

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***LA ADMINISTRACIÓN DE ALDA-1 REDUCE LA RECAÍDA EN EL
CONSUMO DE ETANOL O NICOTINA EN RATAS UCHB:
EVALUACIÓN DE MARCADORES DE NEUROINFLAMACIÓN Y
ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

SOFÍA CONSTANZA ADASME REYES

Directores de Tesis: Dr. Mario Rivera Meza
Dra. Paola Morales Retamales

Santiago-CHILE

Noviembre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

SOFÍA CONSTANZA ADASME REYES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica.

Directores de Tesis:

Dr. Mario Rivera Meza

Dra. Paola Morales Retamales

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Dra. Jenny Fiedler

Dr. Pablo Moya

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Farmacología Experimental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, y en el Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad de Chile, y fue financiada por el proyecto FONDECYT regular 1201577 (Dr. Mario Rivera) y por el proyecto FONDECYT regular 1190562 (Dra. Paola Morales).

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron publicados en:

María Elena Quilaqueo, **Sofía Adasme**, Fresia Solís-Egaña, María Elena Quintanilla, David Vásquez, Paola Morales, Mario Herrera-Marschitz, Mario Rivera-Meza (2023).

The administration of Alda-1, an activator of ALDH2, inhibits relapse-like ethanol intake in female alcohol-preferring UChB rats.

Life Sciences 328:121876.

PRESENTACIÓN A CONGRESOS

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en:

Adasme, Sofía; Quilaqueo, María Elena; Herrera-Marschitz, Mario; Morales, Paola & Rivera-Meza, Mario.

Alda-1 administration reduces relapse in alcohol consumption, but alters thickness of primary astrocytic processes, and nicotine consumption after a forced abstinence period in UChB rats.

IX Neurotoxicity Society Meeting, 11-13 de Marzo 2022. Punta Arenas, Chile.

Adasme-Reyes, Sofía; Quilaqueo, María Elena; Vásquez-Velásquez, David; Quintanilla, María Elena; Herrera-Marschitz, Mario; Morales, Paola & Rivera-Meza, Mario.

Effect of Alda-1 administration on relapse like alcohol or nicotine consumption, neuroinflammation, and hippocampal oxidative stress markers in rats.

II World Congress on Alcohol and Alcoholism, 17-20 de Septiembre 2022. Cracovia, Polonia.

Adasme-Reyes, Sofía; Quilaqueo, María Elena; Vásquez-Velásquez, David; Quintanilla, María Elena; Herrera-Marschitz, Mario; Morales, Paola & Rivera-Meza, Mario.

Alda-1 administration reduces relapse-like ethanol and nicotine consumption in rats: assessment of neuroinflammation and oxidative stress.

II LASBRA Virtual Meeting, 21-23 de Octubre 2022.

- Presentación en *Student Symposium*, 22 de octubre 2022.
- Primer Lugar *Harold Kalant Award 2022 for the Best work on biomedical research on alcoholism by a Latin-American student.*

Adasme-Reyes, Sofía; Quilaqueo, María Elena; Solís-Egaña, Fresia; Vásquez-Velásquez, David; Quintanilla, María Elena; Herrera-Marschitz, Mario; Morales, Paola & Rivera-Meza, Mario.

Reduction of relapse-like alcohol or nicotine consumption by oral administration of Alda-1 to rats: assessment of neuroinflammation and oxidative stress markers.

XLII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, 5-9 de Diciembre 2022. Punta Arenas, Chile.

Adasme-Reyes, Sofía; Quilaqueo, María Elena; Quiñones-Medina, Eduardo; Vásquez-Velásquez, David; Quintanilla, María Elena; Herrera-Marschitz, Mario; Morales, Paola & Rivera-Meza, Mario.

La administración de Alda-1, activador de la ALDH2, reduce el consumo tipo recaída de etanol o nicotina en ratas UChB: evaluación de marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo cerebral.

II Jornada de Investigación en Consumo de Sustancias Psicoactivas, 22 y 23 de Junio 2023. Montevideo, Uruguay; I Jornada de Investigación, Postgrado y Educación Continua, 19 y 20 de Octubre 2023. Independencia, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Terminé, al fin. Fue un proceso largo (más de lo que había esperado y me habría gustado) y exigente, intelectual, física y emocionalmente.

Las palabras son insuficientes para agradecer a mis padres y a mi hermana; todo habría sido terriblemente difícil sin su apoyo. Agradezco también a todos mis familiares por su preocupación y palabras de ánimo.

Agradezco al Dr. Mario Rivera y a la Dra. Paola Morales por recibirme en sus laboratorios, por allá en el 2019. A ambos, mi más grande e infinito agradecimiento por la confianza, el apoyo, los desafíos y todos los consejos que me dieron en estos años de trabajo.

A mis compañeritos del LFE desde el comienzo: Mane, Fresia e Ignacio, gracias por no dejarme morir en este proceso; les debo el querer ir, estar y seguir en el lab todo este tiempo. Y a los nuevos fichajes y los que vengan: Caro, Juan y Vicente, tienen un lab hermoso en sus manos, aprovéchenlo. Mención honrosa a Eduardo Quiñones por su aporte al trabajo. A Laboratorio de Neurocircuitos en Medicina: Nancy, Dieguito, Marti, Sra. Carmen, muchas gracias por todo. Marta: tú, Cristian, Luke y Leia tiene mi corazón completo. A los niños Farmolab, fue un agrado haber compartido todo este tiempo con ustedes. A mis amigos y colegas, Mati, Martín y Lucas: gracias por el cariño, apañe y apoyo de estos ya 8 años de formación profesional y personal.

Muchas gracias a todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron al desarrollo y finalización de esta etapa.

“Y este fue el final...

Y ahora no estoy tan segura de creer en los comienzos y finales”

Eric Heisserer, La Llegada, 2016

ÍNDICE GENERAL	
FINANCIAMIENTO.....	I
PUBLICACIONES.....	II
PRESENTACIÓN A CONGRESOS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY.....	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Consumo de alcohol o nicotina: problemas de salud pública.....	1
1.2. Bases neurológicas de la adquisición del consumo de alcohol o nicotina.....	2
1.3. Mecanismos de autoperpetuación del consumo crónico de alcohol o nicotina.....	6
1.4. Daño neurológico asociado a consumo crónico de alcohol o nicotina.....	9
1.5. Terapias farmacológicas para el consumo crónico de alcohol o nicotina.....	10
1.6. Alda-1 como potencial agente terapéutico para el consumo crónico de alcohol o nicotina.....	11
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVO GENERAL.....	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14

5. MATERIALES.....	15
5.1. Animales.....	15
5.2. Reactivos.....	15
5.2.1. Reactivos generales.....	15
5.2.2. Reactivos para inmunofluorescencia.....	16
5.3. Anticuerpos, sondas fluorescentes y enzimas.....	16
5.3.1. Anticuerpos primarios.....	16
5.3.2. Anticuerpos secundarios.....	16
5.3.3. Sondas fluorescentes.....	17
5.3.4. Enzimas.....	17
5.4. Kits comerciales.....	17
5.5. Otros insumos.....	17
6. MÉTODOS.....	18
6.1. Modelo experimental.....	18
6.1.1. Modelo de recaída en el consumo de etanol en ratas UChB.....	18
6.1.2. Modelo de consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB.....	19
6.2. Extracción de tejido y muestras de sangre de ratas UChB.....	20
6.3. Cortes histológicos.....	20
6.4. Doble inmunofluorescencia contra GFAP e Iba-1.....	21
6.5. Determinación de marcadores de neuroinflamación.....	22
6.6. Purificación de proteínas y determinación de los niveles proteicos de NeuN en	

hipocampo mediante Western Blot.....	22
6.7. Determinación de la razón GSSG/GSH hipocampal.....	24
6.8. Determinación de la concentración de MDA en tejido cerebral completo.....	25
6.9. Análisis estadísticos.....	25
7. RESULTADOS.....	27
7.1. Efecto de la administración de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol en ratas UChB.....	27
7.2. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB.....	33
7.3. Determinación de marcadores de neuroinflamación en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol.....	38
7.4. Determinación de la neuroinflamación en NAc de ratas UChB expuestas a condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol.....	42
7.5. Determinación de marcadores de neuroinflamación en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	45
7.6. Determinación del daño neuronal en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol o nicotina.....	48
7.7. Determinación del estrés oxidativo cerebral de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol.....	53
7.8. Determinación del estrés oxidativo cerebral de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	54
8. DISCUSIÓN.....	57

9. CONCLUSIONES.....71

10. REFERENCIAS.....72

11. ANEXOS.....91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema mesocorticolímbico.....	3
Figura 2.	Metabolismo del etanol.....	4
Figura 3.	Síntesis de R-salsolinol.....	5
Figura 4.	Mecanismo de auto-perpetuación del estrés oxidativo y neuroinflamación por consumo crónico de etanol o nicotina.....	8
Figura 5.	Estructura química de Alda-1	11
Figura 6.	Mecanismo de acción propuesto para Alda-1	13
Figura 7.	Modelo de recaída en el consumo de etanol en ratas.....	18
Figura 8.	Modelo de consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB.....	20
Figura 9.	Consumo crónico de etanol y preferencia de consumo según concentración de la solución de etanol en ratas UChB.....	27
Figura 10.	Consumo de agua durante el período de consumo crónico de etanol en ratas UChB.....	28
Figura 11.	Ingesta total de líquidos durante el período de consumo crónico de etanol en ratas UChB.....	29
Figura 12.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol en ratas UChB.....	30
Figura 13.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en la preferencia del consumo de etanol durante el período de recaída.....	31
Figura 14.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y de fluido total en ratas UChB re-expuestas al consumo de etanol...	32

Figura 15.	Establecimiento del consumo de nicotina en ratas UChB.....	33
Figura 16.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo crónico de nicotina en ratas UChB.....	34
Figura 17.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y líquido total de ratas UChB expuestas al consumo crónico de nicotina.....	35
Figura 18.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en la recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB.....	36
Figura 19.	Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y de fluido total en ratas UChB re-expuestas al consumo de nicotina.....	38
Figura 20.	Microfotografías representativas de astrocitos y microglías hipocampales de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol.....	39
Figura 21.	Longitud de procesos astrocíticos hipocampales en ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	40
Figura 22.	Grosor de procesos astrocíticos primarios hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	41
Figura 23.	Densidad de astrocitos y microglías hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	41
Figura 24.	Microfotografías representativas de astrocitos y microglías del NAc de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol.....	42

Figura 25.	Longitud de procesos astrocíticos del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	43
Figura 26.	Grosor de procesos astrocíticos primarios del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	44
Figura 27.	Densidad de astrocitos y microglías del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	45
Figura 28.	Microfotografías representativas de astrocitos y microglías hipocampales de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	46
Figura 29.	Longitud de procesos astrocíticos hipocampales en ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	46
Figura 30.	Grosor de procesos astrocíticos primarios hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	47
Figura 31.	Densidad de astrocitos y microglías en el hipocampo de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	48
Figura 32.	Inmunofluorescencia para la detección de NeuN en el giro dentado del HPC en cortes cerebrales de ratas UChB.....	50
Figura 33.	Efecto de la administración de Alda-1 en los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de HPC de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	51

Figura 34.	Efecto de la administración de Alda-1 en los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de HPC de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	52
Figura 35.	Razón GSSG/GSH en tejido hipocampal de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	53
Figura 36.	Niveles de MDA cerebrales de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol.....	54
Figura 37.	Razón GSSG/GSH en tejido hipocampal de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	55
Figura 38.	Niveles de MDA cerebrales de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina.....	56
Figura 39.	Síntesis de THP.....	64
Figura 40.	Mecanismo de acción propuesto para la disminución del consumo de nicotina por Alda-1.....	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Determinación de los niveles de NeuN en muestras de proteínas purificadas desde tejido cerebral de rata.....	58
Anexo 2.	Optimización de la extracción y detección de cotinina mediante HPLC-DAD en muestras de plasma de rata UChB.....	60

ABREVIATURAS

4-HNE:	4-hidroxinonenal
ADH:	alcohol deshidrogenasa
ALDH2:	aldehído deshidrogenasa 2
AMY:	amígdala
AP1:	proteína activadora 1
CD68:	<i>cluster</i> de diferenciación 68
COX-2:	ciclooxigenasa 2
CYP2E1:	citocromo p450 isoenzima 2E1
DOPAC:	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DOPAL:	3,4-dihidroxifenilacetaldehído
EAATs:	transportadores de aminoácidos excitatorios
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial
GLT-1:	transportador de glutamato 1
GSH:	glutati6n reducido
GSSG:	glutati6n disulfuro
HPC:	hipocampo
Iba-1:	molécula adaptadora de uni6n al calcio ionizado 1
IL-1β:	interleuquina 1 beta
iNOS:	6xido n6trico sintasa inducible
MAO:	monoamino oxidasa
MDA:	malondialdehído
MHC II:	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
NAc:	núcleo accumbens

nAChRs:	receptores nicotínicos de acetilcolina
NeuN:	proteína neuronal nuclear
NF1A:	Factor nuclear 1 tipo A
NF-κB:	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PFA:	paraformaldehído
PFC:	corteza prefrontal
ROS:	especies reactivas de oxígeno
SNC:	sistema nervioso central
STAT3:	transductor de señal y activador de la transcripción 3 (en inglés)
THP:	tetrahidropapaverolina
TNF-α:	factor de necrosis tumoral alfa
THIQ:	tetrahidroisoquinolina
UChB:	Universidad de Chile Bebedoras
VP:	pálido ventral
VTA:	área tegmental ventral
xCT:	antiportadores de cistina/glutamato

RESUMEN

La administración de Alda-1, activador farmacológico de la enzima ALDH2, ha demostrado disminuir el consumo crónico de etanol o nicotina en ratas UChB consumidoras de etanol. Esta Tesis tuvo como objetivo determinar el efecto de la administración de Alda-1 sobre la recaída en el consumo de etanol, el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina, y sobre marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo en ratas UChB.

Dos grupos de ratas UChB consumidoras de etanol fueron expuestas crónicamente al consumo de etanol o nicotina por 90 días, privadas por 14 días y re-expuestas a ambas sustancias por 7 días. Al grupo expuesto a nicotina se le administró vehículo o Alda-1 durante el período de consumo crónico por 7 días, a ambos grupos se le administró vehículo o Alda-1 los últimos 14 días de la planificación. Se evaluaron marcadores de neuroinflamación (GFAP e Iba-1), abundancia relativa de NeuN como marcador neuronal y marcadores de estrés oxidativo (GSSG/GSH hipocampal y MDA).

Alda-1 redujo en 92,2% la recaída en el consumo de etanol, en 35,7% el consumo crónico y en 81,8% la recaída en el consumo de nicotina en comparación al grupo vehículo en ratas UChB. Esta disminución estuvo asociada a cambios discretos y específicos en la neuroinflamación observada en el HPC y NAc. En cuanto a la abundancia relativa de neuronas en HPC no se observaron cambios. Tampoco se observaron cambios en los niveles de estrés oxidativo con excepción de la razón GSSG/GSH, encontrándose una disminución en los grupos que consumieron nicotina en comparación al grupo control.

En conclusión, Alda-1 disminuyó significativamente la recaída en el consumo de etanol, consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina, efecto que no estuvo relacionado a cambios en los marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo evaluados en esta Tesis.

SUMMARY

Alda-1 administration, a pharmacological activator of ALDH2 enzyme, has been shown to reduce relapse-like ethanol consumption, and chronic and relapse-like nicotine consumption in ethanol-preferring UChB rats. This study aimed to determine the effect of Alda-1 administration on relapse-like ethanol consumption, chronic and relapse-like nicotine consumption, and neuroinflammation and oxidative stress markers in UChB rats.

Two groups of ethanol-preferring UChB rats were chronically exposed to ethanol or nicotine for 90 days, deprived for 14 days, and re-exposed to both drugs for 7 days. The nicotine group was administered vehicle or Alda-1 during the period of chronic consumption for 7 days, and both groups were administered vehicle and Alda-1 administration during the last 14 days of the schedule. Neuroinflammation markers (GFAP and Iba-1), the relative abundance of NeuN as a neuronal marker, and oxidative stress markers (hippocampal GSSG/GSH ratio and MDA) were assessed.

Alda-1 administration reduced relapse-like ethanol consumption by 92.2%, chronic and relapse-like nicotine consumption by 35.7% and 81.8%, respectively. This decrease was associated with discrete and specific changes in neuroinflammation observed in HPC and NAc. Regarding neuronal relative abundance in HPC, there were no significant differences. No changes were observed in oxidative stress either, except for the GSSG/GSH ratio because there was observed a decrease in this parameter in the groups that consumed nicotine.

Alda-1 administration significantly decreased relapse-like ethanol consumption, and chronic and relapse-like nicotine consumption, the effect that was not related to changes in neuroinflammation and oxidative stress markers assessed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Consumo de alcohol o nicotina: problemas de salud pública

El consumo problemático de alcohol ha sido declarado un problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a sus implicancias sanitarias y socioeconómicas a nivel mundial. El uso nocivo de alcohol resulta en aproximadamente 3 millones de muertes al año, es decir, un 5,3% del total de fallecimientos. Además, provoca discapacidad y defunción a una edad relativamente temprana: 13,5% del total de muertes de personas entre 20 a 39 años son atribuibles al alcohol (OMS, 2018).

El consumo crónico de alcohol se ha asociado al desarrollo de más de 200 enfermedades, siendo el principal factor de riesgo de mortalidad en población entre 15 y 49 años y uno de los principales factores de discapacidad en la región de las Américas (OPS, 2015; OMS, 2018). Además, está involucrado en un gran porcentaje del ausentismo laboral, accidentes laborales y falta de productividad en esta misma región (OPS, 2015). Por otra parte, el consumo de alcohol acentúa las diferencias socioeconómicas al afectar con mayor fuerza a sectores de menores ingresos que en sectores con más recursos económicos (OMS, 2018).

La región de las Américas es la segunda región de la OMS con mayor consumo de alcohol per cápita anual con 8,0 L de alcohol puro, y solo superada por Europa con 9,8 L. A nivel local, Chile es uno de los países con la mayor tasa de consumo de alcohol en América Latina con 8,3 L de alcohol puro anual per cápita, valor superior al promedio de la región (OMS, 2018). Además, presenta uno de los patrones de consumo de alcohol más riesgosos a nivel mundial, especialmente en población adolescente, concentrando su consumo en sólo 3,1 días/mes (OPS, 2015; SENDA, 2018). Por otra parte, según el Décimo Tercer Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile del año 2018, 56,3% de los encuestados indicaron haber tenido al menos 1 episodio de embriaguez en el último mes (SEDA, 2018), por lo que el consumo abusivo de alcohol constituye un problema

de salud pública grave en Chile que debe priorizarse en virtud de los costos sanitarios, sociales y económicos que tiene para el país (PUC-SENDA, 2018).

Por otra parte, el consumo de tabaco es una de las principales causas de muerte prematura prevenibles en el mundo, pues es responsable de más de 7 millones de muertes anuales por consumo directo y 1,2 millones de muertes de consumidores indirectos (OMS, 2021). Además, es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias e hipertensión (OMS, 2019). En 2020, el 22,3% de la población mundial consumía tabaco, representando 36,7% de hombres y 7,8% de mujeres del mundo. Más del 80% de los 1.300 millones de consumidores de tabaco que hay en el mundo viven en países de ingresos medianos o bajos (OMS, 2022).

Fumar tabaco, una de las formas más comunes de consumir esta sustancia, se encuentra estrechamente relacionada al consumo de alcohol: entre un 80 y un 90% de los consumidores de alcohol fuman. De la misma forma, es probable que personas que dependen del alcohol también dependan de la nicotina, principio activo y adictivo del tabaco (DiFranza y Guerrero, 1990; Drobos, 2002). Las personas fumadoras tienen 2,7 veces más probabilidades de consumir alcohol que una persona no fumadora, relacionándose proporcionalmente la cantidad de alcohol consumido con la cantidad de cigarrillos fumados (Zacny, 1990; Breslau, 1995).

1.2. Bases neurológicas de la adquisición del consumo de alcohol o nicotina

El sistema mesocorticolímbico es el circuito neuronal responsable de la modulación de la conducta asociada a la gratificación emocional y motivación frente a estímulos como la comida, la interacción social y la actividad sexual. Este neurocircuito tiene su origen en neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (VTA) que se proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc), amígdala (AMY), hipocampo (HPC) y corteza prefrontal (PFC). Estas últimas tres

regiones, a su vez, envían proyecciones glutamatérgicas al NAc, modulando su actividad. Por su parte, el NAc proyecta sus axones GABAérgicos de vuelta al VTA y al pálido ventral (VP) y este último, al mismo tiempo, envía axones GABAérgicos a regiones motoras y límbicas y de regreso al VTA, según se observa en la **Figura 1** (Kalivas, 2009; Sesack y Grace, 2010; Tobiansky y cols., 2018; Wouterlood y cols., 2018). Se ha demostrado que drogas como el etanol y la nicotina activan este sistema induciendo la liberación de dopamina en el NAc (DiChiara e Imperato, 1989), pero el mecanismo por el cual lo activan es distinto para cada una de estas drogas (ver abajo).

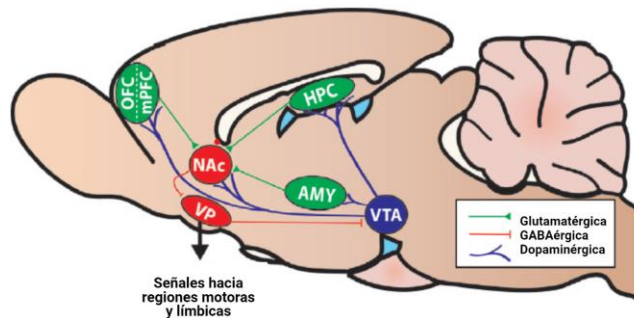


Figura 1. Sistema mesocorticolímbico. Diagrama simplificado de neurocircuitos y estructuras asociadas del sistema mesocorticolímbico en ratas (vista sagital). OFC: corteza orbitofrontal; mPFC: corteza prefrontal medial; NAc: núcleo accumbens; VP: pálido ventral; HPC: hipocampo; AMY: amígdala; VTA: área tegmental ventral. Adaptado de Tobiansky y cols., 2018.

El metabolismo del etanol se compone de 2 pasos: una primera oxidación del etanol a acetaldehído mediada por el sistema microsomal de oxidación del etanol (citocromo P450 isoenzima 2E1, CYP2E1) y las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y catalasa. El CYP2E1 requiere de NADPH y la ADH requiere NAD⁺ como cofactor para la oxidación. Una segunda oxidación del acetaldehído resultante a acetato es llevada a cabo por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y NAD⁺ como cofactor (ver **Figura 2**). El etanol es metabolizado principalmente en el hígado por la enzima ADH y el CYP2E1, mientras que, en el cerebro, la catalasa es la principal responsable de esta conversión (>60%) seguida del CYP2E1 (20%), siendo la contribución de la ADH casi nula (Zimatkin y cols., 2006).

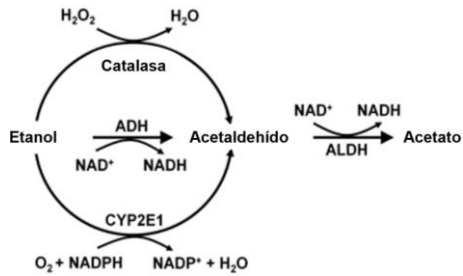


Figura 2. Metabolismo del etanol. El etanol es oxidado a acetaldehído por las enzimas catalasa, alcohol deshidrogenasa y el citocromo P450 isoenzima 2E1 (CYP2E1), las dos últimas requiriendo un cofactor para su funcionamiento (NAD⁺ y NADPH, respectivamente). Luego, el acetaldehído obtenido es oxidado a acetato por acción de la ALDH y NAD⁺ como cofactor. Tomado de Israel y cols., 2017b.

El mecanismo de acción del etanol es incierto: estudios en animales han demostrado que el etanol y el acetaldehído son potentes reforzadores del consumo de alcohol (McBride y cols., 2002). Estudios demuestran que el acetaldehído induce la liberación de dopamina desde el VTA hacia el NAc (Deehan y cols., 2013a), sugiriendo que este metabolito contribuye en la generación de los efectos adictivos del consumo de alcohol. Sin embargo, se ha visto que el acetaldehído es relevante en la adquisición del consumo de alcohol mas no en la mantención de éste (Karahanian y cols., 2015; Israel y cols., 2017b), por lo que la mantención del consumo crónico de alcohol estaría regulada por otros mecanismos neuroquímicos. Por otra parte, se ha reportado que el R-salsolinol, un compuesto (1) producido por la enzima salsolinol sintasa y (2) derivado de la condensación no enzimática del acetaldehído con la dopamina (ver **Figura 3**) (Villageliú y cols., 2018), también ejerce efectos gratificantes similares a los del etanol induciendo el consumo de éste (Deehan y cols., 2012b; Quintanilla y cols., 2014).

