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **76**:49–85 (2002).
- 25 Martinez V, Gerdtzen ZP, Andrews BA and Asenjo JA, Viral vectors for the treatment of alcoholism: use of metabolic flux analysis for cell cultivation and vector production. *Metab Eng* **12**:129–137 (2010).
- 26 McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, Janes H et al., HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step study: a case-cohort analysis. *Lancet* **372**:1894–1905 (2008).
- 27 Maizel J, White D and Scharff M, The polypeptides of adenovirus. *Virology* **36**:115–125 (1968).
- 28 Bollag DM, Rozycki MD and Edelstein SJ, Preparation for protein isolation. *Protein Methods* pp. 20–35 (1996).
- 29 Bo H, Chen J, Liang T, Li S, Shao H and Huang S, Chromatographic purification of adenoviral vectors on anion-exchange resins. *Eur J Pharm Sci* **67**:119–125 (2015).
- 30 Wolf W and Reichi U, Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Rev Vaccines* **10**:1451–1475 (2011).
- 31 Kamen A and Henry O, Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med* **6**:184–192 (2004).
- 32 Trilisky E and Lenhoff AM, Sorption processes in ion-exchange chromatography of viruses. *J Chromatogr A* **1142**:2–12 (2007).
- 33 Kramberger P, Urbas L and Štrancar A, Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene therapy vectors, and bacteriophages. *Hum Vaccin Immunother* **11**:1010–1021 (2015).
- 34 Peixoto C, Ferreira TB, Carrondo MJT, Cruz PE and Alves PM, Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J Virol Methods* **132**:121–126 (2006).