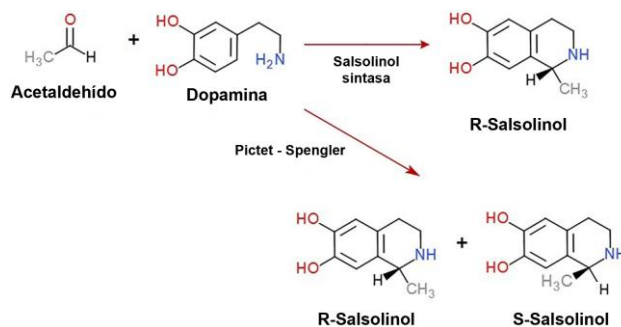


Figura 3. Síntesis de R-salsolinol. Se han descrito 2 vías de síntesis de R-salsolinol a partir de acetaldehído y dopamina: una que involucra la participación de la enzima salsolinol sintasa, y otra que comprende la condensación no enzimática de Pictet-Spengler.

La nicotina es el compuesto activo de las hojas del tabaco y la responsable de los efectos adictivos asociado al consumo de éste. Ésta difunde rápidamente al cerebro activando receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (De Biasi y Dani, 2011). Los nAChRs involucrados en la adicción a la nicotina se encuentran en el mesencéfalo (VTA), donde neuronas dopaminérgicas expresan nAChRs cuyas subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ presentan una gran afinidad por la nicotina (Dani, 2015; Mansvelder y McGehee, 2002).

Estudios en animales muestran que neuronas dopaminérgicas del VTA liberan dopamina por la unión de nicotina a su receptor, pudiendo asociarse los efectos gratificantes del consumo de tabaco con la estimulación de neuronas dopaminérgicas (Imperato y cols., 1986; Corrigall y cols., 1992). Asimismo, lesiones químicas en el NAc, así como la administración de antagonistas selectivos del receptor de dopamina, disminuyen la autoadministración de nicotina en ratas demostrando que la liberación de dopamina en el NAc media sus efectos placenteros (Corrigall y cols., 1992; Corrigall y Coen, 1991). A pesar de lo anterior, la administración de vareniclina, un agonista parcial selectivo de nAChRs subtipo $\alpha 4\beta 2$, a pacientes fumadores no logra reducir el consumo de nicotina en su totalidad (Hughes y cols., 2011; Steinberg y cols., 2018), sugiriendo que en el consumo crónico de nicotina estarían involucrados otros mecanismos.

1.3. Mecanismos de autoperpetuación del consumo crónico de alcohol o nicotina

Varios estudios han demostrado que el uso crónico de alcohol y tabaco conducen a un estado de estrés oxidativo cerebral y neuroinflamación (Barr y cols., 2007; Xu y cols., 2019; Erickson y cols., 2019; Kohno y cols., 2019). El cerebro es un órgano especialmente susceptible al daño mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a su alto consumo de oxígeno y a la gran cantidad de ácidos grasos insaturados presentes en su estructura, objetivo de la peroxidación lipídica (Dringen y cols., 2000). La peroxidación de este tipo de lípidos produce aldehídos citotóxicos como el 4-hidroxinonenal y el malondialdehído (4-HNE y MDA, respectivamente) asociados a la progresión de diferentes estados patológicos (Ayala y cols., 2014; Amirshahrokhi y Niapour, 2022). Se han descrito varias fuentes de ROS en el cerebro; una es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la oxidación de la dopamina derivada del consumo de etanol o nicotina, reacción catalizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO) (Cuhna y cols., 2013). Otra fuente de ROS cerebral se relaciona con la oxidación del etanol por el CYP2E1, el que es inducido por el consumo de alcohol (Das y Vasudevan, 2007).

Las alteraciones en el balance redox por aumento de ROS pueden inducir reacciones de oxidación y de intercambio de disulfuros en residuos de cisteína específicos en proteínas susceptibles (Townsend y cols., 2003). Entre las proteínas afectadas por este estado oxidante se encuentra el transportador GLT-1, principal regulador glial de la homeostasis del glutamato, lo que lleva a una disminución de la actividad de recaptación de glutamato (Trotti y cols., 1998). Estudios en animales reportan un aumento del glutamato extracelular en el NAc luego de una exposición prolongada al etanol o nicotina, causado aparentemente por una alteración en la recaptación de dicho neurotransmisor (Rossetti y Carboni, 1995; Melendez y cols., 2005; Griffin y cols., 2014; Reid y cols., 2000). Este

desbalance en la neurotransmisión glutamatérgica podría estar disminuyendo la capacidad de regular el comportamiento de búsqueda de drogas y aumentar la probabilidad de recaída de pacientes adictos (Kalivas, 2009). La acumulación de glutamato sobre estimula los receptores extra sinápticos glutamatérgicos de las neuronas generando excitotoxicidad y ROS (Reynolds y Hastings, 1995). Por otra parte, el aumento del estrés oxidativo cerebral induce la activación de factores transcripcionales como NF- κ B y AP1, que aumentan la transcripción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β , y de enzimas prooxidantes como COX-2 e iNOS (Fischer y Maier, 2015). A su vez, TNF- α y IL-1 β inducen la disminución de la expresión del transportador GLT-1, contribuyendo a la autoperpetuación del exceso de glutamato extracelular, estrés oxidativo y neuroinflamación (Prow e Irani, 2008) (ver **Figura 4**).

El principal agente antioxidante sintetizado por la célula es el glutatión (GSH), tripéptido compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Gracias al grupo tiol de la cisteína, el GSH proporciona poder reductor a la célula reaccionando directamente con las ROS, depurando y manteniendo la homeostasis redox en la célula (Meister, 1992; Dringen y cols., 2000; Forman y cols., 2009). Para llevar a cabo esta función antioxidante, dos moléculas de GSH se oxidan produciendo una molécula de disulfuro de glutatión o glutatión oxidado (GSSG) por acción de la enzima glutatión peroxidasa, utilizando NADPH como cofactor (Townsend y cols., 2003), motivo por el cual la razón GSSG/GSH es utilizada como marcador del nivel de estrés oxidativo (Forman y cols., 2009). En relación con esto, se ha reportado un aumento de la razón GSSG/GSH en el hipocampo de ratas consumidoras crónicas de etanol o nicotina, niveles que se normalizan con la administración de N-acetilcisteína, molécula precursora del glutatión (Quintanilla y cols., 2018).

Estudios en ratas han demostrado que el consumo crónico de etanol induce inflamación del SNC evidenciada por un aumento de la reactividad glial en el

hipocampo, es decir, un aumento de la longitud y grosor de los procesos astrocíticos de células inmunorreactivas para el marcador de astrocito GFAP, (Jacque y cols., 1978; Ezquer y cols., 2018; Quintanilla y cols., 2018, 2019), y de la densidad de microglías inmunorreactivas para el marcador de microglía Iba-1 (Ito y cols., 1998; Quintanilla y cols., 2019). Además, se han observado niveles elevados de marcadores de inflamación como iNOS, COX-2 y IL-1 β (Blanco y Guerri, 2007). De igual forma, la exposición crónica a nicotina conduce a un marcado estado de estrés oxidativo en el hipocampo y neuroinflamación (Quintanilla y cols., 2018, 2019) (ver **Figura 4**). Por otro lado, estudios clínicos y preclínicos muestran que la neuroinflamación inducida por el consumo crónico de etanol o nicotina puede permanecer por largos períodos luego de discontinuar el uso de estas sustancias (Umhau y cols., 2014; Alrouji y cols., 2018), sugiriendo a la neuroinflamación como un factor importante en la vulnerabilidad a la recaída en el consumo de alcohol o nicotina (Crews y Vetreno, 2016; Saravia y cols., 2018).

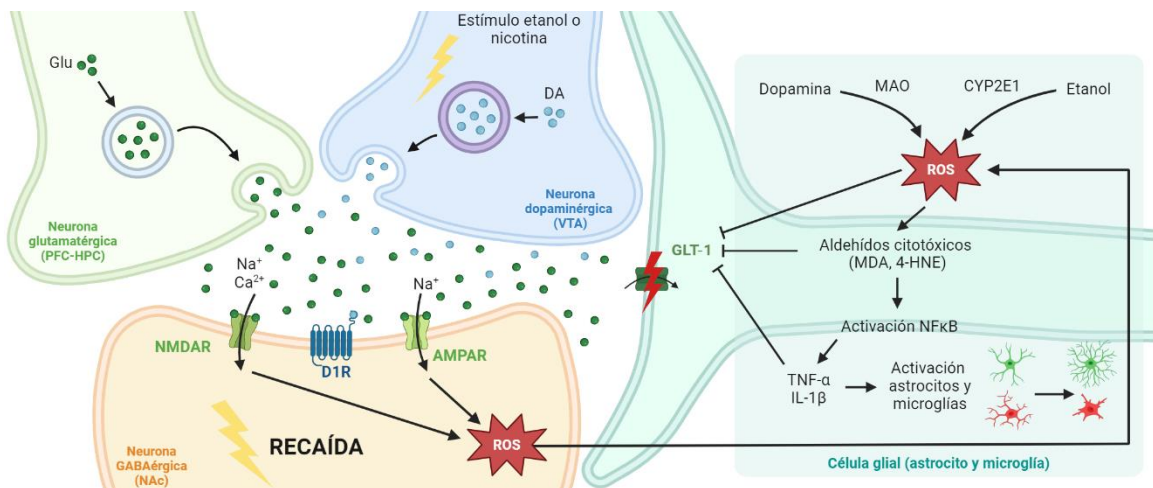


Figura 4. Mecanismo de autoperpetuación del estrés oxidativo y neuroinflamación por consumo crónico de etanol o nicotina. El metabolismo del etanol y dopamina (derivada del consumo de etanol o nicotina) genera ROS (Das y Vasudevan, 2007; Cuhna y cols., 2013) que aumenta la producción de aldehídos dañinos como MDA o 4-HNE (Dringen y cols., 2000; Ayala y cols., 2014; Amirshahrokhi y Niapour, 2022) y la expresión de agentes proinflamatorios como TNF- α e IL-1 β (Fischer y Maier, 2015). Éstos últimos inducen la activación de astrocitos y microglías,

promoviendo un estado de neuroinflamación (Blanco y Guerri, 2007). Por otro lado, las ROS, los aldehídos citotóxicos y las citoquinas proinflamatorias repercuten en GLT-1, disminuyendo su actividad y generando la acumulación de glutamato en la sinapsis (Trotti y cols., 1998; Townsend y cols., 2003). Esta acumulación de glutamato genera excitotoxicidad en la neurona postsináptica, contribuyendo a la producción de ROS y constituyendo un ciclo de estrés oxidativo y neuroinflamación que se promueve y sustenta a sí mismo (Prow e Irani, 2008). Glu: glutamato; DA: dopamina. Creado con Biorender.com

1.4. Daño neurológico asociado a consumo crónico de alcohol o nicotina

El estado proinflamatorio y prooxidante derivado del consumo crónico de etanol repercute en neuronas, lo que puede conducir, incluso, a la muerte neuronal (Mukherjee y cols., 2023). A largo plazo, el consumo crónico de alcohol trae consigo el riesgo de desarrollar daño neurológico que puede reflejarse en problemas de aprendizaje, memoria y salud mental (Vetreno y cols., 2011). Estudios anatómicos *post mórtem* en humanos reportan pérdida neuronal en la PFC de sujetos alcohólicos en comparación a personas abstemias (Harper y Kril, 1989; McCorkindale y cols., 2016), retracción del árbol dendrítico y pérdida de sinapsis, efectos que podrían subyacer como mecanismo patogénico de los déficits cognitivos en personas alcohólicas (Harper y Kril, 1989; Skuja y cols., 2012; De la Monte y Kril, 2014). De la misma forma, se ha demostrado una disminución del número, densidad y volumen de las células granulares del giro dentado del HPC en personas alcohólicas (Dhanabalan y cols., 2018), observación en línea con la hipótesis que relaciona el consumo tipo “atracción” de alcohol (*binge drinking*) con una disfunción hipocampal asociada al deterioro de la neurogénesis y de la memoria (Vetreno y cols., 2011; West y cols., 2021). Así, la PFC y el HPC, regiones íntimamente involucradas en el aprendizaje, memoria y búsqueda, estarían siendo afectadas por el consumo crónico de alcohol.

El efecto del consumo de nicotina sobre el deterioro cognitivo es limitada y controversial: mediante un metaanálisis de 41 estudios doble ciego publicados entre los años 1994 y 2008 se observó que la administración de nicotina (aguda y

crónica) mejora el desempeño de los individuos en tareas como motricidad fina, atención de alerta-precisión y tiempo de respuesta, atención orientada y tiempo de respuesta, precisión de la memoria episódica a corto plazo y memoria de trabajo-tiempo de respuesta (Heishman y cols., 2010). Contrariamente, en estudios en ratas se observó que la administración de nicotina disminuye la cantidad de neuronas en el giro dentado del HPC, asociada a una disminución de marcadores de neurogénesis y plasticidad neuronal (Shingo y Kito, 2005). No obstante, hay evidencia que sostiene que el consumo crónico de nicotina no tiene efecto nocivo alguno en estructuras cerebrales específicas (McCorkindale y cols., 2016). Dados los resultados contradictorios sobre este tema es que se requieren más antecedentes para definir con precisión el impacto del consumo crónico de nicotina en el desarrollo de posibles secuelas neurológicas en sus consumidores.

1.5. Terapias farmacológicas para el consumo crónico de alcohol o nicotina

Actualmente, el tratamiento farmacológico aprobado para el alcoholismo por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) se basa en los medicamentos naltrexona, acamprosato y disulfiram (NIAAA, 2015). El éxito de estos tratamientos se ve mermado debido a los numerosos efectos secundarios subyacentes del uso de estos fármacos, causando poca adherencia al tratamiento, baja efectividad y abandono de la terapia (Zindel y Kranzler, 2014).

Para el tabaquismo, los tratamientos actuales aprobados por la FDA consisten en la terapia de reemplazo de nicotina o la administración de bupropión y/o vareniclina (FDA, 2017). A pesar de la eficacia referida a estos tratamientos, muchos pacientes recaen en el consumo de tabaco, por lo que se necesitan terapias alternativas para aumentar las tasas de abandono del tabaco y prevenir recaídas (Aubin y cols., 2013). Así, los tratamientos farmacológicos actuales disponibles para la dependencia de alcohol o nicotina no son efectivos para tratar la codependencia de estas sustancias, por lo que el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos constituye un desafío fundamental para la farmacología.

1.6. Alda-1 como potencial agente terapéutico para el consumo crónico de alcohol o nicotina

Estudiando los efectos cardioprotectores de la enzima ALDH2 sobre la isquemia/reperfusión en un modelo cardíaco animal, Chen y Cols. (2008) desarrollaron una molécula orgánica pequeña denominada Alda-1 (N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida) (ver **Figura 5**) capaz de activar la ALDH2. Posteriormente se demostró *in vitro* e *in vivo* que Alda-1 se une a la ALDH2 y actúa como un activador farmacológico (Perez-Miller y cols., 2010; Beretta y cols., 2010; Belmont-Díaz y cols., 2016). El efecto de la administración de Alda-1 también se ha asociado a un aumento del clearance de aldehídos citotóxicos como el 4-HNE, generado un efecto neuroprotector en modelos de isquemia/reperfusión (Singh y cols., 2013; Fu y cols., 2014).

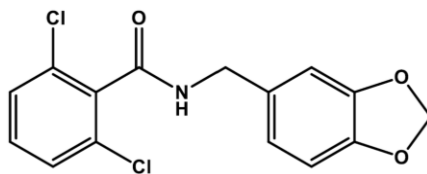


Figura 5. Estructura química de Alda-1.

La naturaleza electrofílica del 4-HNE le permite interactuar con componentes celulares y formar aductos con proteínas, incluida la ALDH2 (Chen y cols., 2008) y ácidos nucleicos, conduciendo a la pérdida de funcionalidad o mutaciones celulares (Breitzig y cols., 2016). La exposición crónica etanol o nicotina aumenta la peroxidación lipídica y consecuentemente, los niveles de 4-HNE en modelos animales (Bhagwat y cols., 1998; Haorah y cols., 2008). De hecho, se ha demostrado *in vitro* que 4-HNE se une al GLT-1 en astrocitos, impidiendo su funcionamiento y conduciendo a un estado de excitotoxicidad y neurodegeneración (Blanc y cols., 1998; Maragakis y Rothstein, 2001). Conjuntamente, 4-HNE se ha asociado a neuroinflamación al desencadenar señales intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción

como NF- κ B y AP1, induciendo mayor transcripción de citoquinas y enzimas proinflamatorias (Ramana y cols., 2006; Shoeb y cols., 2014).

Estudios toxicológicos recientes en ratas demuestran que la administración de Alda-1 es capaz de reducir la citotoxicidad y reactividad glial inducida por la administración aguda de altas dosis de alcohol (Kim y cols., 2018). Asimismo, Rivera-Meza y cols. (2019) han demostrado que la administración de Alda-1 a ratas UChB (seleccionadas genéticamente por su alta preferencia por el consumo de alcohol) es capaz de anular en 90% de la adquisición del consumo de alcohol en los animales que nunca han consumido alcohol, y redujo en 65% del consumo crónico de alcohol en ratas con consumo crónico de esta sustancia, sin mostrar ningún tipo de toxicidad. La reducción del consumo crónico de alcohol por la administración de Alda-1 es inesperada, pues estudios previos han mostrado que la administración de agentes secuestradores de aldehídos o la activación genética de la ALDH2 en el VTA no modifican el consumo crónico de alcohol (Peana y cols., 2015; Israel y cols., 2017). De igual forma que con el alcohol, la administración de Alda-1 disminuye el consumo crónico de nicotina en ratas UChB en un 50-75% (datos aún no publicados); este resultado fue reversible pues los animales recobraron el consumo basal después de la suspensión de Alda-1.

En resumen, los estudios presentados anteriormente sugieren que la activación farmacológica de la enzima ALDH2 por Alda-1 podría ser un mecanismo nuevo y efectivo para reducir la recaída en el consumo crónico de etanol o nicotina en ratas. Debido a las propiedades citoprotectoras mostradas por Alda-1, se propone que la reducción del consumo crónico de alcohol o nicotina inducida por Alda-1 se asocia a una disminución en el estrés oxidativo cerebral y la neuroinflamación (ver **Figura 6**).

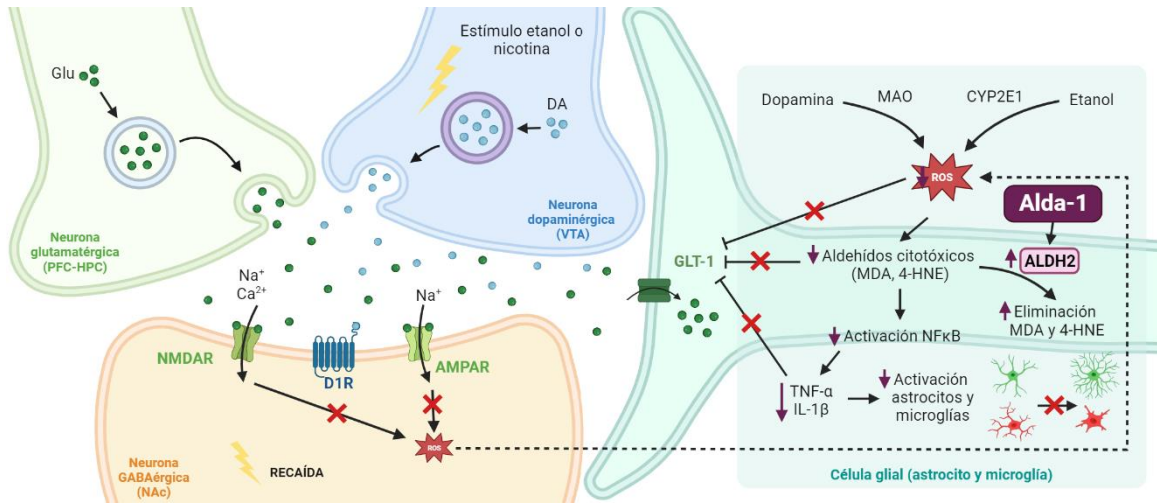


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto para Alda-1. Se propone que Alda-1, al activar la enzima ALDH2, aumentaría la eliminación de aldehídos citotóxicos como MDA y/o 4-HNE, disminuyendo la expresión de citoquinas proinflamatorias. La disminución de estas especies disminuiría la alteración de GLT-1, recuperando su función. Así, el glutamato acumulado en la sinapsis sería recapturado por el astrocito, disminuyendo la excitotoxicidad y la generación de ROS. De esta forma, se evitaría promover el ciclo de estrés oxidativo y neuroinflamación y disminuiría la recaída en el consumo de etanol o nicotina. Glu: glutamato; DA: dopamina. Creado con Biorender.com

2. HIPÓTESIS

La administración de oral Alda-1 reduce la recaída en el consumo de etanol o nicotina en ratas UChB mediante la disminución de la neuroinflamación y estrés oxidativo cerebral.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración oral de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol o nicotina de ratas UChB, y evaluar marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo cerebral.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Determinar el efecto de la administración de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol o nicotina ratas UChB.

4.2. Determinar el efecto de la administración de Alda-1 sobre la neuroinflamación en HPC y NAc de ratas UChB con recaída en el consumo de etanol o nicotina mediante la medición de la reactividad glial (GFAP e Iba-1) y abundancia de NeuN en HPC mediante inmunofluorescencia, microscopía confocal, análisis morfométrico y Western Blot.

4.3. Determinar el efecto de la administración de Alda-1 sobre el estrés oxidativo cerebral de ratas UChB con recaída en el consumo de etanol o nicotina mediante la medición de los niveles de la GSSG/GSH en HPC y MDA en tejido cerebral mediante técnicas bioquímicas colorimétricas.

5. MATERIALES

5.1. Animales

Cincuenta y siete ratas hembra UChB adultas fueron usadas en los experimentos. Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (luces apagadas desde las 19:00 horas), con agua y alimentación *ad libitum* durante todo el experimento. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el Comité Institucional de Bioseguridad perteneciente a la Administración Conjunta de Campus Norte de la Universidad de Chile, y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile con protocolo CBA 1125 FMUCH.

5.2. Reactivos

5.2.1. Reactivos generales

De Merck (Darmstadt, Alemania): etanol absoluto, paraformaldehído (PFA), fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico fumante (HCl), trietanolamina (TEA) ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$), cloruro de sodio (NaCl), ácido acético glacial (CH_3CO_2), tris HCl, acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), ácido fosfórico (H_3PO_4) y azida de sodio (NaN_3); de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU): Tritón X-100, fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), ácido etilendiaminotetraacético anhidro (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), ácido sulfosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$), L-glutati3n oxidado ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$), 2-vinilpiridina ($\text{C}_7\text{H}_7\text{N}$), ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$), acrilamida ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$), bisacrilamida ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$), persulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), (3-aminopropil)triétoxissilano (APTS, $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$) y tetrametiletildiamina (TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$); de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU): ditartrato de (-) nicotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2 \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) y β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato tetrahidratado (β -NADPH, $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); de

Calbiochem (San Diego, CA, EEUU): dodecilsulfato de sodio (SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$); de Winkler (Lampa, Santiago, Chile): deoxicolato de sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$), sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$); de VWR Life science (Radnor, PE, EEUU): Tris base.

Alda-1 fue sintetizado en el Laboratorio Desarrollo de Fármacos a cargo del Dr. David Vásquez, tal como se describe en Rivera-Meza y cols. (2019).

5.2.2. Reactivos para inmunofluorescencia

De Calbiochem (San Diego, CA, EEUU): Mowiol 4-88 (475904); de Cell Signaling (Danvers, MA, EEUU): SignalStain (#8114), NGS (#5425); de Winkler (Lampa, Santiago, Chile): albúmina de suero bovino (BSA, BM-0150)

5.3. Anticuerpos, sondas fluorescentes y enzimas

5.3.1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (G3893, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 (019-19741, Fujifilm WAKO, Richmond, VA, EEUU), anticuerpo monoclonal de ratón anti-4-HNE (MAB3249, R&D Systems, Minneapolis, MI, EEUU), anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (MAB377, Merck, Darmstadt, Alemania), anticuerpo policlonal de pollo anti-NeuN (NUN-0020, Aves Labs, Davis, CA, EEUU), anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (G043, ABM, Richmond, BC, Canadá).

5.3.2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (A-11001, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo Alexa Fluor 594 (A-11012, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón HRP (31430, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

5.3.3. Sondas fluorescentes

Dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (D1306, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

5.3.4. Enzimas

Glutación reductasa de levadura de panadería (*S. cerevisiae*) (G3664, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

5.4. Kits comerciales

Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), Cóctel inhibidor de la proteasa cOmplete™ (Roche, Merck, Darmstadt, Alemania), kit rápido de Western Blot Pierce™, sustrato ECL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

5.5. Otros insumos

Liquid blocker super PAP pen (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EEUU), compuesto O.C.T. Tissue-Tek® (Sakura, Torrance, CA, EEUU), reactivo TRIzol® (15596018, Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU)

6. MÉTODOS

6.1. Modelo experimental

6.1.1. Modelo de recaída en el consumo de etanol en ratas UChB

Veintiocho ratas hembra UChB que consumen etanol de forma voluntaria fueron expuestas a una solución de etanol 10% v/v durante 86 días. El día 87 de la planificación se agregó una segunda botella de etanol 20% v/v para evaluar la preferencia de consumo entre estas dos soluciones. En el día 100 de la programación, los animales fueron privados de etanol durante 14 días, administrándoles diariamente y de forma oral 25 mg/Kg de Alda-1 (G1, n=7) o un volumen equivalente de vehículo (goma arábica 2%) (G2, n=7) durante los últimos 7 días de privación de etanol; ambos grupos fueron eutanasiados para obtención de muestras de sangre y extracción de tejido cerebral durante el último día de privación (grupo Privación). Los animales restantes fueron re-expuestos a las soluciones de etanol 10% y 20% durante 7 días, administrándoles diariamente y de forma oral 25 mg/Kg de Alda-1 (G3, n=7) o vehículo (G4, n=7) durante los últimos 14 días de la planificación (período privación/re-acceso) (grupo Re-acceso). Los animales fueron eutanasiados el último día de re-acceso al etanol para extracción de muestras de sangre y tejido cerebral (ver **Figura 4**). Un grupo de 8 ratas que solo consumieron agua durante la planificación constituyó el grupo control.

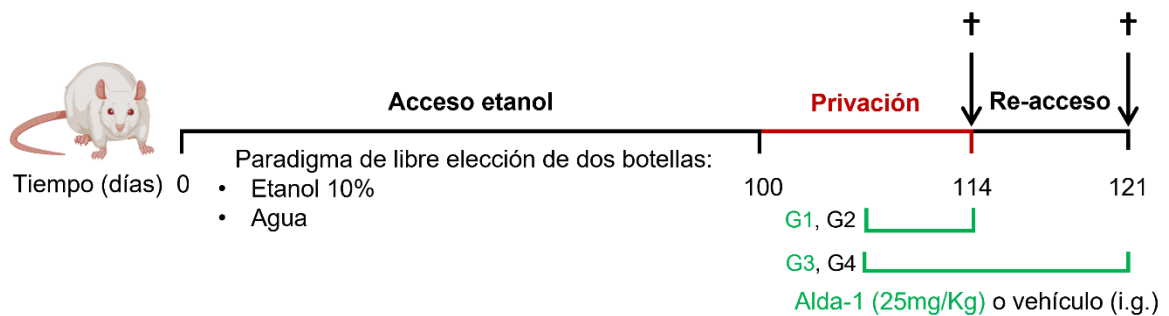


Figura 7. Modelo de recaída en el consumo de etanol en ratas UChB.

6.1.2. Modelo de consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB

Treinta ratas hembra UChB fueron tratadas con inyecciones i.p. diarias de 0,8 mg/Kg de nicotina durante 14 días para inducir el consumo voluntario de nicotina en los animales según Quintanilla y cols. 2018. Luego, las ratas fueron expuestas de forma crónica a una solución de ditartrato de nicotina en concentraciones ascendentes hasta la estabilización del consumo de nicotina base en una concentración de 19,25 mg/L (día 71). Posteriormente, a los animales se les administró diariamente y de forma oral 25 mg/Kg de Alda-1 (n=15) o vehículo (n=14) durante 7 días (una rata murió durante el período de estabilización del consumo de nicotina, no siendo asignada a un grupo experimental). Luego de este tratamiento, los animales continuaron el consumo de nicotina 19,25 mg/L durante 6 días para posteriormente ser privados de esta solución durante 14 días, administrándoles diariamente y de forma oral 25 mg/Kg de Alda-1 (G1, n=7) o vehículo (G2, n=7) durante los últimos 7 días de privación de nicotina; ambos grupos fueron eutanasiados para obtención de muestras de sangre y extracción de tejido cerebral durante el último día de privación (grupo Privación). Los animales restantes fueron re-expuestos a la solución de nicotina 19,25 mg/L durante 7 días, administrándoles diariamente y de forma oral 25 mg/Kg de Alda-1 (G3, n=8) o vehículo (G4, n=7) durante los últimos 14 días de la planificación (período privación/re-acceso) (grupo Re-acceso). Los animales fueron eutanasiados el último día de re-acceso a la nicotina para extracción de muestras de sangre y tejido cerebral (ver **Figura 5**). Se utilizó como grupo control el mismo grupo control del punto anterior.

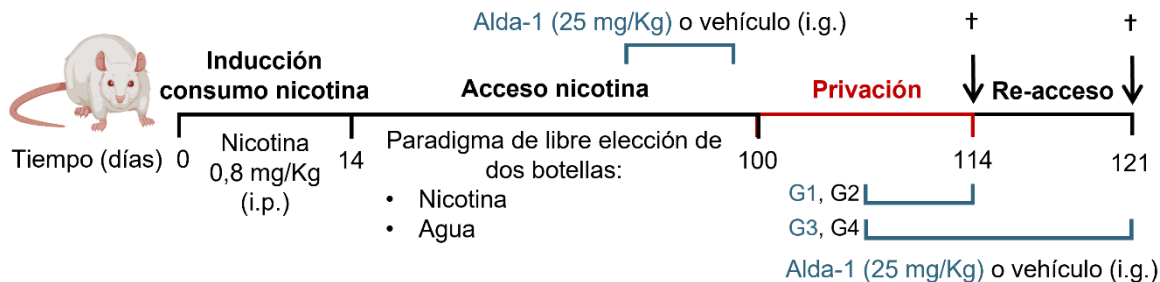


Figura 8. Modelo de consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB.

6.2. Extracción de tejido y muestras de sangre de ratas UChB

La extracción de tejido se realizó según Morales y cols. (2008) con ciertas modificaciones. Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral 400 mg/Kg i.p. y ubicadas de forma supina sobre una base de trabajo para exponer la caja torácica y el corazón. Se tomaron muestras de sangre directamente del corazón utilizando tubos BD Vacutainer® con EDTA y se perfundió intracardialmente con 200 mL de PBS 0,1 M, pH 7,4. Luego, se disecó el cerebro separando los dos hemisferios por la cisura interhemisférica: el hemisferio izquierdo fue fijado en PFA 4% y almacenado a 4°C, y el hemisferio derecho se utilizó para extracción de VTA, AMY, HPC, NAc y PFC mediante microsacabocados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x g a 4°C por 10 minutos para la obtención de plasma y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

6.3. Cortes histológicos

El hemisferio cerebral izquierdo se fijó en PFA 4% a 4°C por 2 días, se criopreservó en sacarosa 10% p/v por 2 días a 4°C, luego sacarosa 30% con azida de sodio 0,1% p/v por 2 días a 4°C y finalmente se congeló utilizando compuesto O.C.T. Tissue-Tek® como material de incorporación. Mediante un criostato (Thermo Scientific Microm HM 525 Cryostat) se obtuvieron 10 cortes coronales de 30 µm de grosor del NAc en las coordenadas estereotáxicas bregma 2,20 y 1,70

mm y HPC entre los bregma -3,20 y -3,60 mm según Paxinos y Watson (1987), los que fueron montados en portaobjetos silanizados y almacenados a -20°C hasta su utilización.

6.4. Doble inmunofluorescencia contra GFAP e Iba-1

Dos cortes por animal fueron seleccionados considerando morfología similar entre las distintas condiciones experimentales, se quitó el exceso de O.C.T. y se aplicó una barrera hidrofóbica con un PAP pen (Electron Microscopy Science). Los portaobjetos se ubicaron en una cámara húmeda, se lavaron con PBS 0,1 M, pH 7,4 3 veces durante 5 minutos con agitación suave e incubaron con una solución de bloqueo (NGS 10%, BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en PBS 0,1 M, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente, se descartó la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (dilución 1:750, G3893, Sigma-Aldrich), marcador de astrocitos, y el anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 (marcador de microglía, dilución 1:1000 019-19741, WAKO FUJIFILM Cellular Dynamics Inc.) diluidos en *SignalStain® Antibody Diluent* (8112, Cell Signaling Technology) a 4°C durante toda la noche. Luego, los portaobjetos se lavaron 5 veces con solución de lavado (Tritón X-100 0,1% v/v en PBS 0,1 M, pH 7,4) por 5 minutos con agitación suave, para seguir con una incubación de los anticuerpos de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (dilución 1:500, A-11001, ThermoFisher Scientific), anti-conejo Alexa Fluor 594 (dilución 1:500, A-11012, ThermoFisher Scientific), y el marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dilución 1:1000, D1306, ThermoFisher Scientific) diluidos en *SignalStain® Antibody Diluent* durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave y protegido de la luz. Por último, los portaobjetos se lavaron 1 vez con PBS 0,1 M, pH 4 por 7 minutos, 4 veces con solución de lavado (Tritón X-100 0,1% en PBS 0,1 M, pH 7,4) por 7 minutos, y se montaron con Mowiol 4-88 (Calbiochem®) para revisión en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100).

6.5. Determinación de marcadores de neuroinflamación

Cuatro microfotografías por animal se obtuvieron del *stratum radiatum* del HPC y del NAc mediante microscopía confocal (LSM 700, Zeiss) utilizando los láseres de 358 nm (azul), 488 nm (verde) y 555 nm (rojo). El área analizada para cada microfotografía fue de 0,04 mm² y el grosor (*stack*, eje Z) fue medido para cada caso. La reactividad astrogliar, evaluada mediante la longitud de los procesos y el grosor de los procesos primarios astrocíticos expresados en micrómetros (µm), fue determinada mediante un enfoque estereológico para 2-4 astrocitos positivos para GFAP en cada microfotografía, utilizando el software de procesamiento de imágenes Fiji (NIH, Bethesda, MA, EEUU) de acuerdo con Tavares y cols. (2017) La densidad de astrocitos y microglías se estimó en las mismas microfotografías contando las células positivas para GFAP/DAPI e Iba-1/DAPI presentes al menos en 5 *stacks* en el eje Z (cada *stack* equivale a 1 µm). Luego, este valor fue dividido en el volumen de la microfotografía (área (eje X,Y) x grosor (eje Z)), y fue expresada en células/mm³.

6.6. Purificación de proteínas y determinación de los niveles proteicos de NeuN en hipocampo mediante Western Blot

La mitad del HPC fue homogenizado en 800 µL de reactivo TRIzol® (Ambion, Life Technologies, ThermoFisher Scientific) y 10 µL de glicógeno 2 mg/mL de forma mecánica y posterior ciclo de 5 pulsos en ultrasonido, e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se agregó 160 µL de cloroformo y mezcló vigorosamente en vórtex por 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Se reservó la fase acuosa que contenía el RNA y la fase orgánica fue tratada para purificación de proteínas.

Se precipitó el DNA con 240 µL de etanol absoluto, se mezcló por inversión e incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 2000 g por 5 minutos a 4°C y se reservó el sobrenadante en un tubo limpio. Posteriormente,

se agregaron 1,6 mL de isopropanol, se mezcló en vórtex e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 12000 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó 2 veces con 800 µL y 250 µL de etanol 95% v/v, centrifugando a 7600 g por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Por último, el pellet fue resuspendido en 300 µL de tampón de lisis (EDTA 10 mM, NaCl 140 mM, SDS 5% p/v, Tris 100 M, pH 8), incubado a 50°C durante 21 horas. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 3 minutos, se centrifugaron a 10000 g a 4 °C por 10 minutos y se reservó el sobrenadante en un tubo limpio.

La concentración de proteínas se realizó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA™ (ThermoFisher Scientific) según las indicaciones del fabricante. En resumen, se tomó una alícuota del sobrenadante anterior y se diluyó 1:5 en agua destilada. Luego, se cargaron 25 µL en duplicado de la muestra diluida y de estándares, se agregaron 200 µL de mix de reacción y se incubó 30 minutos a 37°C. Luego, se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas Epoch (Biotek Instruments, Winooski, VT, EEUU). La concentración de proteínas se obtuvo interpolando las lecturas de absorbancia de las muestras en la curva de calibración de BSA.

Las muestras fueron mezcladas con tampón Laemli 4X (SDS 8% p/v, 2-mercaptoetanol 20% v/v, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,08%, Tris HCl 0,25 M, pH 6,8). Cantidades iguales de proteína fueron sometidas a una electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida 5-10% a voltaje constante de 80 V. Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa verificando la correcta transferencia de las proteínas mediante tinción con rojo ponceau. Luego, las membranas fueron lavadas con TBST 1X e incubadas con leche descremada (Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) 2% p/v por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C y agitación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (dilución 1:1000, MAB377,

Merck) o el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (dilución 1:5000, G043, ABM) como control de carga. Por último, las membranas se lavaron con TBST 1X 1 vez por 15 minutos y 4 veces por 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (dilución 1:10000, 31430, ThermoFisher Scientific). Las membranas fueron observadas mediante quimioluminiscencia en el equipo de revelado ChemiScope 3400 (Clinx Science Instrument Company, Shanghai, China) usando el kit rápido de detección *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (34077, ThermoFisher, USA). La densidad de las bandas fueron medidas utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MA, EEUU).

6.7. Determinación de la razón GSSG/GSH hipocampal

Los niveles de GSH y GSSG para la determinación de la razón GSSG/GSH se realizó según Rahman y cols. (2006) con ciertas modificaciones. En resumen, las muestras de tejido hipocampal se homogenizaron en 300 μ L de buffer de extracción (Tritón X-100 0,1% v/v, ácido sulfosalicílico 0,6% p/v en tampón fosfato (KPE) 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,5) mediante 2 ciclos de 5 pulsaciones de ultrasonido y centrifugadas a 10000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se conservó para la medición de GSH total. Para la medición de GSSG, 50 μ L de sobrenadante se trató con 1 μ L de 2-vinilpiridina 0,93 mM en buffer KPE y se incubó 1 hora a temperatura ambiente bajo campana. Luego, se agregó 3 μ L de trietanolamina (TEA) 1,25 M en buffer KPE, se mezcló vigorosamente y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Veinte microlitros de sobrenadante sin tratamiento, sobrenadante con tratamiento de 2-vinilpiridina/TEA y estándares de GSSG (0,05 μ M - 12,8 μ M) se cargaron en duplicado en una placa de 96 pocillos, se agregó 60 μ L de DNTB 1,7 mM y 60 μ L de enzima glutatión reductasa 0,8 U/mL. Finalmente, se agregó 60 μ L de β -NADPH 0,8 mM a cada pocillo y se midió la absorbancia a 412 nm cada 30 segundos por 3 minutos en un lector de microplacas Epoch (Biotek Instruments,

Winooski, VT, EEUU). La concentración de GSH total y GSSG se obtuvo interpolando las lecturas de absorbancia de las muestras en la curva de calibración de GSSG utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[\text{GSH}_{\text{total}}] = 2 \times \frac{\Delta\text{OD}_{412\text{nm}}/\text{min} - B}{A} \times \text{dilución muestra}$$

$$[\text{GSSG}] = \frac{\Delta\text{OD}_{412\text{nm}}/\text{min} - B}{A} \times \text{dilución muestra}$$

$$[\text{GSSG}/\text{GSH}] = \frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSH}_{\text{total}}] - 2 \times [\text{GSSG}]}$$

6.8. Determinación de la concentración de MDA en tejido cerebral completo

Los niveles de MDA se determinaron en cerebro completo según Motaghinejad y cols. (2017). En resumen, 50 µL de homogenizado de cerebro completo (en buffer RIPA con inhibidores de proteasas) con 400 µg de proteínas o 50 µL de una solución de estándar de MDA (2,5 µM – 125 µM) fueron mezclados con 50 µL de SDS 10% p/v y fue incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó 125 µL de ácido tiobarbitúrico 0,036 M (disuelto en ácido acético 50% v/v, pH 3,5) y se incubó a 90°C por 1 hora. Las muestras fueron enfriadas en hielo por 5 minutos y centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Dosecientos microlitros de sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio, se mezcló con 200 µL de n-butanol y se centrifugó a 10000 g por 5 minutos. Finalmente, 100 µL de la fracción de n-butanol fue transferido a una placa de 96 pocillos en duplicado y se midió la absorbancia a 532 nm en un lector de microplacas Epoch (Biotek Instruments, Winooski, VT, EEUU). La concentración de MDA se obtuvo interpolando las lecturas de absorbancia de las muestras en la curva de calibración de MDA.

6.9. Análisis estadísticos

Todos los datos se encuentran expresados como promedio ± SEM. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante prueba t de Student o análisis

de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, considerando el tratamiento farmacológico como el factor de análisis y el consumo de etanol o nicotina, el consumo de agua, la ingesta total de fluidos o la preferencia de la solución de etanol como variables dependientes seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni para comparaciones múltiples. Para la prueba t y prueba *post hoc* de Bonferroni se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU), y para la prueba de ANOVA de muestras repetidas se utilizó el programa estadístico MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Bélgica). La longitud de proceso astrocítico, grosor de proceso primario, densidad de astrocito y microglía, GSSG/GSH y MDA fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* Tukey utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU). Para todos los análisis se consideró un valor de $p < 0,05$ para la significación estadística.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la administración de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol en ratas UChB

Un grupo de 28 ratas UChB tuvieron acceso *ad libitum* a 2 botellas con soluciones distintas: una botella con agua y otra botella con etanol 10% para establecer un patrón de consumo crónico de alcohol (paradigma de libre elección de dos botellas). El día 87 se incorporó una tercera botella con etanol 20%. Antes de la incorporación del etanol 20%, los animales consumieron 8,8 g/Kg de etanol en promedio (días 1-86); luego de esta modificación, los animales aumentaron su consumo de forma significativa a 12,0 g/Kg en promedio, es decir, 3,2 g/Kg de etanol más que antes de la incorporación de esta botella (prueba t, $p < 0,001$) (**Figura 9A**). A los 97 días de acceso, los animales alcanzaron un consumo promedio de etanol de 9,2 g/Kg (días 1-97; **Figura 9A**). Además, del total de etanol consumido por los animales 90,7% proviene de la solución de etanol 10% y 9,3% a la de etanol 20% (**Figura 9B**).

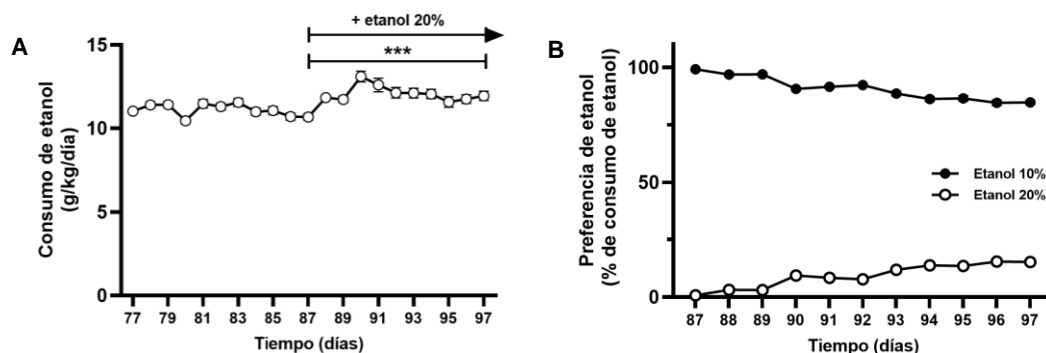


Figura 9. Consumo crónico de etanol y preferencia de consumo según concentración de la solución de etanol en ratas UChB. (A) Los círculos representan el promedio diario del consumo de etanol expresado en gramos por kilogramo de peso del animal \pm SEM ($n=28$). La flecha indica el momento de la incorporación de la botella de etanol 20%. *** $p < 0,001$, prueba t del promedio de consumo de etanol entre los días 1-86 vs días 87-97. (B) Preferencia del consumo de etanol según concentración de éste en las soluciones. Los círculos representan el valor promedio diario del porcentaje de preferencia según concentración de etanol

± SEM (n=28). Los círculos negros representan el porcentaje de preferencia del etanol 10% y los blancos representan el porcentaje de preferencia del etanol 20%.

En cuanto al consumo de agua previo a la incorporación del etanol 20% durante el período representado en la Figura 10A, los datos mostraron que los animales consumieron 28,2 mL/Kg diarios en promedio. Luego de la incorporación de dicha botella, no se observaron diferencias significativas en el consumo pues los animales consumieron 27,0 mL/Kg al día en promedio (prueba t, $p>0,05$) (**Figura 10B**).

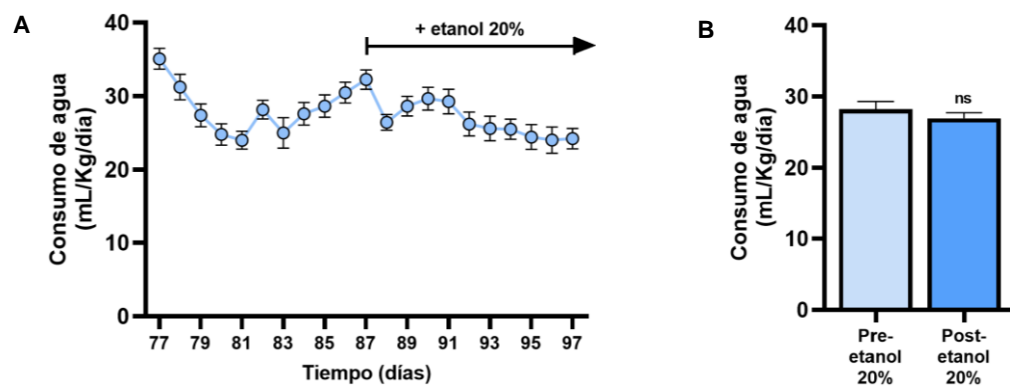


Figura 10. Consumo de agua durante el período de consumo crónico de etanol en ratas UChB. (A) Consumo de agua promedio diario expresado en mililitros por kilogramo de peso del animal. Los círculos representan el promedio diario del consumo de agua de los animales ± SEM (n=28). La flecha indica la incorporación de la botella de etanol 20%. **(B)** Consumo de agua promedio diario previo (Pre-etanol 20%) y posterior (Post-etanol 20%) a la incorporación de la botella de etanol de 20%. $p>0,05$, prueba t del promedio de consumo de agua entre los días 77-86 vs días 87-97.

El análisis de la ingesta total de líquidos de los animales durante el período de consumo crónico de etanol mostró un consumo promedio de 173,2 mL/Kg diarios (**Figura 11A**). La incorporación de la botella de etanol 20% no provocó cambios significativos en este parámetro (prueba t no pareada, $p>0,05$) (**Figura 11B**).

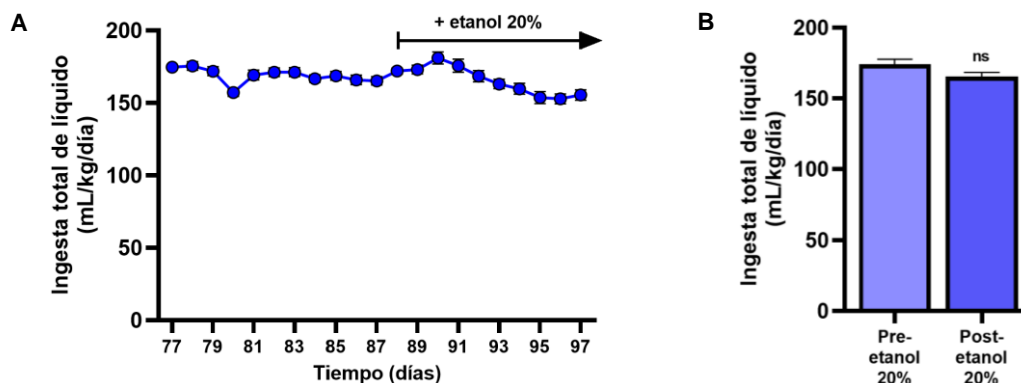


Figura 11. Ingesta total de líquidos durante el período de consumo crónico de etanol en ratas UChB. (A) Los círculos representan el promedio diario del consumo total de líquidos expresado en mililitros por kilogramo de peso del animal por día \pm SEM (n=28). La flecha indica el momento de la incorporación de la botella de etanol 20%. **(B)** Consumo total de fluidos promedio previo (Pre-etanol 20% v/v) y posterior (Post-etanol 20% v/v) a la incorporación de la botella de etanol de 20%. $p>0,05$, prueba t promedio del consumo entre los días 1-86 vs días 87-97.

Luego de aproximadamente 100 días de consumo voluntario de etanol, los animales fueron privados del acceso a las botellas de etanol durante 14 días, restituyendo luego el acceso durante 7 días ambas soluciones. En los últimos 14 días de la planificación se administró por vía oral una dosis diaria de Alda-1 (25 mg/kg) o un volumen equivalente de vehículo (goma arábica 2%). Los resultados mostraron que la administración de Alda-1 redujo notablemente la recaída en el consumo de etanol en comparación a los animales que recibieron vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p<0,001$). Específicamente, en el primer día de re-acceso, el grupo tratado con vehículo consumió 11,9 g/Kg de etanol, 10,2% más que el consumo basal (10,8 g/Kg, último día de consumo antes del período de privación), aumento que no fue estadísticamente significativo (prueba t, $p>0,05$). Por su parte, el grupo tratado con Alda-1 consumió 5,0 g/Kg de etanol el primer día de re-acceso, 53,7% menos que el consumo basal (prueba t, $p<0,001$) y 57,7% menos que el grupo tratado con vehículo (prueba t, $p<0,001$). Este efecto inhibitorio de Alda-1 en el consumo de etanol post privación mostró ser tiempo-dependiente, alcanzando una disminución máxima de 92,2% respecto del

vehículo al séptimo día de re-acceso (prueba *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,001$) (Figura 12).

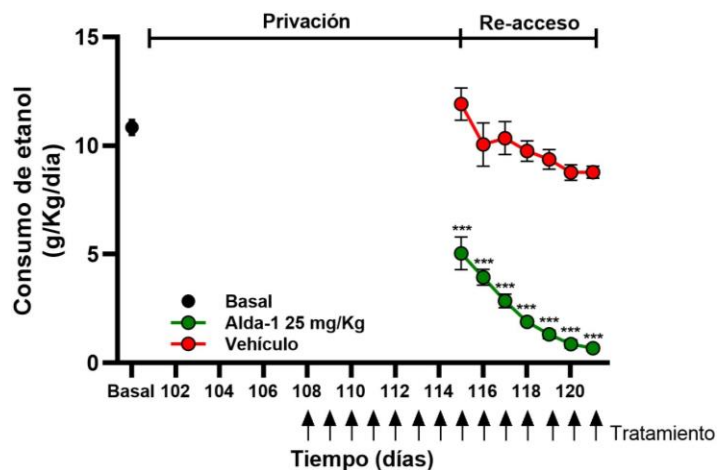


Figura 12. Efecto de la administración oral de Alda-1 en la recaída en el consumo de etanol en ratas UChB. El círculo negro representa el consumo de etanol promedio de los animales previo al período de privación (basal) ($n=13$). Las flechas señalan la administración oral diaria de Alda-1 o vehículo. Los círculos verdes representan los valores de consumo de etanol promedio diario \pm SEM del grupo tratado con Alda-1 ($n=7$); los círculos rojos representan los valores de consumo de etanol promedio diario \pm SEM de los animales tratados con un volumen equivalente de vehículo ($n=6$). $p < 0,001$, ANOVA de muestras repetidas; *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni.

Durante el re-acceso al consumo de etanol, los animales tuvieron acceso a agua, etanol 10% y etanol 20%. El análisis de la preferencia según la concentración de etanol mostró que fue de 80,1% para etanol 10% y 19,9% para etanol 20% previo al período de privación (basal, **Figura 13**). El análisis de la preferencia en la etapa de re-acceso mostró diferencias respecto a la preferencia basal: los animales tratados con vehículo aumentaron su preferencia por la solución al 10% (86,7%) y disminuyeron su preferencia por la de 20% (13,3%) (**Figura 13A**). Por su parte, los animales tratados con Alda-1 disminuyeron su preferencia por la solución al 10% (67,9%) y la aumentaron por la de 20% (32,1%), lo que constituye un aumento de 18,8% del consumo de etanol 20% en este grupo (**Figura 13B**).

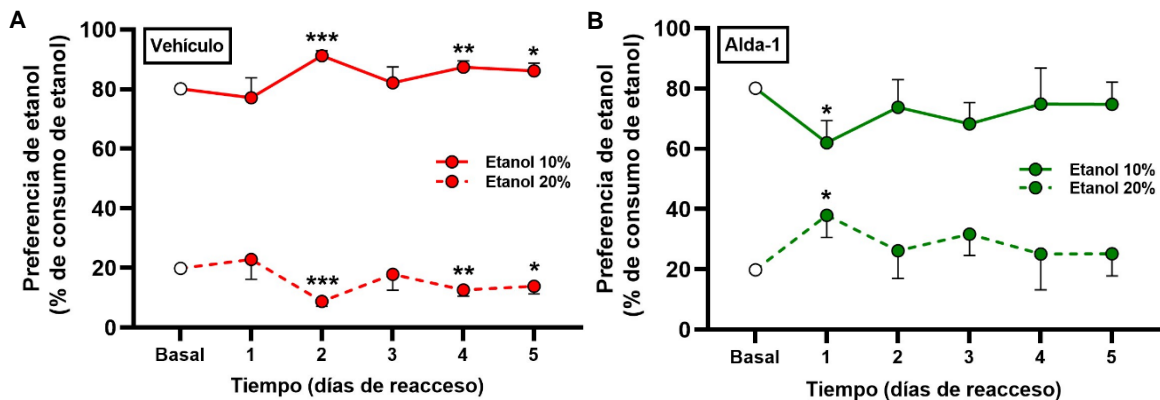


Figura 13. Efecto de la administración oral de Alda-1 en la preferencia del consumo de etanol durante el período de recaída. (A) Preferencia del consumo de etanol 10% (línea continua) y 20% (línea punteada) basal y durante el período de re-acceso al consumo de etanol de los animales tratados con vehículo (n=6). **(B)** Preferencia del consumo de etanol 10% (línea continua) y 20% (línea punteada) basal y durante el período de re-acceso al consumo de etanol de los animales tratados con Alda-1 (n=7). En ambos casos, los círculos representan el promedio de la preferencia de consumo de etanol 10% y 20% diario \pm SEM de los animales previo a la privación (basal, blancos) tratados con vehículo (rojos) y Alda-1 (verdes). El análisis de preferencia se restringió del primer al quinto día de re-acceso ya que el consumo de etanol del grupo tratado con Alda-1 durante el sexto y séptimo día fue insignificante. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, prueba t múltiple.

En cuanto al consumo de agua de los animales durante el período de re-acceso, se observó que la reducción del consumo de etanol inducida por la administración de Alda-1 se acompañó de un aumento del consumo de agua en comparación al grupo vehículo (ANOVA muestras repetidas, $p < 0,001$) y al valor basal previo al período de privación (prueba t, $p < 0,001$) (**Figura 14A**), mientras que el promedio del consumo de agua post re-acceso del grupo vehículo fue similar al consumo basal de agua previo al período de privación (prueba t, $p > 0,05$) (**Figura 14A**). El análisis de la cantidad total de fluidos consumido por los animales en este período mostró que no hubo diferencias significativas para ambos grupos de tratamiento durante la administración de los tratamientos Alda-1 y vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p > 0,05$) (**Figura 14B**).

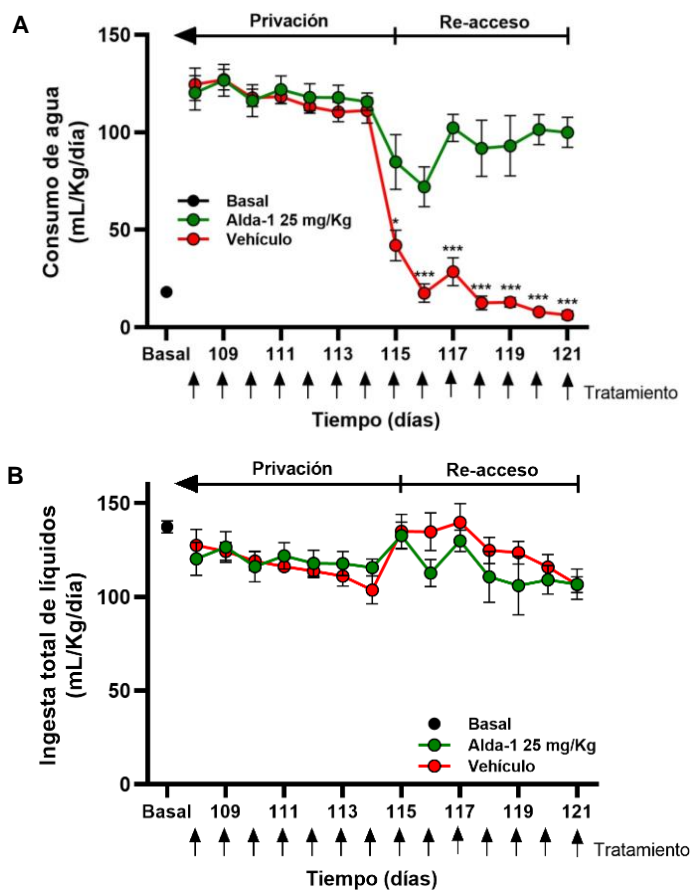


Figura 14. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y de fluido total en ratas UChB re-expuestas al consumo de etanol. (A) Consumo de agua promedio de los animales durante el período de administración oral de los tratamientos Alda-1 y vehículo. $p < 0,001$; ANOVA de muestras repetidas. **(B)** Consumo total de fluidos promedio de los animales durante el período de administración de los tratamientos Alda-1 y vehículo, $p > 0,05$; ANOVA de muestras repetidas; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni. Las flechas representan la administración oral de Alda-1 o vehículo. El círculo negro representa el promedio \pm SEM del consumo de agua (A) o fluido total (B) previo al período de privación de etanol (Basal, $n=13$); los círculos verdes representan el promedio \pm SEM del consumo de agua (A) o fluido total (B) diario del grupo tratado con Alda-1 ($n=7$); los círculos rojos representan el promedio \pm SEM del consumo de agua (A) o fluido total (B) diario del grupo tratado con vehículo ($n=6$). $p > 0,05$, ANOVA de muestras repetidas.

7.2. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB

Luego de un período inicial de inducción a los efectos de la nicotina mediante la administración intraperitoneal de este compuesto (0,8 mg/kg/día durante 14 días), un grupo de 30 ratas UChB fueron expuestas al consumo voluntario de nicotina a través del acceso *ad libitum* a dos botellas, una conteniendo agua y la otra una solución de nicotina que fue aumentando su concentración desde 1,75 mg/L hasta 19,25 mg/L, según se describe en Métodos 6.1.2. Luego de 70 días de consumo voluntario de nicotina, los animales alcanzaron un consumo diario promedio de 2,3 mg/Kg de nicotina (**Figura 15**).

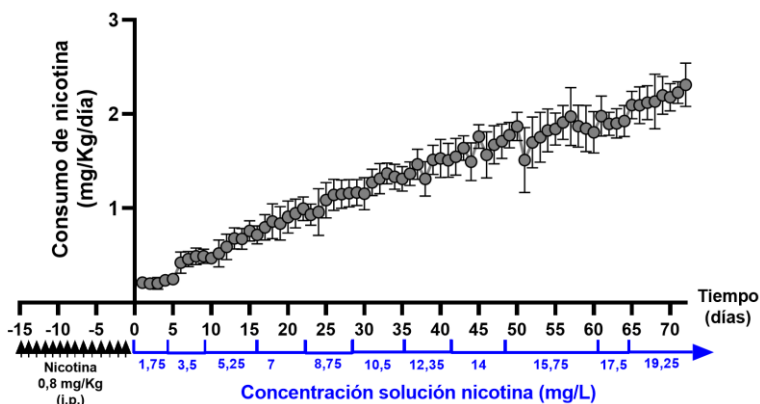


Figura 15. Establecimiento del consumo de nicotina en ratas UChB. El gráfico muestra el consumo promedio de nicotina \pm SEM (mg/kg/día) por los animales ($n=30$) en el tiempo y frente a las distintas concentraciones de la solución de nicotina. Las flechas indican la administración de nicotina 0,8 mg/Kg i.p. durante 14 días previos al acceso a las soluciones de nicotina.

Para evaluar el efecto de Alda-1 sobre el consumo crónico de nicotina, después de 70 días de libre acceso a su consumo las ratas fueron tratadas diariamente con Alda-1 (25 mg/kg) o vehículo por vía oral durante 7 días. Un análisis de ANOVA de muestra repetidas entre los días 67 a 87 mostró diferencias significativas entre los grupos tratados con Alda-1 y vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p<0,001$), observándose una disminución máxima de 35,7% en el día 79 (**Figura 16**).

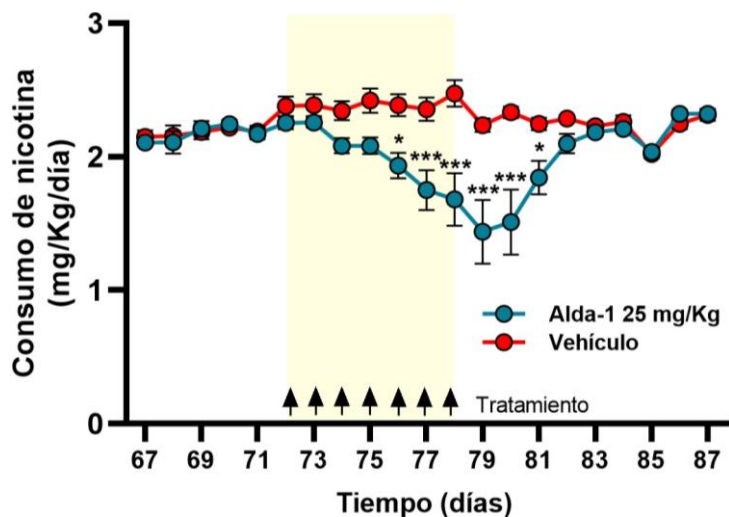


Figura 16. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo crónico de nicotina en ratas UChB. Las flechas indican la administración oral de Alda-1 o vehículo. Los círculos azules representan el consumo diario promedio \pm SEM de nicotina del grupo tratado con Alda-1 (n=14); los círculos rojos representan el consumo diario promedio \pm SEM de nicotina del grupo tratado con vehículo (n=14). $p < 0,001$, ANOVA de muestras repetidas; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni.

Con respecto al consumo de agua durante el período de administración de Alda-1 y vehículo, se observó que no hubo cambios significativos entre grupos (ANOVA muestras repetidas, $p > 0,05$) (**Figura 17A**). Sin embargo, se observó una disminución del consumo total de fluidos en el grupo tratado con Alda-1 en comparación al grupo tratados con vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p < 0,01$), el que mostró ser tiempo-dependiente y reversible una vez suspendido el tratamiento farmacológico (**Figura 17B**).

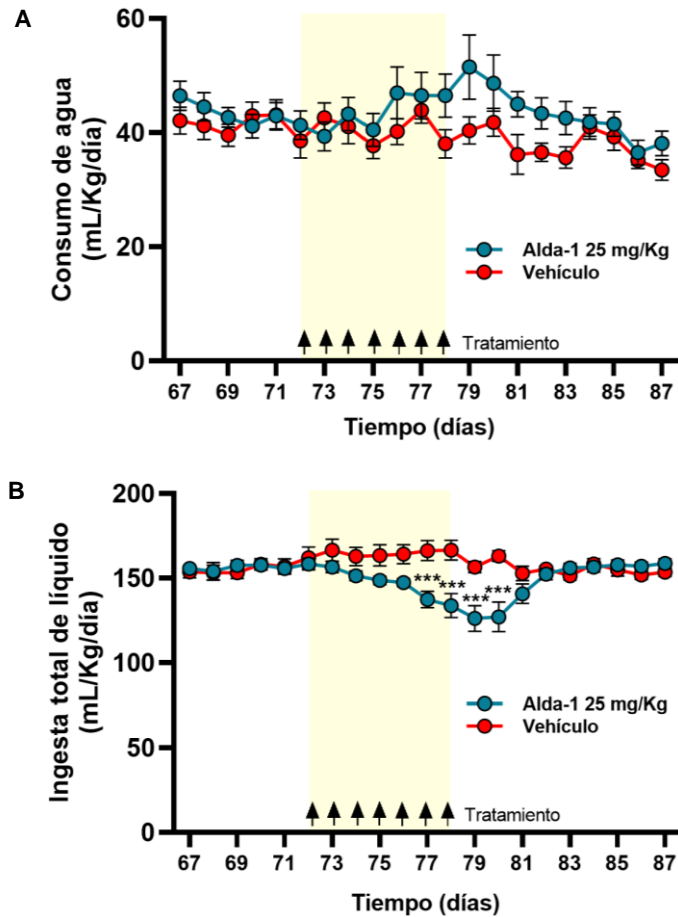


Figura 17. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y líquido total de ratas UChB expuestas al consumo crónico de nicotina. (A) Consumo de agua de los animales durante el período de administración de los tratamientos Alda-1 y vehículo. $p > 0,05$, ANOVA muestras repetidas. **(B)** Ingesta de líquido total de los animales durante el período de administración de los tratamientos Alda-1 y vehículo. $p < 0,01$, ANOVA de muestras repetidas; *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni. En ambos casos las flechas indican la administración oral de Alda-1 o vehículo, los círculos azules representan el consumo diario promedio \pm SEM de agua (A) o líquido total (B) del grupo tratado con Alda-1 ($n=14$), y los círculos rojos representan el consumo diario promedio \pm SEM de agua (A) o líquido total (B) del grupo tratado con vehículo ($n=14$).

Una vez terminado el estudio del efecto de Alda-1 sobre el consumo crónico de alcohol, los animales continuaron el consumo de nicotina durante 6 días en los que se volvió a estabilizar el consumo de esta sustancia. Los animales fueron

privados de ésta durante 14 días, permitiendo luego su re-acceso por 7 días para establecer la recaída en el consumo de nicotina. En los últimos 14 días de la planificación se administró diariamente por vía oral una dosis de Alda-1 o un volumen equivalente de vehículo. Los resultados mostraron que la administración de Alda-1 redujo significativamente la recaída en el consumo de nicotina en comparación al grupo vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p < 0,001$) (**Figura 18**). Específicamente, en el primer día de re-acceso, el grupo tratado con vehículo consumió 2,0 mg/Kg de nicotina, 14,5% menos que el basal (2,3 mg/Kg, último día de consumo antes del período de privación), disminución que fue estadísticamente significativa (prueba t, $p < 0,01$). Por su parte, el grupo tratado con Alda-1 consumió 0,6 mg/Kg de nicotina, 73,9% menos que el basal (prueba t, $p < 0,001$) y 70% menos que el grupo tratado con vehículo (prueba t, $p < 0,001$). La disminución del consumo de nicotina por efecto de la administración de Alda-1 se mantuvo durante todo el período de re-acceso, observándose una disminución de 81,8% al séptimo día de re-acceso en comparación al grupo tratado con vehículo (prueba *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,001$) (**Figura 18**).

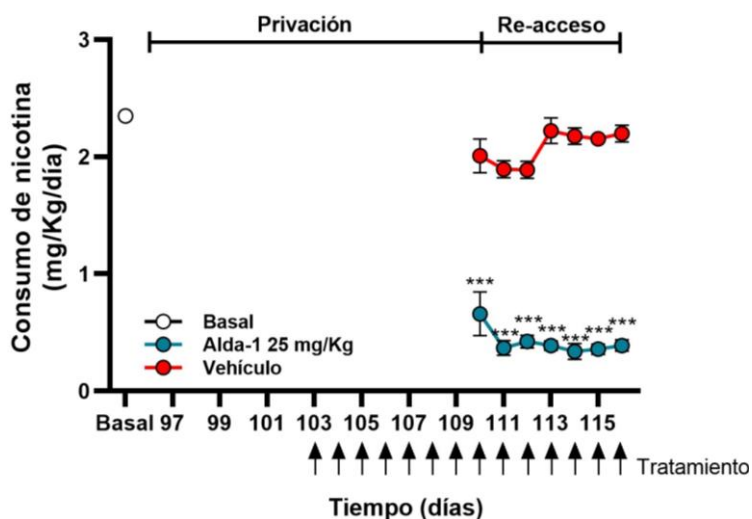


Figura 18. Efecto de la administración oral de Alda-1 en la recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB. Consumo de nicotina promedio de los animales previo y durante el período de privación y luego del re-acceso a la solución de nicotina. Las flechas representan la

administración oral diaria de Alda-1 o vehículo. El círculo blanco representa el consumo promedio de nicotina \pm SEM de los animales previo al período de 14 días de privación (Basal, n=13); los círculos azules representan los valores de consumo promedio diario \pm SEM del grupo tratado con Alda-1 (n=6); los círculos rojos representan los valores de consumo promedio diario \pm SEM de los animales tratados con vehículo (n=7). $p < 0,001$, ANOVA de muestras repetidas; *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni.

La disminución del consumo de nicotina inducida por la administración de Alda-1 fue concomitante a un aumento del consumo de agua en comparación al grupo vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p < 0,001$) (**Figura 19A**). La cantidad de fluido total consumido no tuvo variaciones significativas entre el grupo tratado con Alda-1 y el tratado con vehículo (ANOVA de muestras repetidas, $p > 0,05$) (**Figura 19B**).

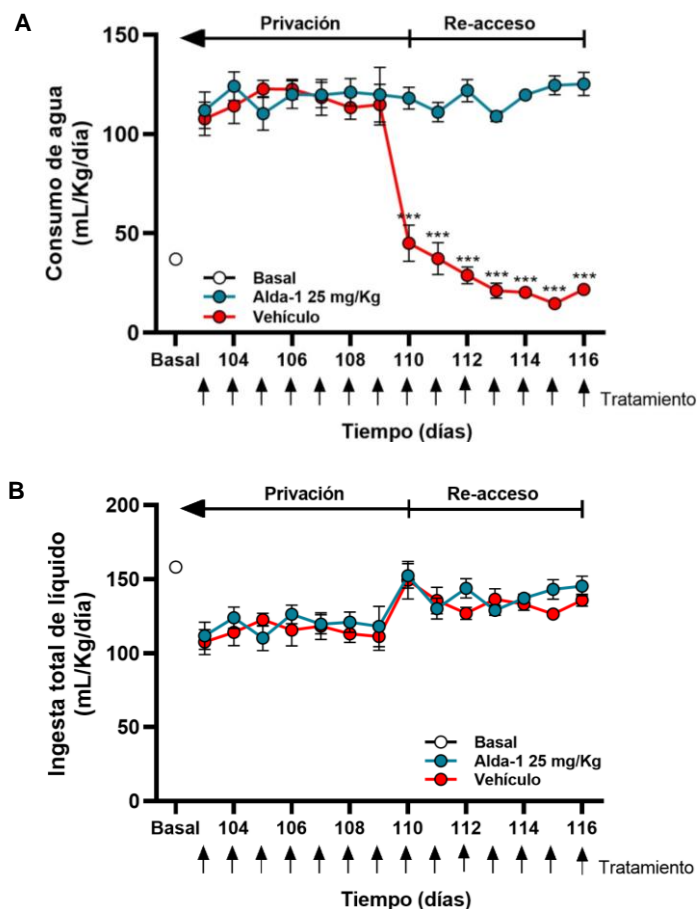


Figura 19. Efecto de la administración oral de Alda-1 en el consumo de agua y de fluido total en ratas UChB re-expuestas al consumo de nicotina. (A) Consumo de agua durante el período de administración oral de los tratamientos Alda-1 y vehículo. $p < 0,001$, ANOVA de muestras repetidas, *** $p < 0,001$, prueba *post hoc* de Bonferroni. **(B)** Consumo total de fluidos durante el período de administración de los tratamientos Alda-1 y vehículo. $p > 0,05$, ANOVA de muestras repetidas. En ambos casos las flechas representan la administración oral de Alda-1 o vehículo. El círculo blanco representa el promedio diario \pm SEM de consumo de agua (A) o fluido total (B) previo al período de privación de etanol (Basal, $n=13$); los círculos azules y rojos representan el promedio \pm SEM del consumo de agua (A) o fluido total (B) diario del grupo tratado con Alda-1 ($n=6$) o con vehículo ($n=7$), respectivamente.

7.3. Determinación de marcadores de neuroinflamación en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol

Para determinar la neuroinflamación en el HPC de ratas UChB se evaluó mediante inmunofluorescencia los marcadores de reactividad glial GFAP (marcador de astrocito) e Iba-1 (marcador de microglía) en cortes de cerebro de ratas UChB expuestas a 100 días de consumo crónico de etanol y 14 días de privación, a las que se les administró Alda-1 o vehículo los últimos 7 días de privación (grupo "Privación"). Otro grupo de ratas fue expuesto a 100 días de consumo crónico de etanol, 14 días de privación y 7 días de re-acceso, a las que se les administró Alda-1 o vehículo los últimos 14 días del estudio (período privación/re-acceso, grupo "Re-acceso"). Se incluyó en el análisis un grupo de ratas UChB que solo consumieron agua durante el experimento, constituyendo el grupo Control (**Figura 20**).

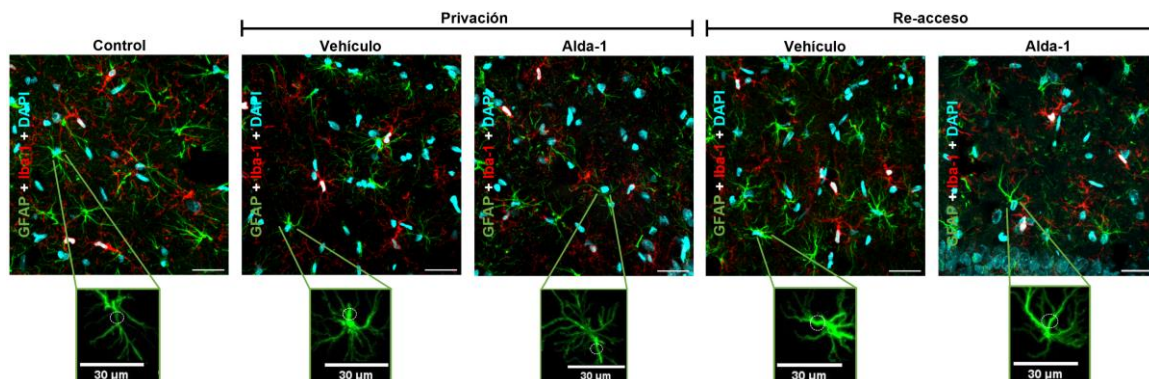


Figura 20. Microfotografías representativas de astrocitos y microglías hipocámpales de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol. Las microfotografías muestran astrocitos y microglías inmunorreactivas para GFAP (verde) e Iba-1 (rojo), respectivamente, y tinción nuclear con DAPI (cian) del HPC de una rata del grupo control, grupo Privación (tratado con vehículo o Alda-1) y grupo Re-acceso (tratado con vehículo o Alda-1). En el recuadro inferior se ilustra una magnificación a uno de los astrocitos presentes en la microfotografía y el círculo punteado indica un proceso primario del astrocito. Barra de escala: 30 μ m.

De las microfotografías obtenidas para cada grupo experimental, se realizó un análisis estereológico (Métodos 6.5.) para determinar parámetros de reactividad glial como longitud de procesos astrocíticos, grosor de procesos astrocíticos primarios, y densidad de astrocitos y microglías en el *stratum radiatum* del HPC. El análisis realizado en astrocitos no mostró diferencias significativas en la longitud de los procesos astrocíticos de los distintos grupos experimentales analizados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (**Figura 21**).

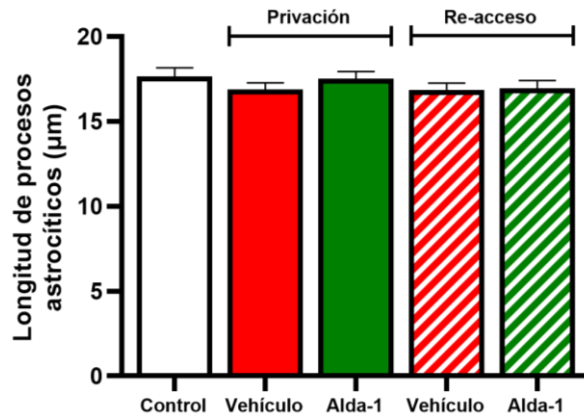


Figura 21. Longitud de procesos astrocíticos hipocámpales en ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Longitud de proceso de astrocitos del HPC de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la longitud de los procesos astrocíticos expresado en micrómetros (μm). $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

Por su parte, se observaron diferencias significativas en el grosor de los procesos astrocítico primario en HPC entre los grupos experimentales analizados (ANOVA de una vía, $p < 0,001$). Específicamente, se observó un aumento significativo en los grupos en condiciones de privación tratados con vehículo y Alda-1, y en el grupo en condiciones de re-acceso y tratado con vehículo en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p < 0,01$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre el grupo sometido a un período de re-acceso al etanol tratado con Alda-1 y el grupo control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$). La disminución de la longitud de procesos en este último grupo experimental no fue significativa en comparación a su contraparte tratada con vehículo (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$) (**Figura 22**).

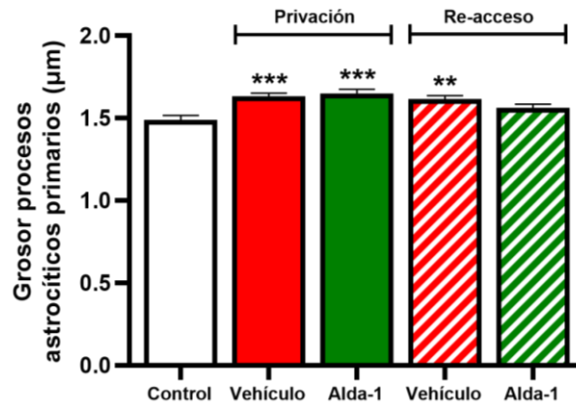


Figura 22. Grosor de procesos astrocíticos primarios hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Grosor de los procesos primarios de astrocitos del HPC de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM del grosor de los procesos astrocíticos primario expresado en micrómetros (μm). $p < 0,001$, ANOVA de una vía; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, Tukey *post hoc*.

La densidad de astrocitos en el HPC no mostró diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (**Figura 23A**); la densidad de microglía en HPC tampoco mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales evaluados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$), pero mostró una tendencia al aumento del grupo privado del consumo de etanol y tratado con Alda-1 en comparación al grupo control (**Figura 23B**).

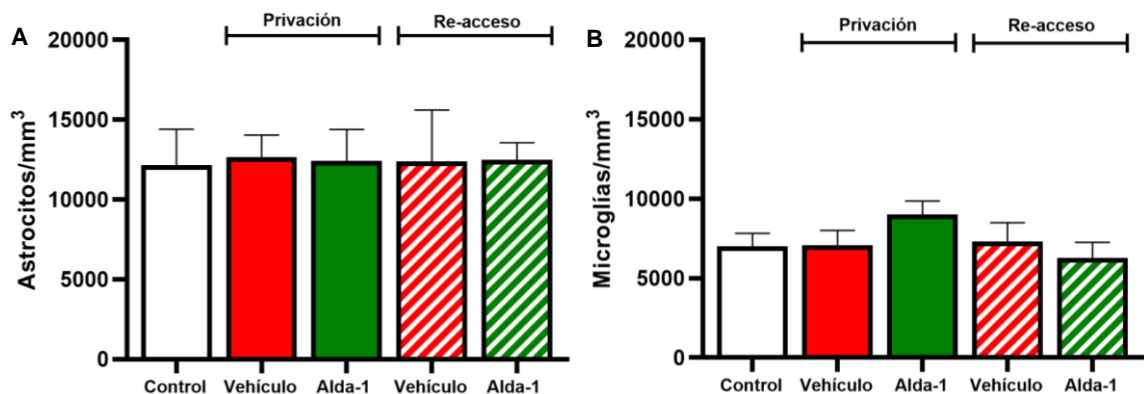


Figura 23. Densidad de astrocitos y microglías hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. (A) Densidad

de astrocitos y **(B)** microglías en el HPC de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la (A) densidad de astrocitos o (B) densidad de microglías expresada en términos de células/mm³. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

7.4. Determinación de la neuroinflamación en NAc de ratas UChB expuestas a condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol

De la misma forma que para el HPC, se determinó el efecto de Alda-1 sobre la neuroinflamación en NAc de ratas UChB de forma similar al punto 7.3. (**Figura 24**).

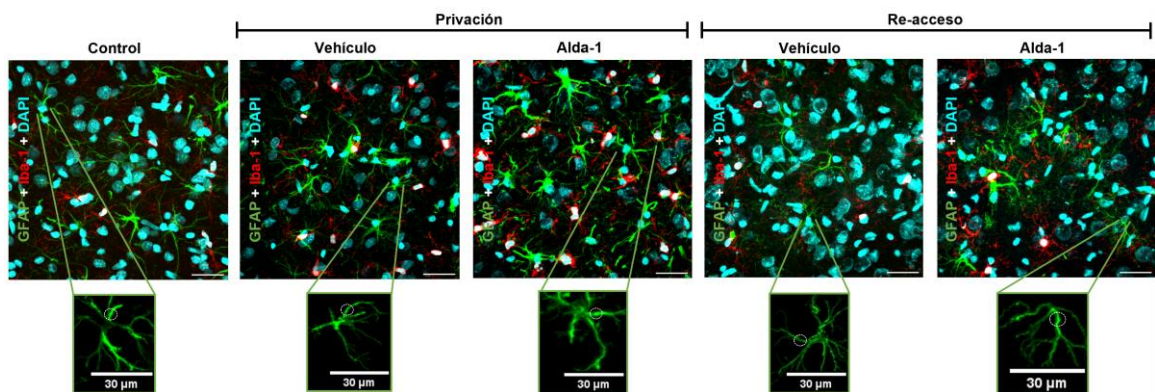


Figura 24. Microfotografías representativas de astrocitos y microglías del NAc de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol. Las microfotografías muestran astrocitos y microglías inmunorreactivas para GFAP (verde) e Iba-1 (rojo), respectivamente, y tinción nuclear con DAPI (cian) del NAc de una rata del grupo control, grupo Privación (tratado con vehículo o Alda-1) y grupo Re-acceso (tratado con vehículo o Alda-1). En el recuadro se ilustra una magnificación de uno de los astrocitos presentes en la microfotografía y el círculo punteado indica uno de los procesos primarios del astrocito. Barra de escala: 30 μ m.

El análisis estereológico de los astrocitos del NAc no mostró diferencias significativas en la longitud de los procesos astrocíticos en ningún grupo experimental evaluado (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (**Figura 25**).

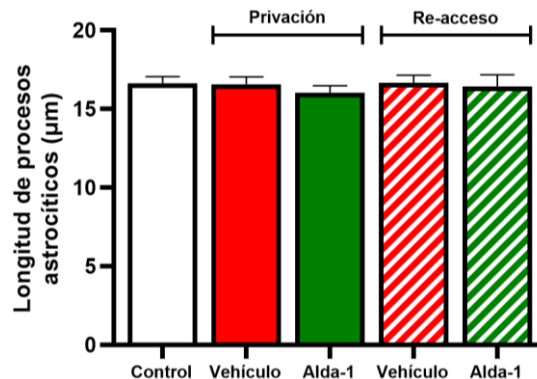


Figura 25. Longitud de procesos astrocíticos del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Longitud de proceso de astrocitos del NAc de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6; Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la longitud de los procesos astrocíticos expresado en micrómetros (μm). $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

Respecto del grosor de los procesos astrocíticos primarios en NAc, se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados (ANOVA de una vía, $p < 0,001$). Específicamente, el grupo sometido a un período de privación y tratado con Alda-1 mostró un aumento en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p < 0,05$), mientras que los grupos sometidos a un período de re-acceso al consumo de etanol mostraron una disminución en comparación al grupo control, independiente de su tratamiento farmacológico (Tukey *post hoc*, $p < 0,001$). El grupo sometido a un período de privación y tratado con vehículo no mostró diferencias significativas en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada subgrupo (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$) (**Figura 26**).

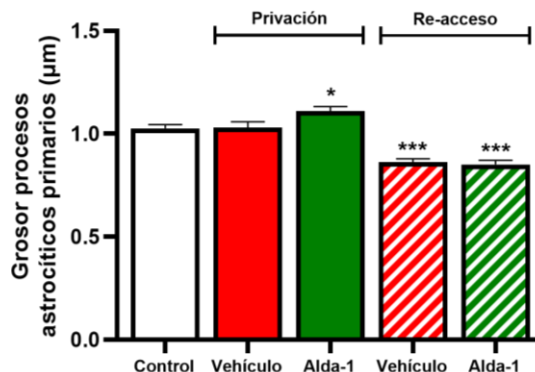


Figura 26. Grosor de procesos astrocíticos primarios del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Grosor de los procesos primarios de astrocitos del NAc de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6; Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la longitud de los procesos astrocíticos expresado en micrómetros (μm). $p < 0,001$, ANOVA de una vía; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, Tukey *post hoc*.

La densidad de astrocitos en el NAc mostró diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (ANOVA de una vía, $p < 0,01$): se observó que el grupo sometido a un período de re-acceso al consumo de etanol y tratado con vehículo disminuyó su densidad astrocítica en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p < 0,05$). El grupo sometido a un período de privación y el grupo sometido a un período de re-acceso tratado con Alda-1 no mostró diferencias significativas en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$). Dentro de ambos subgrupos, privación y re-acceso, no se observaron diferencias significativas (**Figura 27A**).

Por su parte, la densidad de microglías en el NAc mostró diferencias significativas (ANOVA de una vía, $p < 0,01$): se observó un aumento de la densidad microglial en el grupo sometido a un período de privación tratado con Alda-1 en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p < 0,01$). Además, el grupo sometido a un período de re-acceso presentó una disminución en la densidad de microglías en comparación al grupo control independientemente de su tratamiento farmacológico (Tukey *post hoc*, $p < 0,05$). El grupo sometido a privación tratado con

vehículo no mostró diferencias significativas en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$). Por otra parte, se observó que, dentro del grupo sometido a privación, el grupo tratado con Alda-1 presentó aumento significativo de la densidad microglial en comparación al grupo tratado con vehículo (Tukey *post hoc*, $p < 0,01$), efecto que no se observó en el grupo sometido a un período de re-acceso (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$) (**Figura 27B**).

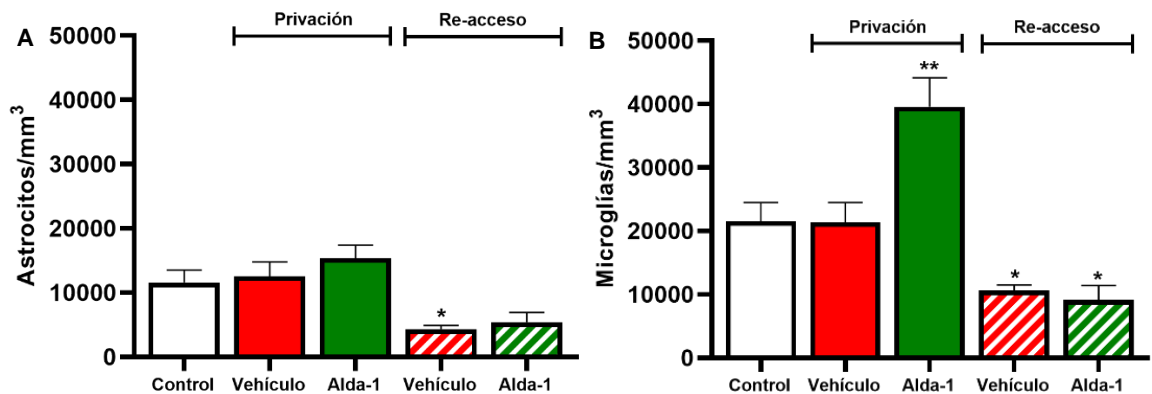


Figura 27. Densidad de astrocitos y microglías del NAc de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. (A) Densidad de astrocitos y **(B)** microglías del NAc de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6; Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la (A) densidad de astrocitos o (B) densidad de microglías expresadas como células/mm³. $p < 0,01$, ANOVA de una vía. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Tukey *post hoc*.

7.5. Determinación de marcadores de neuroinflamación en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina

De la misma forma que para el HPC y el NAc descritos anteriormente, se determinó el efecto de Alda-1 sobre la neuroinflamación en el HPC de ratas UChB de forma similar al punto 7.3 y 7.4 (**Figura 28**).

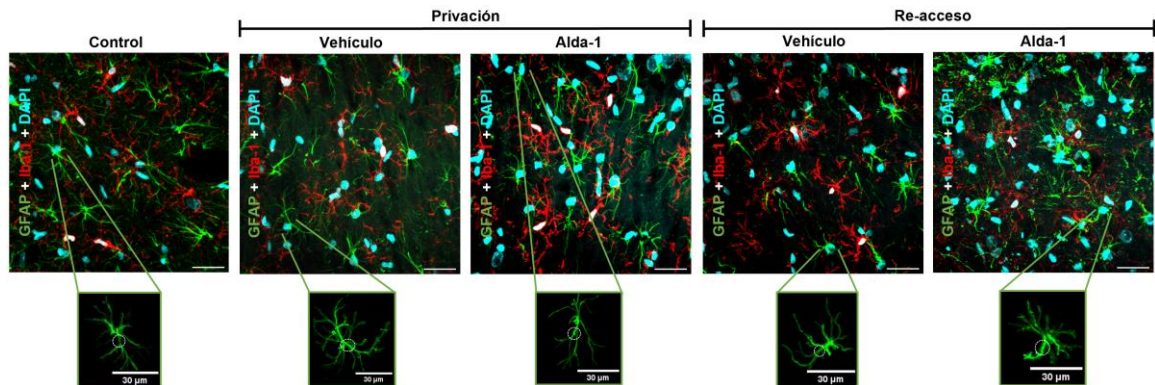


Figura 28. Microfotografías representativas de astrocitos y microglías hipocampales de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina. Las microfotografías muestran astrocitos y microglías inmunorreactivas para GFAP (verde) e Iba-1 (rojo), respectivamente, y tinción nuclear con DAPI (cian) del HPC de una rata del grupo control, grupo Privación (tratado con vehículo o Alda-1) y grupo Re-acceso (tratado con vehículo o Alda-1). En el recuadro inferior se ilustra una magnificación a uno de los astrocitos presentes en la microfotografía y el círculo punteado indica un proceso primario del astrocito. Barra de escala: 30 μm .

El análisis estereológico de los astrocitos hipocampales no mostró diferencias significativas con respecto a la longitud de los procesos astrocíticos en ningún grupo experimental analizado (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (**Figura 29**).

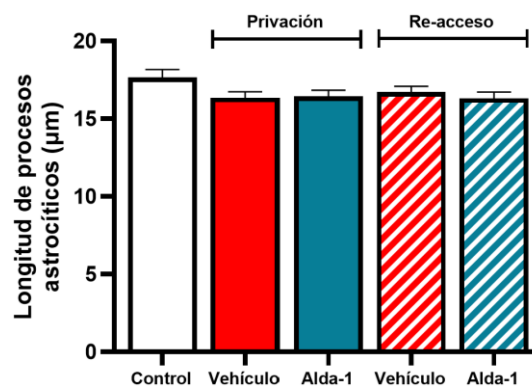


Figura 29. Longitud de procesos astrocíticos hipocampales en ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. Longitud de proceso de astrocitos del HPC de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6; Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM

de la longitud de los procesos astrocíticos expresado en micrómetros (μm). ANOVA de una vía, $p > 0,05$.

En cuanto al grosor de los procesos astrocíticos primarios, se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados (ANOVA de una vía, $p < 0,001$): se observó un aumento en el grupo sometido a un período de re-acceso al consumo de nicotina tratado con Alda-1 en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p < 0,001$). Este grupo, además, mostró un aumento significativo al ser comparado con su contraparte tratada con vehículo (Tukey *post hoc*, $p < 0,001$). Los grupos sometidos a un período de privación y el grupo sometido a re-acceso al consumo de nicotina tratado con vehículo no mostraron diferencias significativas en comparación al grupo control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$) (Figura 30).

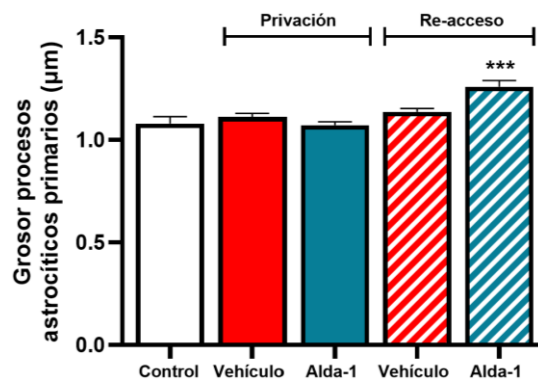


Figura 30. Grosor de procesos astrocíticos primarios hipocampales de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. Grosor de los procesos primarios de astrocitos del HPC de ratas control ($n=7$), grupo Privación ($n=6$ vehículo; $n=6$; Alda-1) y grupo Re-acceso ($n=5$ vehículo; $n=5$ Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la longitud de los procesos astrocíticos expresado en micrómetros (μm). $p < 0,001$, ANOVA de una vía; *** $p < 0,001$, Tukey *post hoc*.

La densidad de astrocitos en el HPC de ratas UChB control y sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina no mostró diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (Figura 31A). Por su parte, la densidad de microglías en el

HPC tampoco mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales evaluados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$), pero mostró una tendencia al aumento del grupo privado del consumo de nicotina tratado con vehículo en comparación al grupo control (**Figura 31B**).

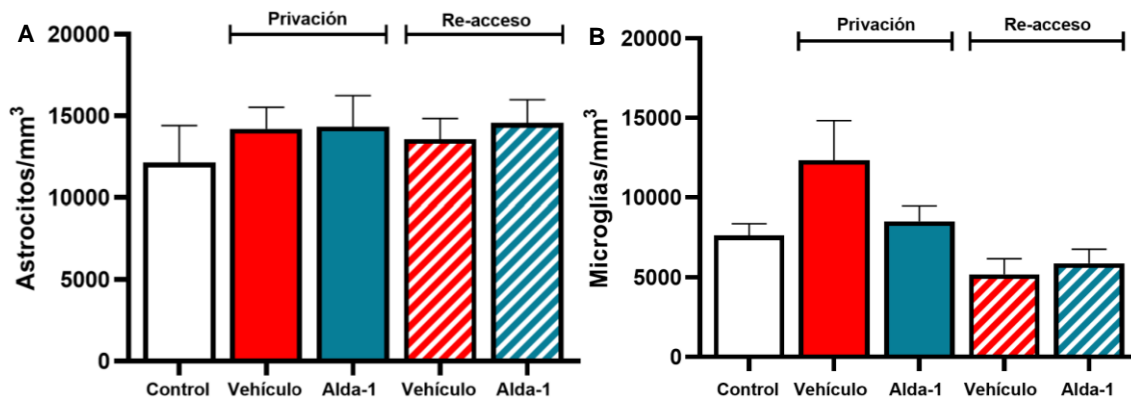


Figura 31. Densidad de astrocitos y microglías en el hipocampo de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. (A) Densidad de astrocitos y **(B)** microglías del HPC de ratas control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=5 vehículo; n=5 Alda-1). Las barras representan el valor promedio \pm SEM de la (A) densidad de astrocitos o (B) densidad de microglías expresadas como células/mm³. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

7.6. Determinación del daño neuronal en HPC de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol o nicotina

Para determinar el daño neuronal producido por la privación y re-acceso después de un consumo crónico de etanol o nicotina se evaluó la abundancia relativa de NeuN como marcador de neuronas en el giro dentado del HPC en ratas UChB (**Figura 32A**). NeuN, también llamado Fox-3, es un factor de transcripción con expresión en neuronas del SNC principalmente y localizado en el núcleo o en el citoplasma perinuclear de la neurona; es ampliamente utilizado como antígeno de reconocimiento nuclear neuronal o de diferenciación de este tipo celular (Muller y cols., 1992; Gusel'nikova y Korzhevskiy, 2015).

En una primera instancia, se intentó determinar mediante inmunofluorescencia los niveles de NeuN en cortes histológicos del cerebro de una rata UChB sometida a consumo crónico de etanol, privación y posterior re-acceso al consumo de etanol. Se realizaron diversas modificaciones al protocolo estándar de inmunofluorescencia, como la composición de las soluciones de bloqueo e incubación de anticuerpos primarios y secundarios, el tiempo de incubación de éstas y los anticuerpos primarios utilizados (anticuerpo policlonal de pollo anti-NeuN marca Aves Labs y anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN marca Merck Millipore). Sin embargo, no se detectó señal de NeuN en los cortes de HPC con ninguno de los anticuerpos (**Figura 32B**). Sin embargo, en el caso del anticuerpo Merck se observó señal para NeuN en el PFC (**Figura 32C**).

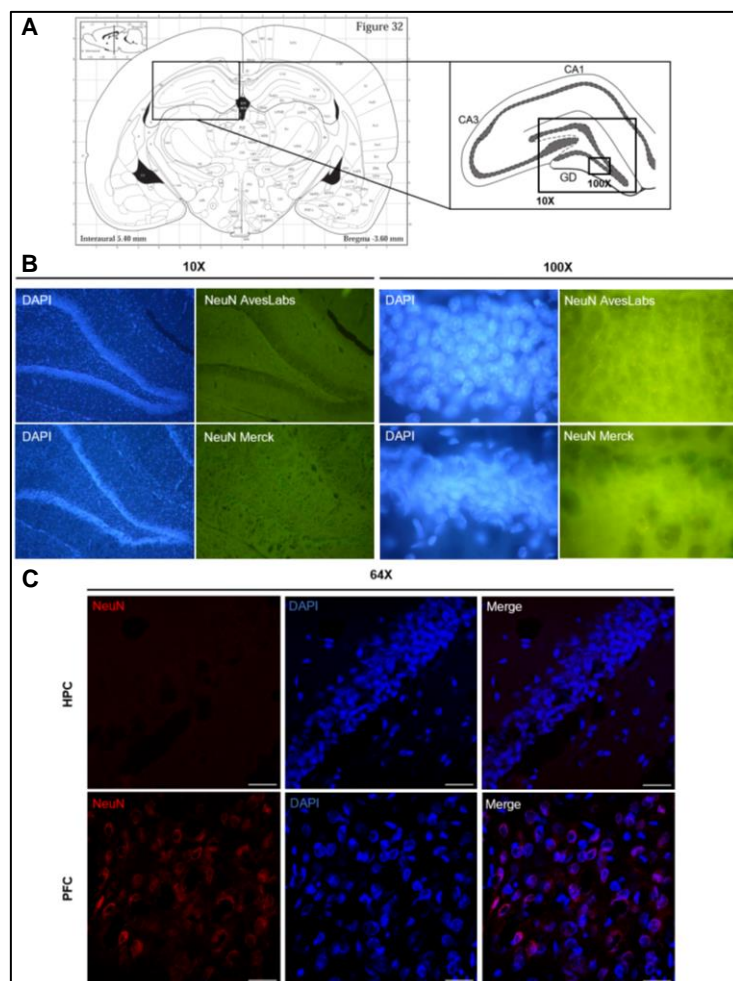


Figura 32. Inmunofluorescencia para la detección de NeuN en el giro dentado del HPC en cortes cerebrales de ratas UChB. (A) Derecha: esquema de un corte coronal de cerebro de rata en el bregma 3.60 mm según *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos y Watson, 1986) utilizado para la inmunofluorescencia contra NeuN. Izquierda: magnificación a la zona del giro dentado en donde se tomaron las microfotografías presentadas en B y C; el recuadro grande indica la zona del giro dentado en donde se tomaron las microfotografías con el objetivo 10X, y el recuadro pequeño indica la zona del giro dentado en donde se tomaron las microfotografías con el objetivo 100X. (B) Microfotografías representativas de núcleos inmunorreactivos para NeuN (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul) del giro dentado en cortes coronales de cerebro de rata UChB. Para NeuN se muestran las microfotografías de los tejidos tratados con el anticuerpo policlonal de pollo anti-NeuN marca Aves Labs (superior) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN marca Merck Millipore (inferior) tomadas con los objetivos 10X (derecha) y 100X (izquierda). (C) Microfotografías representativas de núcleos inmunorreactivos para NeuN (rojo, izquierda), tinción nuclear con DAPI (azul, centro), y NeuN/DAPI (merge rosado, derecha) del giro dentado (HPC, superior) y PFC (inferior) en cortes coronales de cerebro de rata UChB. Barra de escala 30 μ m.

Posteriormente, se evaluó de la abundancia relativa de neuronas en base a los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de HPC de ratas UChB mediante Western Blot. La optimización del ensayo de Western Blot para NeuN fue realizado en una Pasantía de Investigación por la estudiante de Bioquímica Isidora Schneider (ver **Anexo 1**).

Los resultados para los experimentos de consumo de etanol se muestran en la **Figura 33A**. La cuantificación de los niveles proteicos de NeuN no mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$) (**Figura 33B**).

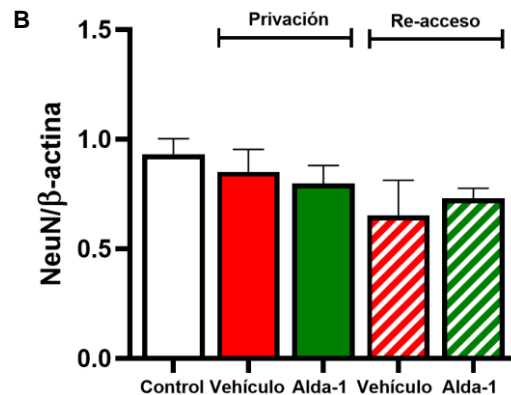
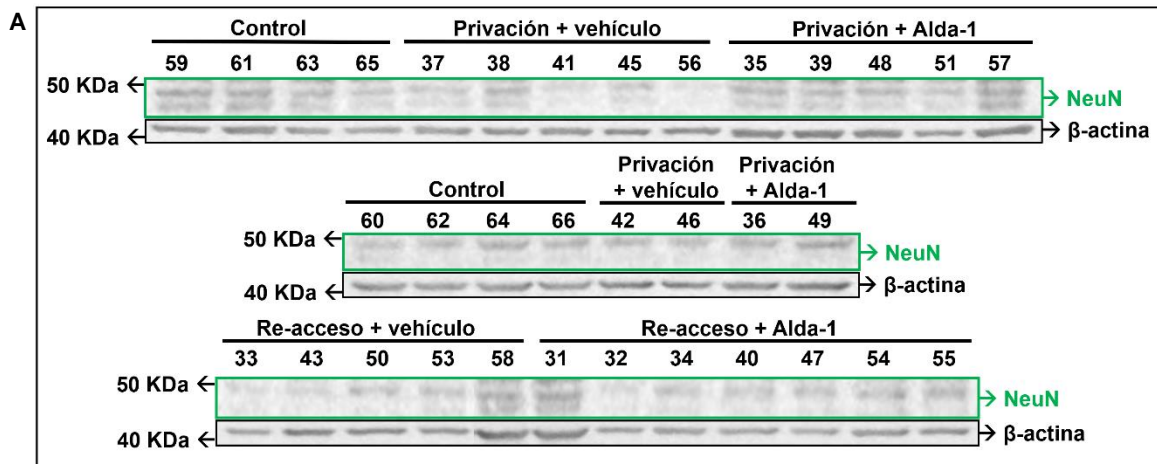


Figura 33. Efecto de la administración de Alda-1 en los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de HPC de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. (A) Western Blot representativo de NeuN en homogenizados de tejido hipocampal de ratas control (n=8), grupo Privación (n=7 vehículo; n=7 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=7 vehículo; n=7 Alda-1). **(B)** Cuantificación de los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de tejido hipocampal de ratas. Se cuantificaron las bandas de 48-46 KDa según indicaciones del fabricante, indicadas en el recuadro verde. Los datos se presentan como promedio \pm SEM del nivel proteico de NeuN normalizado por el control de carga β -actina. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

De la misma forma que para el grupo que consumió etanol, la cuantificación de las bandas obtenidas del Western Blot para el grupo que consumió nicotina (**Figura 34A**) no mostró diferencias significativas de los niveles proteicos de NeuN

en tejido hipocampal en los grupos experimentales evaluados ($p > 0,05$, ANOVA de una vía) (**Figura 34B**).

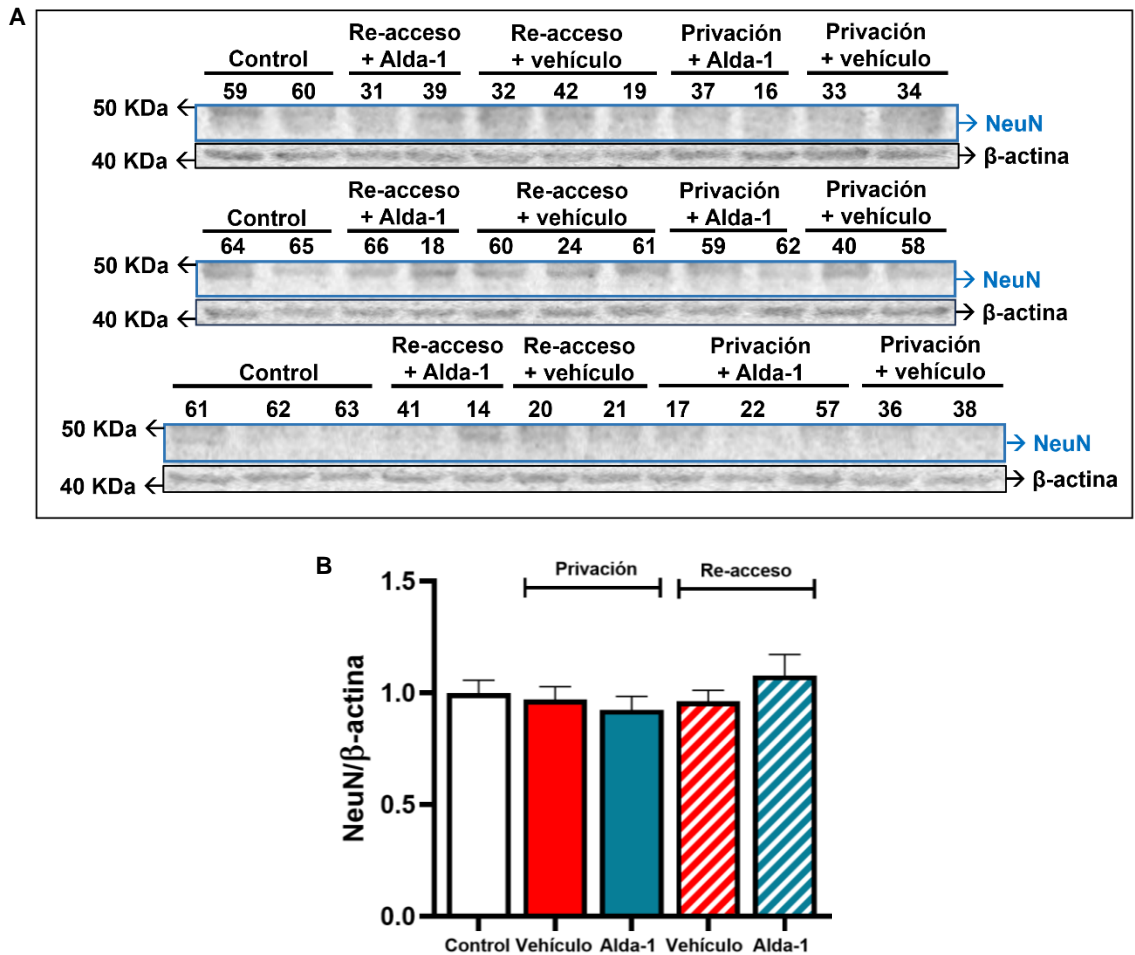


Figura 34. Efecto de la administración de Alda-1 en los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de HPC de ratas UChB sometidas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. (A) Western Blot representativos de NeuN en homogenizados de tejido hipocampal de ratas control ($n=8$), grupo Privación ($n=7$ vehículo; $n=7$ Alda-1) y grupo Re-acceso ($n=7$ vehículo; $n=7$ Alda-1). **(B)** Cuantificación de los niveles proteicos de NeuN en homogenizados de tejido hipocampal de ratas. Se cuantificaron las bandas entre los 48-46 KDa según indicaciones del fabricante, indicadas con los recuadros en azul. Los datos se presentan como promedio \pm SEM del nivel proteico de NeuN normalizado por el control de carga β -actina. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

7.7. Determinación del estrés oxidativo cerebral de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de etanol

Para determinar la magnitud del estrés oxidativo derivado de la privación y re- acceso al consumo de etanol se evaluó la razón GSSG/GSH en HPC y la concentración de MDA en tejido cerebral como marcadores de estrés oxidativo.

Del ensayo enzimático colorimétrico para determinar la razón hipocampal de GSSG/GSH en el grupo que consumió etanol no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$); sólo se observó una tendencia al aumento en el grupo re-acceso en comparación al grupo control, de forma independiente al tratamiento farmacológico administrado (Figura 35).

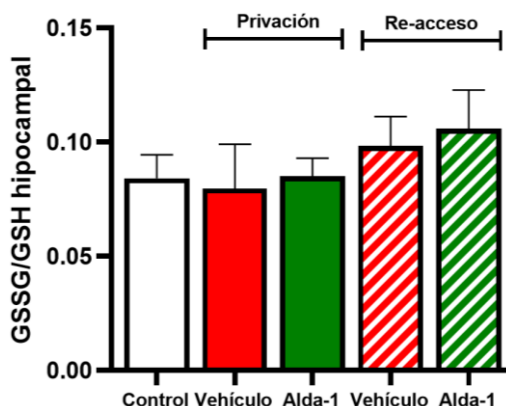


Figura 35. Razón GSSG/GSH en tejido hipocampal de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Razón GSSG/GSH hipocampal de ratas UChB del grupo control (n=8), grupo Privación (n=7 vehículo; n=7 Alda-1) y Re-acceso (n=6 vehículo; n=7 Alda-1). Las barras representan el promedio \pm SEM de la razón GSSG/GSH hipocampal para cada grupo experimental. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

En cuanto a los niveles de MDA en tejido cerebral, se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar los grupos experimentales con el control (Tukey *post hoc*, $p > 0,05$). Sin embargo, se

observó una tendencia al aumento en el grupo sometido a un período de re-acceso al consumo de etanol, independiente de su tratamiento farmacológico, en comparación al grupo control. Por otra parte, se observó una tendencia a la disminución de los niveles de MDA en los grupos tratados con Alda-1 en comparación a los grupos tratados con vehículo en cada subgrupo experimental, privación y re-acceso (**Figura 36**).

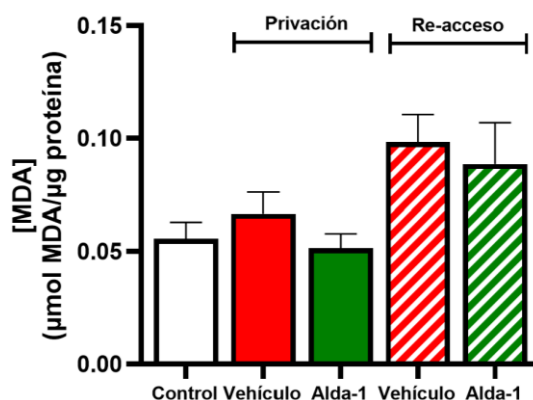


Figura 36. Niveles de MDA cerebrales de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de etanol. Concentración de MDA en tejido cerebral de ratas UChB del grupo control (n=7), grupo Privación (n=7 vehículo; n=7 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=6 vehículo; n=7 Alda-1). Las barras representan el promedio \pm SEM de la concentración de MDA expresada como razón micromoles (μmol) de MDA/ microgramos (μg) de proteína para cada grupo experimental. $p < 0,05$, ANOVA de una vía; $p > 0,05$, Tukey *post hoc*.

7.8. Determinación del estrés oxidativo cerebral de ratas UChB en condiciones de privación y recaída en el consumo de nicotina

De la misma forma que para el grupo que consumió etanol, se evaluó la magnitud del estrés oxidativo derivado de la privación y re-acceso al consumo de nicotina mediante la determinación de la razón GSSG/GSH hipocámpal y la concentración de MDA en tejido cerebral. La razón GSSG/GSH mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados ($p < 0,001$, ANOVA de una vía). Específicamente, se observó una disminución de este marcador en todos los

grupos experimentales en comparación al grupo control ($p < 0,05$, Tukey *post hoc*), con mayor pronunciamiento en el grupo Privación independiente de su tratamiento farmacológico ($p < 0,001$, Tukey *post hoc*) (**Figura 37**).

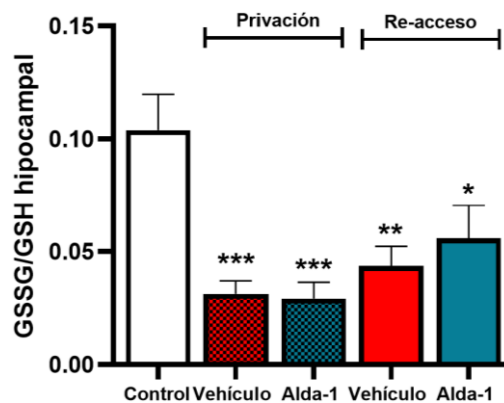


Figura 37. Razón GSSG/GSH en tejido hipocampal de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. Razón GSSG/GSH hipocampal de ratas UChB del grupo control ($n=8$), grupo Privación ($n=7$ vehículo; $n=7$ Alda-1) y Re-acceso ($n=7$ vehículo; $n=6$ Alda-1). Las barras representan el promedio \pm SEM de la razón GSSG/GSH hipocampal para cada grupo experimental. $p < 0,001$, ANOVA de una vía. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Tukey *post hoc*.

En cuanto a los niveles de MDA en tejido cerebral no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados (ANOVA de una vía, $p > 0,05$). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en el grupo sometido a un período de privación del consumo de nicotina, independiente de su tratamiento farmacológico, y en el grupo con re-acceso al consumo de nicotina y tratado con Alda-1 en comparación al grupo control (**Figura 38**).

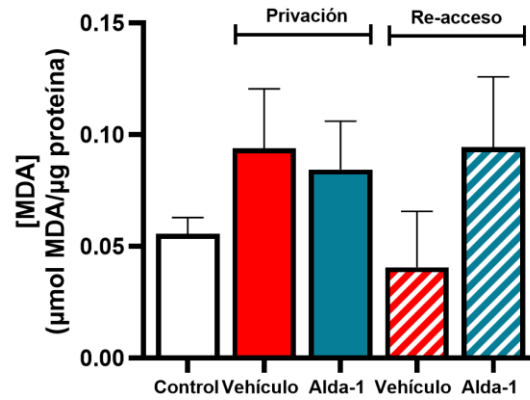


Figura 38. Niveles de MDA cerebrales de ratas UChB expuestas a un período de privación y recaída en el consumo de nicotina. Concentración de MDA en tejido cerebral completo de ratas UChB del grupo control (n=7), grupo Privación (n=6 vehículo; n=6 Alda-1) y grupo Re-acceso (n=6 vehículo; n=6 Alda-1). Las barras representan el promedio \pm SEM de la concentración de MDA expresada como razón micromoles (μmol) de MDA/ microgramos (μg) de proteína para cada grupo experimental. $p > 0,05$, ANOVA de una vía.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que la administración oral de Alda-1 disminuye significativamente (~90%) la recaída en el consumo de etanol, y el consumo crónico (~35%) y recaída (~80%) en el consumo de nicotina en ratas UChB. En ambos casos, la disminución del consumo de estas drogas estuvo asociada a cambios discretos en ciertos marcadores de neuroinflamación en HPC y NAc. Por otra parte, no se observaron cambios significativos los niveles proteicos de NeuN en el HPC. Con respecto a los marcadores de estrés oxidativo, no se observaron cambios significativos en los animales expuestos al consumo de etanol. Sin embargo, en los animales que consumieron nicotina se observó una disminución significativa de la razón GSSG/GSH hipocampal.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la administración de Alda-1 a ratas UChB disminuye en 90% la adquisición del consumo de etanol y en 65% el consumo crónico de etanol (Rivera-Meza y cols., 2019). Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que la administración de Alda-1 disminuye en más del 50% la recaída en el consumo de etanol en ratas UChB durante el primer día de re-acceso en comparación a los controles. Este efecto fue tiempo-dependiente pues, al séptimo día de re-acceso, los animales tratados con Alda-1 consumieron 92,2% menos que el grupo tratado con vehículo (**Figura 12**). Esta disminución del consumo de etanol se acompañó de un aumento en el consumo de agua del grupo tratado con Alda-1 en comparación al grupo vehículo manteniéndose constante la ingesta total de fluidos en ambos grupos (**Figura 14**), indicando que la administración oral de Alda-1 no genera efectos inespecíficos aparentes y sugiriendo una ventaja en el uso de este compuesto por sobre otros tratamientos farmacológicos (Aubin y cols., 2013; Zindel y Kranzler, 2014).

La recaída en el consumo de etanol en modelos animales se evalúa midiendo la cantidad de etanol consumida inmediatamente después de un período de

abstinencia. A este fenómeno se le denomina “efecto de privación de alcohol” o ADE, por su nombre en inglés (*Alcohol Deprivation Effect*), y tiene similitudes con el comportamiento observado en humanos en cuanto al aumento transiente de la cantidad de etanol consumido y la pérdida de control en torno al primer trago consumido luego de un período de abstinencia (Martin-Fardon y Weiss, 2013). El consumo de etanol observado en esta Tesis durante las primeras 24 horas post-privación del grupo vehículo no fue significativamente mayor al consumo basal previo al período de privación (10% más que consumo basal, **Figura 14**), por lo que el ADE observado en estos animales fue discreto. Esta diferencia no significativa en el consumo de etanol post-privación pudo haberse dado por el alto consumo basal de etanol de los animales previo al período de privación (~11 g/Kg/día); se ha reportado que el ADE luego de un período de privación es más intenso (~50% de aumento) en animales con un bajo consumo basal de etanol (<3,0 g/Kg/día) (Sinclair y Tiihonen, 1990; Agabio y cols., 2000; Vangeliene y cols., 2014).

Actualmente existen varios modelos experimentales murinos que permiten el estudio del consumo problemático del etanol. Entre ellos se encuentran ratas seleccionadas genéticamente por su preferencia por el etanol. La importancia de la elección de este tipo de modelo experimental radica en que la predisposición genética al consumo de etanol puede representar más del 50% del riesgo de desarrollar dependencia al consumo de esta sustancia, aspecto que se conjuga con factores ambientales como la exposición prolongada al etanol y la vulnerabilidad ambiental del sujeto (Kendler y cols., 1997; Prescott y Kendler 1999; Ciccocioppo, 2003). En esta categoría de modelo experimental se encuentran las ratas P (*Alcohol-preferring*), ratas HAD (*high alcohol-drinking*) ratas AA (Alko alcohol-preferring), ratas sP (sardinian alcohol-preferring), ratas msP (marchigian sardinian alcohol-preferring) y las ratas UChB (Universidad de Chile Bebedoras), utilizadas en esta Tesis; todos ellos tienen su contraparte no bebedora, con excepción de las ratas msP. Cabe destacar que las ratas UChB fue

el primer modelo experimental en ratas desarrollado para el estudio del alcoholismo, alrededor del año 1950 (Mardones y cols., 1953; Mardones y Segovia-Riquelme, 1984; Quintanilla y cols., 2006).

Estudios en donde se utilizaron ratas UChB como modelo experimental han evaluado el efecto de otros compuestos farmacológicos sobre recaída en el consumo de etanol. Éstos han reportado que la administración de N-acetilcisteína y ácido acetilsalicílico, por separado y en conjunto, disminuyen en 60% y 80% la recaída en el consumo de etanol, respectivamente. Esta disminución del consumo estuvo asociada a una disminución de la reactividad glial y la razón GSSG/GSH hipocampal (Israel y cols., 2019; Quintanilla y cols., 2020). Por otra parte, estudios realizados en este mismo modelo animal han demostrado que el fenofibrato, fármaco utilizado para controlar los niveles de triglicéridos en sangre y potenciador de la actividad enzimática de la catalasa y ADH, disminuye el consumo crónico y recaída en el consumo de etanol mediante una combinación de efectos aversivos periféricos y centrales (Karahanian y cols., 2014; Rivera-Meza y cols., 2017; Muñoz y cols., 2020).

Respecto al mecanismo de acción de Alda-1, es el primer activador farmacológico conocido de la enzima ALDH2 que se une directamente a ella (Perez-Miller y cols., 2010; Beretta y cols., 2010; Belmont-Díaz y cols., 2016; Mittal y cols., 2020), aumentando 3 veces la actividad de ésta en el cerebro (Rivera-Meza y cols., 2019). Esta enzima participa en la segunda etapa del metabolismo del etanol, oxidando el acetaldehído a acetato (Zimatkin y cols., 2006). Se ha postulado que el acetaldehído derivado del metabolismo cerebral del etanol tiene efectos placenteros y reforzantes en el consumo de esta sustancia, pues induce la liberación de dopamina desde el VTA hacia el NAc (McBride y cols., 2002; Deehan y cols., 2013a, Deehan y cols., 2013b).

En modelos murinos de autoadministración se ha demostrado que las concentraciones de acetaldehído y etanol necesarias para la autoadministración

son de 10 μ M y 10 mM respectivamente, es decir 3 órdenes de magnitud de diferencia entre ambos compuestos, demostrando así el que el acetaldehído tiene mayor poder gratificante que el etanol (Rodd y cols., 2005; Israel y cols., 2017). Se ha reportado que la administración de D-penicilamina, un agente secuestrante de acetaldehído, disminuye la autoadministración de etanol y la recaída en el consumo de etanol en rata, sin embargo, es un compuesto altamente tóxico (Orrico y cols., 2013; Peana y cols., 2015). Además, se ha demostrado que la reducción de la producción de acetaldehído por el silenciamiento de la catalasa, mediante la administración de un vector lentiviral en el VTA que codifica para un shRNA, disminuye la recaída en el consumo de etanol en 60% en ratas UChB (Tampier y cols., 2013). El mecanismo por el cual el acetaldehído por sí solo genera los efectos mencionados anteriormente es un área de investigación interesante para esclarecer los mecanismos de adicción al consumo de etanol. Por lo tanto, el mecanismo de acción por el cual Alda-1 estaría disminuyendo el consumo de etanol, podría estar relacionado con la disminución de la concentración de acetaldehído en el cerebro.

El acetaldehído es una molécula altamente reactiva y se ha descrito que reacciona con una gran cantidad de catecolaminas endógenas (Davis y Walsh, 1970; Cohen, 1976). Entre las moléculas con las que puede reaccionar el acetaldehído se encuentran monoaminas como la dopamina, formando alcaloides del tipo tetrahydroisoquinolinas (THIQs) (Cohen, 1976; Deehan y cols., 2013b). Se ha reportado que el salsolinol, una THIQ formada por la condensación de acetaldehído y dopamina (ver Figura 3), induce la liberación de dopamina desde el VTA al NAc y estimula el consumo voluntario de etanol en ratas (Rodd y cols., 2003; Deehan y cols., 2013b; Quintanilla y cols., 2014, 2015). Uno de los mecanismos que se han propuesto por el cual el salsolinol genera su efecto reforzante del consumo de etanol involucra la estimulación de receptores μ -opioides, activando la vía de señalización mediada por proteína G_i -adenilato

ciclasa, resultando en la disminución del tono GABAérgico sobre neuronas dopaminérgicas (Berríos-Cárcamo y cols., 2017; Berríos-Cárcamo y cols., 2019).

En vista de estos antecedentes, se propone que la activación de la ALDH2 por acción de ALDA-1 disminuye: (i) la concentración de acetaldehído cerebral derivado del consumo de etanol, (ii) la formación de salsolinol y (iii) los efectos placenteros asociados al consumo de etanol inducidos por este metabolito, resultando en una disminución del consumo de etanol. A su vez, la disminución de la liberación de dopamina disminuiría la generación de ROS, MDA y la consecuente alteración de la función de GLT-1 ejercida por estas especies, restableciendo la homeostasis del glutamato (ver **Figura 40**).

En cuanto al consumo de nicotina, estudios preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que la administración intraperitoneal de Alda-1 disminuye el consumo crónico de nicotina en ratas UChB de forma dosis-dependiente (datos no publicados). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la administración oral de Alda-1 disminuyó en 35,7% el consumo crónico de nicotina (**Figura 16**) en ratas UChB sin alterar el consumo de agua de los animales (**Figura 17A**). De la misma forma, la administración oral de Alda-1 disminuyó la recaída en el consumo de nicotina en 70% en comparación al grupo vehículo. Este efecto se mantuvo durante el período de re-acceso, mostrando una disminución máxima de 81,8% al séptimo día en comparación al vehículo (**Figura 18**). Esta disminución del consumo se acompañó de un aumento del consumo de agua sin alterar la ingesta total de líquidos de los animales (**Figura 19**).

Estudios recientes en ratas UChB reportan que la administración oral de N-acetilcisteína y ácido acetilsalicílico, por separado y en conjunto, disminuyen el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina, efecto que fue asociado a una disminución de la neuroinflamación y a los marcadores de estrés oxidativo

evaluados (Quintanilla y cols., 2021). Estudios recientes observaron que la 5-bromocitisinga, un compuesto derivado de la citisinga, disminuye el consumo crónico de nicotina sin la tolerancia que muestra la citisinga luego de 10 días de administración en ratas UChB (Quintanilla y cols., 2023). Los autores proponen que esta disminución del consumo podría deberse a una modulación de la liberación de dopamina en los individuos consumidores en estado de abstinencia, debido a que la citisinga es un agonista parcial de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y agonista de los $\alpha 7$ y tendría efectos similares a la nicotina (Coe y cols., 2005; Gotti y Clementi, 2021; Quintanilla y cols., 2023).

Estudios en otros modelos experimentales han evaluado una gran cantidad de compuestos farmacológicos con distintos mecanismos de acción para el consumo problemático de nicotina. Los fármacos con mejor proyección incluyen la citisinga (fármaco ya utilizado en ciertos países de Europa para eliminar el hábito de consumir nicotina), inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa y N-acetilcisteína (Gómez-Coronado y cols., 2017). Estudios han reportado que la administración de galantamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, atenúa la auto-administración de nicotina y el restablecimiento del comportamiento de búsqueda de esta droga en ratas debido a su posible actividad como modulador alostérico de nAChRs que presentan las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, mecanismo similar al de la citisinga (Hopkins y cols., 2012; Ashare y cols., 2013; Jamali, 2021). Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la administración de N-acetilcisteína disminuye el restablecimiento de la búsqueda de nicotina por extinción o inducida por claves externas en ratas, comportamiento asociado al restablecimiento de la expresión de proteínas asociadas a la homeostasis glutamatérgica en el NAc (Ramírez-Niño y cols., 2013; Moro y cols., 2019). Otros estudios proponen que el uso de N-acetilcisteína podría ser viable al ser utilizada en conjunto con fármacos de terapia de primera línea como la vareniclina para ayudar a lograr y mantener la abstinencia: por un lado, la vareniclina podría normalizar el circuito amígdala-estriado responsable de los afectos negativos de la abstinencia, mientras que la

N-acetilcisteína normalizaría el circuito fronto-estriado asociado a la reactividad de las señales asociadas al consumo de drogas (Nall y cols., 2022).

La administración de nicotina en solución en una estrategia para inducir la dependencia a esta sustancia en ratas. Una de las características del tabaquismo son las concentraciones fluctuantes de nicotina en sangre que surgen al consumir cigarrillos fumables en intervalos regulares o irregulares durante el día. Estos niveles oscilantes de nicotina en sangre pueden ser simulados por un régimen de consumo oral de nicotina en solución (Chellian y cols., 2021). Nesil y cols. reportan un consumo promedio de 3-6 mg/Kg de nicotina, en forma de tartrato de nicotina, en ratas que consumen este compuesto de forma oral y voluntaria. Estudios previos en ratas UChB reportan el consumo de nicotina en dosis promedio de 5,6 mg/Kg administrada de forma oral en solución acuosa, mencionando el uso de tartrato de nicotina (Quintanilla y cols., 2019); otros estudios reportan el consumo de nicotina en dosis promedio entre 4,7-8,5 mg/Kg en forma de base libre (Quintanilla y cols., 2018, 2021). La dosis de nicotina en forma de base libre que consumieron en forma oral los animales en esta Tesis fue de 2,3 mg/Kg/día (**Figura 16 y 18**), lo que se consideraría una sub-dosificación en comparación a las dosis reportadas en estudios previos en ratas UChB. *A priori*, los resultados obtenidos en esta Tesis sobre consumo de nicotina servirán para determinar los efectos del consumo de dosis intermedias de esta sustancia en ratas, y podrán ser comparados con otros estudios para determinar si la nicotina tiene efectos diferenciales según la dosis administrada.

Una de las limitaciones que pueden desprenderse de este modelo experimental es, precisamente, la vía de administración de la nicotina, debido a sus variadas limitaciones farmacocinéticas: baja absorción oral, efecto de primer paso hepático importante, rápida metabolización a cotinina (70% de la nicotina es metabolizada a cotinina antes de alcanzar la circulación sistémica), entre otros factores. (Chellian y cols., 2021). Estudios han reportado el uso de cámaras acondicionadas

para la exposición de animales al humo del cigarro (Bocalini y cols., 2020; Shabestari y cols., 2023) obteniendo concentraciones plasmáticas de cotinina similares a las observadas en individuos fumadores (~300 ng/mL) (Ypsilantis y cols., 2012). Sería conveniente que en futuros estudios relacionados al consumo de nicotina y realizados en animales se considere el uso de este tipo de equipamiento, para evaluar los efectos del consumo de nicotina mediante la vía de administración más comparable a la usada en humanos.

De la misma forma que para el etanol, el consumo de nicotina también induce la liberación de dopamina desde el VTA hacia el NAc por acción directa sobre receptores nicotínicos colinérgicos situados en el mesencéfalo (Imperato y cols., 1986; Corrigall y cols., 1992; De Biasi y Dani, 2011; Dani, 2015; Mansvelder y McGehee, 2002). La dopamina puede ser desaminada por acción de la enzima MAO, produciendo el intermediario 3,4-dihidroxifenilacetaldehído conocido como DOPAL. Luego, el DOPAL es metabolizado por la enzima ALDH2 para formar ácido 3,4-dihidroxifenilacético o DOPAC, metabolito más estable que su antecesor aldehído. Es sabido que los aldehídos son compuestos altamente reactivos por sus características estéricas y electrónicas, y se ha descrito que el DOPAL reacciona con dopamina para formar una THIQ conocida como tetrahidropapaverolina (THP) (Eisenhofer y cols., 2004) (ver **Figura 39**).

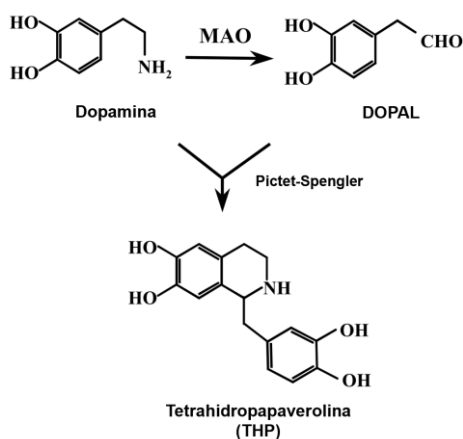


Figura 39. Síntesis de THP.

Al igual que el salsolinol, se ha propuesto que la THP actúa sobre receptores opioides (Fertel y cols, 1980) sugiriendo podría activar el sistema opioidérgico endógeno del organismo (Weitz y cols., 1987; Sango y cols., 2000; Stefano y cols., 2012). Por otra parte, se ha descrito que la autoadministración de salsolinol mediante microinyecciones directas en el NAc de ratas genera conducta reforzante en los animales, efecto que estaría mediado, en parte, por receptores dopaminérgicos (Rodd y cols., 2006), por lo que el THP también podría actuar a nivel de NAc sobre receptores dopaminérgicos tipo D1. Diversos estudios demuestran la participación de la THP en la patogénesis del alcoholismo (Cashaw, 1993; Sango y cols., 2000), lo que también podría aplicarse al consumo problemático de nicotina debido a la base dopaminérgica de la adicción a ambas sustancias.

De la misma forma que para el etanol, la disminución del consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina ejercido por la administración oral de Alda-1 no estuvo asociada a una disminución de los marcadores de neuroinflamación, y mostró disminuir solo un parámetro de los evaluados relacionados al estrés oxidativo evaluados en esta Tesis. Por este motivo y por lo anteriormente expuesto se propone que la activación de la ALDH2 por acción de Alda-1 disminuye la concentración de DOPAL, disminuyendo la producción de THP y los efectos placenteros asociados esta molécula, dando como resultado la disminución del consumo de nicotina (ver **Figura 40**). Así mismo, este fenómeno podría estar dándose en los animales que consumieron etanol.

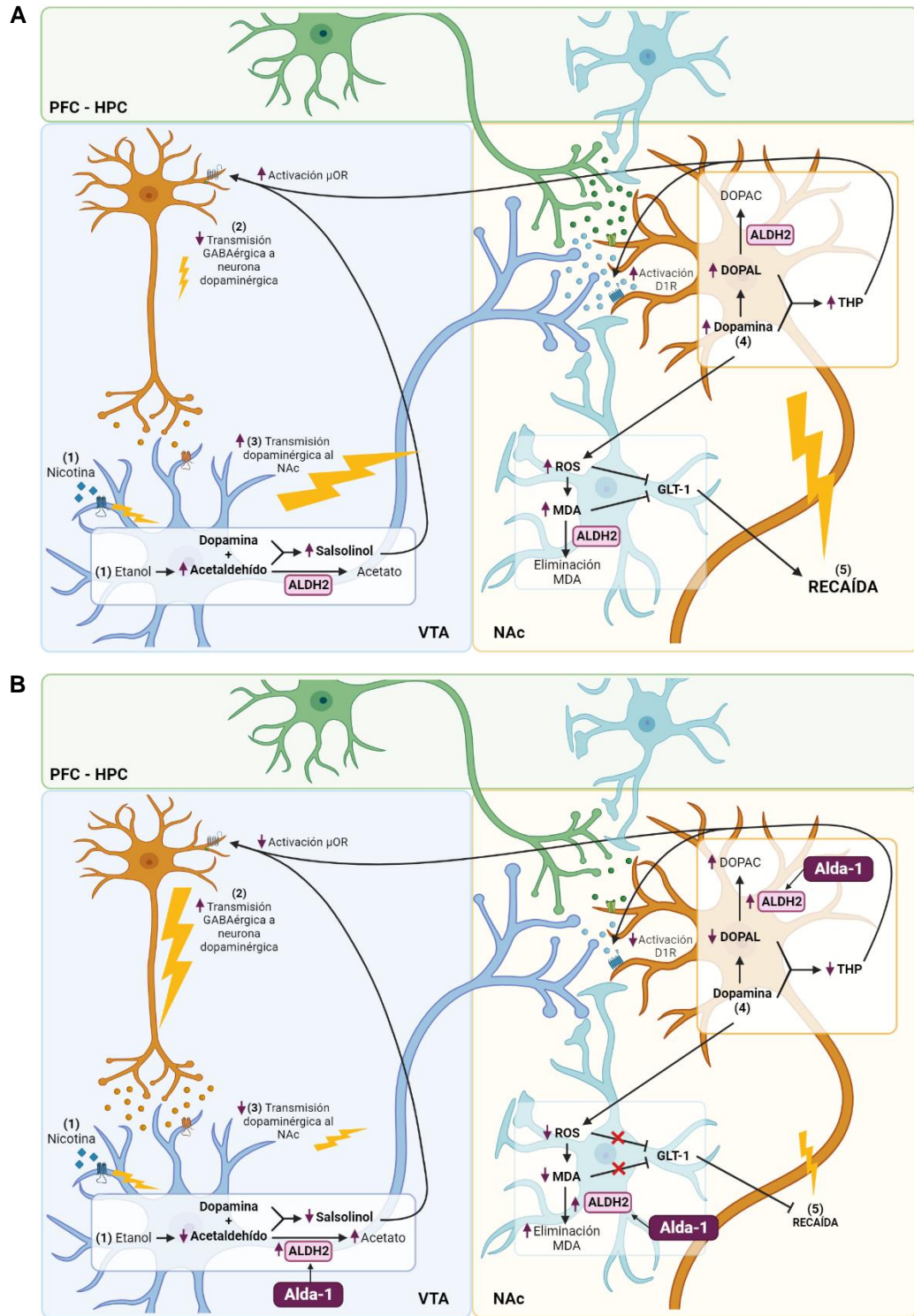


Figura 40. Mecanismo de acción propuesto para Alda-1. (A) El metabolismo del (1) etanol genera acetaldehído, compuesto que reacciona con dopamina produciendo salsolinol (Cohen,

1976; Deehan y cols., 2013b). Éste podría difundir a zonas cercanas y alcanzar receptores μ -opioides presentes en interneuronas del VTA (Berríos-Cárcamo y cols., 2017; Berríos-Cárcamo y cols., 2019), (2) disminuyendo la transmisión GABAérgica hacia neuronas dopaminérgicas del VTA. La inhibición del inhibidor de la neurona dopaminérgica produciría un aumento de la transmisión de dopaminérgica hacia el NAc, generando los efectos placenteros del consumo de etanol e induciendo la recaída en el consumo de etanol (5) (Rodd y cols., 2003; Deehan y cols., 2013b; Quintanilla y cols., 2014, 2015). Además, el metabolismo de la dopamina generaría ROS y MDA, alterando la función de GLT-1 y disminuyendo la recaptación de glutamato desde la sinapsis, aumentando su concentración y generando excitotoxicidad (Trotti y cols., 1998; Dringen y cols., 2000; Townsend y cols., 2003; Prow e Irani, 2008; Das y Vasudevan, 2007; Cuhna y cols., 2013; Ayala y cols., 2014; Amirshahrokhi y Niapour, 2022). Por su parte, la nicotina induce la liberación de dopamina hacia el NAc, la que es metabolizada a DOPAL. Éste compuesto podría reaccionar con la dopamina para formar THP (Eisenhofer y cols., 2004) y activar receptores μ -opioides presentes en interneuronas del VTA (Fertel y cols., 1980; Weitz y cols., 1987; Sango y cols., 2000; Stefano y cols., 2012), activando la cascada de transmisión sináptica y efectos patológicos representados en los puntos 2, 3 y 4. Además, la THP podría activar receptores D1 dopaminérgicos en la misma neurona GABAérgica del NAc (Rodd y cols., 2006) induciendo la recaída en el consumo de nicotina. Los efectos propuestos para THP también podrían estar produciéndose para el consumo de etanol. **(B)** Al activar la enzima ALDH2, Alda-1 podría disminuir la concentración cerebral de acetaldehído, DOPAL y MDA, disminuyendo la formación de salsolinol, THP y la alteración de la función de GLT-1, respectivamente, revirtiendo los efectos descritos en A. Creado con Biorender.com

Numerosos estudios han demostrado que el consumo crónico y recaída en el consumo de etanol o nicotina genera procesos inflamatorios en el cerebro (Israel y cols., 2017; Kohno y cols., 2019). Los mecanismos propuestos para el desarrollo de esta neuroinflamación incluyen la oxidación enzimática de la dopamina liberada por el consumo de estas drogas, la inhibición de la actividad del sistema xCT relacionado a la homeostasis del glutamato en el cerebro, la disfunción mitocondrial derivada del consumo de estas drogas, la activación directa o indirecta de receptores *Toll-like* en el cerebro y la influencia de la inflamación sistémica derivada del consumo de drogas sobre el cerebro (Israel y cols., 2017; Berríos-Cárcamo y cols., 2020). Se ha propuesto que estado pro-inflamatorio a

largo plazo es un factor importante para la vulnerabilidad en la recaída en el consumo de etanol o nicotina (Umhau y cols., 2014; Crews y Vetreno, 2016; Alrouji y cols., 2018; Saravia y cols., 2018). Estudios en ratas UChB reportan que el consumo crónico y recaída en el consumo de etanol o nicotina genera neuroinflamación reflejada en un aumento de la reactividad de microglías y astrocitos en el HPC (Ezquer y cols., 2018; Quintanilla y cols., 2018, 2019, 2021).

En esta Tesis se observaron cambios discretos en la reactividad glial en el HPC y en NAc de los animales expuestos de forma crónica, privadas y re-expuestas al consumo de etanol o nicotina: se observaron cambios significativos en el grosor de los procesos astrocíticos en el HPC y NAc ambos grupos en ciertas condiciones experimentales (**Figura 22, 26 y 30**), y en la densidad de astrocitos y microglías en el NAc de ratas que consumieron etanol en condiciones experimentales específicas (**Figura 27**). Esta diferencia con respecto a la bibliografía podría explicarse por el período de privación del consumo de 14 días al que se sometió a los animales luego de la exposición crónica a ambas sustancias, pues estudios en ratas UChB reportan un marcado aumento de la longitud de procesos y grosor de procesos astrocíticos primarios durante exposiciones agudas o consumo activo de las sustancias (Kim y cols., 2018). Sin embargo, la ausencia de cambios en la morfología de astrocitos observada en esta Tesis debe tomarse con precaución, pues se ha reportado la existencia de astrocitos en el HPC que no son detectados mediante el marcador GFAP utilizado en esta Tesis (Walz y Lang, 1998). Además, se ha descrito un alto potencial heterogéneo en los astrocitos activados a distintos niveles (expresión génica, morfología, señalización y función celular, etc), además de que los cambios estructurales en estas células son regulados por señales intra- e intercelulares con distintos efectos y consecuencias (Guillamón-Vivancos y cols., 2013; Anderson y cols., 2014). Por estos motivos se deben considerar aspectos adicionales a la morfología del astrocito como reflejo de neuroinflamación; la expresión de factores de transcripción STAT3 y NF1A asociados a la regulación de la expresión de GFAP (Bennett y Viaene, 2021)

podría ser de utilidad para determinar la reactividad de este tipo celular en el cerebro. Por otra parte, debido a que la activación de las células microgliales puede generar fenotipos de un amplio espectro, que van desde el M1 citotóxico “pro-inflamatorio” al M2 regenerativo “anti-inflamatorio” (Jurga y cols., 2020), es recomendable incluir en futuros estudios marcadores apropiados para definir el perfil fenotípico de las microglías activadas, como CD68 y/o MHC II, en condiciones de consumo de etanol o nicotina (Jurga y cols., 2020; Bennett y Viaene, 2021).

A modo de indicador de la muerte neuronal que el consumo crónico y recaída en el consumo de etanol o nicotina puedan generar, se evaluó la abundancia relativa de NeuN en el HPC, debido a que, como se mencionó anteriormente, las neuronas son altamente susceptibles al daño por consumo de drogas, alterando funciones cognitivas (Shingo y Kito, 2005; Vetreno y cols., 2011; West y cols., 2021). Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la abundancia relativa de NeuN en el HPC para ninguna de las condiciones experimentales de esta Tesis (**Figura 33 y 34**). Debido a que se utilizó un marcador proteico para la determinación de este parámetro, se podría sugerir el uso de técnicas que evalúen directamente muerte neuronal como inmunofluorescencia contra caspasa-3 clivada, p53, endonucleasa G y/o anexina V, o ensayo TUNEL (Kari y cols., 2022)

Diversos estudios han reportado un aumento del estrés oxidativo cerebral en condiciones de consumo crónico y recaída en el consumo de etanol o nicotina (Das y Vasudevan, 2007; Haorah y cols., 2008; Barr y cols., 2007; Xu y cols., 2019). En esta Tesis se evaluaron los niveles de estrés oxidativo mediante la razón GSSG/GSH en el HPC; no se observaron diferencias significativas en la razón GSSG/GSH hipocámpal en las ratas expuestas de forma crónica al etanol, privadas, y re-expuestas a esta sustancia (**Figura 35**). Sin embargo, se observó una disminución significativa de este parámetro en todos los grupos que consumieron nicotina de forma crónica, privados y re-expuestos a la sustancia,

independientemente de su tratamiento farmacológico (**Figura 37**). Este resultado podría ser atribuido a la sub-dosificación de nicotina consumida los animales; otra posible explicación es que la nicotina funcione como un agente anti-inflamatorio; numerosos estudios postulan que la nicotina funcionaría como agente neurotrófico y protector intracelular, uniéndose a receptores nicotínicos, o extracelular, funcionando como *scavenger* de ciertos agentes deletéreos como el ion ferroso (Kenny y cols., 2000; Newman y cols., 2002). Debido a que la razón GSSG/GSH es un marcador indirecto de los niveles de estrés oxidativo (Rahman y cols., 2007) se sugiere utilizar otras técnicas experimentales que den cuenta del desbalance oxidativo en condiciones de recaída en el consumo de etanol o nicotina como el uso de sondas fluorescentes o quimioluminiscentes (Feitosa y cols., 2018).

Otro parámetro evaluado relacionado a los niveles de estrés oxidativo es el MDA, pues su acumulación es un indicativo de un aumento de la peroxidación lipídica y producción de ROS (Ayala y cols., 2014; Tsikas, 2017; Amirshahrokhi y Niapour, 2022). No se observaron cambios significativos en los niveles de MDA en tejido cerebral en ningún grupo experimental evaluado (**Figura 36 y 38**); solo una tendencia al aumento en el grupo con re-acceso al consumo de etanol luego del período de privación de 14 días, aumento que no fue reestablecido a los valores del control por la administración de Alda-1 (**Figura 36**). Este resultado podría explicarse por el tiempo de tratamiento de Alda-1 al que se sometió a los animales, pues estudios en donde se administró Alda-1 por un mayor período de tiempo (más de 80 días) reportan que previene el aumento de MDA en tejido cerebral de ratas expuestas de forma crónica a etanol (Joshi y cols., 2019).

9. CONCLUSIONES

- La administración oral de Alda-1 disminuye significativamente la recaída en el consumo de etanol, y el consumo crónico y la recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB sin efectos inespecíficos en el consumo de fluidos y alimento.
- Esta disminución del consumo de etanol o nicotina estuvo asociada a cambios discretos en los marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo cerebral.
- Alda-1 podría estar reduciendo la recaída en el consumo de etanol al disminuir la concentración cerebral de acetaldehído, atenuando los efectos gratificantes del consumo de etanol mediados por este metabolito. Esto, por otra parte, reduciría la formación de salsolinol, compuesto asociado a los efectos placenteros del consumo de etanol.
- Alda-1 podría estar reduciendo el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina al disminuir la concentración de DOPAL y, en consecuencia, la formación de THP, compuesto que podría estar contribuyendo a los efectos placenteros del consumo nicotina. Este fenómeno también podría estar dándose para consumo de etanol.
- En conclusión, Alda-1 reduce notoriamente la recaída en el consumo de etanol y el consumo crónico y recaída en el consumo de nicotina en ratas UChB por un mecanismo distinto al sugerido en la premisa de esta Tesis, por lo que la hipótesis es rechazada.
- Se sugiere la realización de nuevos estudios para evaluar el posible mecanismo de acción de Alda-1, que involucraría el clearance de metabolitos aldehídicos asociados a los efectos placenteros y gratificantes del consumo de etanol o nicotina.

10. REFERENCIAS

Adell, A & Artigas, F (2004). *The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems*. *Neurosci Biobehav Rev* 28:415–431.

Agabio, R, Carai, MAM, Lobina, C, Pania, M, Reali, R, Vacca, G, Gessa, GL & Colombo, G (2000). *Development of short-lasting alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring rats*. *Alcohol* 21:59-62.

Alrouji, M, Manouchehrinia, A, Gran, B & Constantinescu, CS (2018). *Effects of cigarette smoke on immunity, neuroinflammation and multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol* 329:24-34.

Amirshahrokhi, K & Niapour, A (2022). *Carvedilol attenuates brain damage in mice with hepatic encephalopathy*. *Int Immunopharmacol* 111:109119.

Anderson, MA, Ao, Y & Sofroniew, MV (2014). *Heterogeneity of reactive astrocytes*. *Neurosci Lett* 0:23–29.

Ashare, RL, Kimmey, BA, Rupprecht, LE, Bowers, ME, Hayes, MR & Schmidt, HD (2013). *Repeated administration of an acetylcholinesterase inhibitor attenuates nicotine taking in rats and smoking behavior in human smokers*. *Transl Psychiatry* 6:e713.

Aubin, H, Luquiens, A & Berlin, I (2013). *Pharmacotherapy for smoking cessation: pharmacological principles and clinical practice*. *Br J Clin Pharmacol* 77(2):324-36.

Ayala, A, Muñoz, MF & Argüelles, S (2014). *Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal*. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438.

Barr, J, Sharma, CS, Sarkar, S, Wise, K, Dong, L, Periyakaruppan, A & Ramesh, GT (2007). *Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear*

transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. Mol Cell Biochem 297(1-2):93-9.

Belmont-Díaz, J, Yoval-Sánchez, B, Calleja-Castañeda, F, Pardo, JP & Rodríguez-Zavala, JS (2016). *Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2).* FEBS J 283(19):3637-3650.

Bennett, M & Viaene, A (2021). *What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration?.* Neurobiol Dis 148:105172.

Beretta, M, Gorren, ACF, Wenz, MV, Weis, R, Russwurm, M, Koesling, D, Schmidt, K & Mayer, B (2010). *Characterization of the East Asian Variant of Aldehyde Dehydrogenase-2: Bioactivation of Nitroglycerin and Effects of Alda-1.* J Biol Chem 285(2):943-52.

Berríos-Cárcamo, P, Quezada, M, Quintanilla, ME, Morales, P, Ezquer, M, Herrera-Marschitz, M, Israel, Y & Ezquer, F (2020). *Oxidative Stress and Neuroinflammation as a Pivot in Drug Abuse. A Focus on the Therapeutic Potential of Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents and Biomolecules.* Antioxidants (Basel) 9:E830.

Berríos-Cárcamo, P, Quintanilla, ME, Herrera-Marschitz, M, Vasiliou, V, Zapata-Torres, G & Rivera-Meza, M (2017). *Racemic Salsolinol and its Enantiomers Act as Agonists of the μ -Opioid Receptor by Activating the G_i Protein-Adenylate Cyclase Pathway.* Front Behav Neurosci 10:253.

Berríos-Cárcamo, P, Rivera-Meza, M, Herrera-Marschitz, M & Zapata-Torres, G (2019). *Molecular modeling of salsolinol, a full G_i protein agonist of the μ -opioid receptor, within the receptor binding site.* Chem Biol Drug Des 94:1467–1477.

Bhagwat, SV, Vijayasathy, C, Raza, H, Mullick, J & Avadhani, NG (1998). *Preferential Effects of Nicotine and 4-(N-Methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-*

butanone on Mitochondrial Glutathione S-Transferase A4-4 Induction and Increased Oxidative Stress in the Rat Brain. Biochem Pharmacol 56(7):831-9.

Blanc, EM, Keller, JN, Fernandez, S & Mattson, MP (1998). *4-Hydroxynonenal, a Lipid Peroxidation Product, Impairs Glutamate Transport in Cortical Astrocytes.* Glia 22:149–160.

Blanco, AM & Guerri, C (2007). *Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL1RI receptors.* Front Biosci 12:2616-30.

Bocalini, DS, da Silva Luiz, R, Silva, K, Serra, AJ, Avila, R, Leopoldo, AS, Lima-Leopoldo, AP, da Cunha, M, Tucci, P & dos Santos, L (2020). *Short-Term Cigarette Smoking in Rats Impairs Physical Capacity and Induces Cardiac Remodeling.* BioMed Research International 2020:2589892.

Breitzig, M, Bhimineni, C, Lockey, R & Kolliputi, N (2016). *4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress?.* Am J Physiol Cell Physiol 311: C537–C543.

Breslau, N (1995). *Psychiatric Comorbidity of Smoking and Nicotine Dependence.* Behav Genet 25(2):95-101.

Cashaw, JL (1993). *Tetrahydropapaveroline in brain regions of rats after acute ethanol administration.* Alcohol 10(2):133-138.

Chellian, R, Behnood-Rod, A, Bruijnzeel, DM, Wilson, R, Pandey, W & Bruijnzeel, AW (2021). *Rodent models for nicotine withdrawal.* Journal of Psychopharmacology 1:1-19.

Chen, C, Budas, GR, Churchill, EN, Disatnik, M, Hurley, TD, Mochly-Rosen, D (2008). *Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart.* Science 321(5895):1493-5.

Ciccocioppo, R (2013). *Genetically Selected Alcohol Preferring Rats to Model Human Alcoholism.* Curr Topics Behav Neurosci 13: 251–269.

Coe, JW, Brooks, PR, Vetelino, MG, Wirtz, MC, Arnold, EP, Huang, J, Sands, SB, Davis, TI, Lebel, LA, Fox, CB, Shrikhande, A, Heym, JH, Schaeffer, E, Rollema, H, Lu, Y, Mansbach, RS, Chambers, LK, Rovetti, CC, Schulz, DW, Tingley, FD & O'Neill, BT (2005). *Varenicline: An $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor Partial Agonist for Smoking Cessation*. *J Med Chem* 48:3474-3477.

Cohen, G (1976). *Alkaloid products in the metabolism of alcohol and biogenic amines*. *Biochem Pharmacol* 25:1123–1128.

Corrigall, WA, Franklin, KB, Coen, KM & Clarke, PB (1992). *The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine*. *Psychopharmacology (Berl)* 107(2-3):285-9.

Corrigall, WA & Coen, KM (1991). *Selective dopamine antagonists reduce nicotine self-administration*. *Psychopharmacology* 104:171-176.

Crews, FT & Vetreno, RP (2016). *Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism*. *Psychopharmacology (Berl)* 233(9):1543-57.

Dani, J (2015). *Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine*. *Int Rev Neurobiol* 124:3–19.

Das, SB & Vasudevan, DM (2007). *Alcohol-induced oxidative stress*. *Life Sci* 81(3):177-87.

Davis, VE & Walsh, MJ (1970). *Alcohol, amines, and alkaloids: a possible biochemical basis for alcohol addiction*. *Science* 167:1005–1007.

De Biasi, M & Dani, J (2011). *Reward, Addiction, Withdrawal to Nicotine*. *Annu Rev Neurosci* 34:105-30.

De la Monte, SM & Kril, JJ (2014). *Human alcohol-related neuropathology*. *Acta Neuropathol* 127(1):71-90.

Deehan, GA, Brodie, MS & Rodd, ZA (2013a). *What's in that Drink: The Biological Actions of Ethanol, Acetaldehyde, and Salsolinol*. *Curr Top Behav Neurosci* 13:163–184.

Deehan, G, Engleman, E, Ding, Z, McBride, W & Rodd, Z (2013b). *Microinjections of acetaldehyde or salsolinol into the posterior ventral tegmental area increase dopamine release in the nucleus accumbens shell*. *Alcohol Clin Exp Res* 37(5):722– 729.

Dhanabalan, G, Le Maître, TW, Bogdanovic, N, Alkass, K & Druid, H (2018). *Hippocampal granule cell loss in human chronic alcohol abusers*. *Neurobiol Dis* 120:63-75.

DiChiara, G & Imperato, A (1988). *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274-5278.

DiFranza, J & Guerrera, M (1990). *Alcoholism and Smoking*. *J Stud Alcohol* 51(2):130-5.

Dringen, R, Gutterer, JM & Hirrlinger, J (2000). *Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. *Eur J Biochem* 267:4912-4916.

Drobes, D (1995). *Concurrent Alcohol and Tobacco Dependence. Mechanism and Treatment*. *Alcohol Res Health* 26(2): 136– 142.

Eisenhofer, G, Kopin, IJ & Goldstein, DS (2004). *Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine*. *Pharmacol Rev* 56:331–349.

Erickson, EK, Grantham, EK, Warden, AS & Harris, RA (2019). *Neuroimmune signaling in alcohol use disorder*. *Pharmacol Biochem Behav* 177:34-60.

- Ezquer, F, Morales, P, Quintanilla, ME, Santapau, D Lespay-Rebolledo, C, Ezquer, M, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2018a).** *Intravenous administration of anti-inflammatory mesenchymal stem cell spheroids reduces chronic alcohol intake and abolishes binge-drinking.* Sci Rep 8(1):4325.
- Feitosa, CM, Oliveira, G, Cavalcante, A, Chaves, S & Rai, M (2018).** *Determination of Parameters of Oxidative Stress in vitro Models of Neurodegenerative Diseases - A Review.* Curr Clin Pharmacol 13(2):100-109.
- Fertel, RH, Greenwald, JE, Schwarz, R, Wong, L & Bianchine, J (1980).** *Opiate receptor binding and analgesic effects of the tetrahydroisoquinolines salsolinol and tetrahydropapaveroline.* Res Commun Chem Pathol Pharmacol 27(1):3-16.
- Fischer, R & Maier, O (2015).** *Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF.* Oxid Med Cell Longev 2015:610813.
- Ford, CP, Gantz, SC, Phillips, P & Williams, JT (2010).** *Control of Extracellular Dopamine at Dendrite and Axon Terminals.* J Neurosci 30(20):6975–6983.
- Forman, HJ, Zhang, H & Rinna, A (2009).** *Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.* Mol Aspects Med 30(1-2): 1–12.
- Fu, S, Zhang, H, Yang, Z, Li, T, Liu, B, Lou, Z, Ma, Q, Luo, X & Peng, J (2014).** *Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 387(1):87-94.
- Gómez-Coronado, N, Walker, AJ, Berk, M & Dodd, S (2021).** *Current and Emerging Pharmacotherapies for Cessation of Tobacco Smoking.* Pharmacotherapy 38(2):235-258.
- Gotti, C & Clementi, F (2021).** *Cytisine and cytisine derivatives. More than smoking cessation aids.* Pharmacological Research 170:105700.
- Griffin, WC, Haun, HL, Hazelbaker, CL, Ramachandra, VS & Becker, HC (2014).** *Increased Extracellular Glutamate In the Nucleus Accumbens Promotes*

Excessive Ethanol Drinking in Ethanol Dependent Mice. Neuropsychopharmacology 39(3):707-17.

Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo, U & Matías-Guiu, J (2013). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. Neurología 30(2):119-129.

Gusel'nikova, VV & Korzhevskiy, DE (2015). *NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker.* Acta Naturae 7(2):25.

Haorah, J, Ramirez, SH, Floreani, N, Gorantla, S, Morsey, B & Persidsky, Y (2008). *Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury.* Free Radic Biol Med 45(11):1542–1550.

Harper, C & Kril, J (1989). *Patterns of neuronal loss in the cerebral cortex in chronic alcoholic patients.* J Neurol Sci 92(1):81-9.

Heishman, SJ, Kleykamp, BA & Singleton, EG (2010). *Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance.* Psychopharmacology (Berl) 210(4):453-69.

Hopkins, TJ, Rupprecht, LE, Hayes, MR, Blendy, JA & Schmidt, HD (2012). *Galantamine, an Acetylcholinesterase Inhibitor and Positive Allosteric Modulator of Nicotinic Acetylcholine Receptors, Attenuates Nicotine Taking and Seeking in Rats.* Neuropsychopharmacology 37:2310–2321.

Hughes, JR, Rennard, SI, Fingar, JR, Talbot, SK, Callas, PW & Fagerstrom, KO (2011). *Efficacy of Varenicline to Prompt Quit Attempts in Smokers Not Currently Trying to Quit: A Randomized Placebo-Controlled Trial.* Nicotine Tob Res 13(10):955-64.

Imperato, A, Mulas, A & Di Chiara, G (1986). *Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats.* Eur J Pharmacol 132(2-3):337-8.

Israel, Y, Karahanian, E, Ezquer, F, Morales, P, Ezquer, M, Rivera-Meza, M, Herrera-Marschitz, M & Quintanilla, ME (2017). *Acquisition, Maintenance and Relapse-Like Alcohol Drinking: Lessons from the UChB Rat Line*. *Front Behav Neurosci* 11:57.

Israel, Y, Quintanilla, ME, Ezquer, F, Morales, P, Santapau, D, Berríos-Cárcamo, P, Ezquer, M, Olivares, B & Herrera-Marschitz, M (2019). *Aspirin and N-acetylcysteine co-administration markedly inhibit chronic ethanol intake and block relapse binge drinking: Role of neuroinflammation-oxidative stress self-perpetuation*. *Addiction Biology* 26:e12853.

Jacque, CM, Vinner, C, Kujas, M, Raoul, M, Racadot, J & Baumann, NA (1978). *Determination Of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) In Human Brain Tumors*. *J Neurol Sci* 35(1):147-55.

Jamali, Q (2021). *Galantamine as a Treatment Option for Nicotine Addiction*. *Journal of Smoking Cessation* 2021: 9975811.

Jin, S, Pang, W, Zhao, L, Zhao, Z & Mei, S (2021). *Review of HPLC–MS methods for the analysis of nicotine and its active metabolite cotinine in various biological matrices*. *Biomedical Chromatography* 36:e5351.

Joshi, AU, Van Wassenhove, LD, Logas, KR, Minhas, PS, Andreasson, KI, Weinberg, KI, Chen, C & Mochly-Rosen, D (2019). *Aldehyde dehydrogenase 2 activity and aldehydic load contribute to neuroinflammation and Alzheimer's disease-related pathology*. *Acta Neuropathol Commun* 7:190.

Jurga, AM, Paleczna, M & Kuter, KZ (2020). *Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes*. *Front Cell Neurosci* 14:198.

Kalivas, PW (2009). *The glutamate homeostasis hypothesis of addiction*. *Nat Rev Neurosci* 10(8):561-72.

- Karahanian, E, Quintanilla, ME, Fernandez, K & Israel, Y (2014).** *Fenofibrate - A lipid-lowering drug - Reduces voluntary alcohol drinking in rats.* Alcohol 48:665-670.
- Karahanian, E, Rivera-Meza, M, Tampier, L, Quintanilla, ME, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2015).** *Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats.* Addict Biol 20(2):336-44.
- Kari, S, Subramanian, K, Altomonte, IA, Murugesan, A, Yli-Harja, O & Kandhavelu, M (2022).** *Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison.* Apoptosis 27:482–508.
- Kendler, KS, Prescott, CA, Neale, MC & Pedersen, NL (1997).** *Temperance board registration for alcohol abuse in a national sample of Swedish male twins, born 1902–1949.* Arch Gen Psychiatry 54:178–184.
- Kenny, PJ, File, SE & Rattray, M (2000).** *Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus.* Molecular Brain Research 85:234–238.
- Kim, C, Hwang, S, Choi, HJ, Lom TH & Kang, J (2018).** *The Effect of Aldehyde Dehydrogenase Activator, Alda-1®, on the Ethanol-induced Brain Damage in a Rat of Binge Ethanol Intoxication.* bioRxiv <https://doi.org/10.1101/353854>
- Kohno, M, Link, J, Dennis, LE, McCready, H, Huckans, M, Hoffman, WF & Loftis, JM (2019).** *Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies.* Pharmacol Biochem Behav 179: 34–42.
- Legault, M & Wise, RA (1999).** *Injections of N-methyl-D-aspartate into the ventral hippocampus increase extracellular dopamine in the ventral tegmental area and nucleus accumbens.* Synapse 31(4):241-9.

- Mandyam, CD** (2013). *The interplay between the hippocampus and amygdala in regulating aberrant hippocampal neurogenesis during protracted abstinence from alcohol dependence*. *Front Psychiatry* 4:61.
- Mansvelder, H & McGehee, D** (2002). *Cellular and Synaptic Mechanisms of Nicotine Addiction*. *J Neurobiol* 53(4):606-17.
- Maragakis, NJ & Rothstein, JD** (2001). *Glutamate transporters in neurologic disease*. *Arch Neurol* 58(3):365-70.
- Mardones, J & Segovia-Riquelme, N** (1984). *Effects of different diets on voluntary consumption of ethanol in UChA and UChB rats*. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 34:25–30.
- Mardones, J, Segovia, N & Hederra, A** (1953). *Heredity of experimental alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity*. *Q J Stud Alcohol* 14:1–2.
- Martin-Fardon, R & Weiss, F** (2013). *Modeling relapse in animals*. *Curr Top Behav Neurosci* 13:403-32.
- McBride, W, Li, T, Deitrich, R, Zimatkin, S, Smith, B & Rodd-Henricks, Z** (2002). *Involvement of Acetaldehyde in Alcohol Addiction*. *Alcohol Clin Exp Res* 26(1):114-9.
- McCorkindale, AN, Sheedy, D, Kril, JJ & Sutherland, GT** (2016). *The effects of chronic smoking on the pathology of alcohol-related brain damage*. *Alcohol* 53:35-44.
- Meister, A** (1992). *Biosynthesis and Functions of Glutathione, an Essential Biofactor*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No*:1-6.
- Melendez, RI, Hicks, MP, Cagle, SS & Kalivas, PW** (2005). *Ethanol Exposure Decreases Glutamate Uptake in the Nucleus Accumbens*. *Alcohol Clin Exp Res* 29(3):326-33.

- Mittal, M, Bhagwati, S, Siddiqi, MI & Chattopadhyay, N** (2020). *A critical assessment of the potential of pharmacological modulation of aldehyde dehydrogenases to treat the diseases of bone loss*. Eur J Pharmacol 886:173541.
- Mira, RG, Lira, M, Tapia-Rojas, C, Rebolledo, DL, Quintanilla, RA & Cerpa, W** (2020). *Effect of Alcohol on Hippocampal-Dependent Plasticity and Behavior: Role of Glutamatergic Synaptic Transmission*. Front Behav Neurosci 13:288.
- Moro, M, Giannotti, G, Caffino, L, Marzo, CM, Di Clemente, A, Fumagalli, F & Cervo, L** (2019). *Lasting reduction of nicotine-seeking behavior by chronic N-acetylcysteine during experimental cue-exposure therapy*. Addiction Biology 25:e12771.
- Mullen, RJ, Buck, CR & Smith, AM** (1992). *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development 116:201-211.
- Muñoz, D, Rivera-Meza, M, Flores-Bastías, O, Quintanilla, ME & Karahanian, E** (2020). *Fenofibrate -a PPAR α agonist- increases alcohol dehydrogenase levels in the liver: implications for its possible use as an ethanol-aversive drug*. Adicciones 32(3):208-215.
- Mukherjee, S, Tarale, P & Sarkar, DK** (2023). *Neuroimmune Interactions in Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Potential Therapeutic Targets and Intervention Strategies*. Cells 12:2323.
- Nall, RW, Beloate, LN, Meyerink, ME, Penaloza, T, Doolittle, J, Froeliger, B, Kalivas, PW & Garcia-Keller, C** (2022). *Assessing combined effects of varenicline and N-acetylcysteine on reducing nicotine seeking in rats*. Addiction Biology 27:e13151.
- Newman, MB, Arendash, GW, Shytle, RD, Bickford, PC, Tighe, T & Sanberg, PR** (2002). *Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS*. Life Sciences 71:2807–2820.

NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism) (2015) Tratamiento del alcoholismo: Cómo buscar y obtener ayuda. Bethesda, Estados Unidos, National Institute of Health (NIH).

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018) *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*. Génova, Suiza. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

OMS (2019) Tabaco [en línea]. <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>> [Consulta: 25-02-2021].

OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2015) Informe sobre la Situación Regional sobre Alcohol y Salud en las Américas 2015. Washington DC, Estados Unidos. ISBN 978-92-75-31855-3.

Orrico, A, Hipólito, L, Sánchez-Catalán, MJ, Martí-Prats, L, Zornoza, T, Granero, L & Polache, A (2013). *Efficacy of D-penicillamine, a sequestering acetaldehyde agent, in the prevention of alcohol relapse-like drinking in rats*. *Psychopharmacology* 228:563–575.

Peana, AT, Porcheddu, V, Bennardini, F, Carta, A, Rosas, M & Acquas, E (2015). *Role of ethanol-derived acetaldehyde in operant oral self-administration of ethanol in rats*. *Psychopharmacology (Berl)* 232(23):4269-76.

Perez-Miller, S, Younus, H, Vanam, R, Chen, C, Mochly-Rosen, D & Hurley, TD (2010). *Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant*. *Nat Struct Mol Biol* 17(2):159–164.

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

Prow, NA & Irani, DN (2008). *The Inflammatory Cytokine, Interleukin-1 Beta, Mediates Loss of Astroglial Glutamate Transport and Drives Excitotoxic Motor*

Neuron Injury in the Spinal Cord During Acute Viral Encephalomyelitis. J Neurochem 105(4):1276–1286.

PUC (Pontificia Universidad Católica de Chile)-SEDA (2018) Estudio del Costo Económico y Social del Consumo de Alcohol en Chile – Actualización del Informe Final. Santiago, Chile.

Qrunfleh, AM, Alazizi, A & Sari, Y (2013). *Ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic, attenuates relapse-like ethanol-drinking behavior in alcohol-preferring rats.* J Psychopharmacol 27(6):541–549.

Quintanilla, ME, Ezquer, F, Morales, P, Ezquer, M, Olivares, B, Santapau, D, Herrera-Marschitz & Israel, Y (2020). *N-Acetylcysteine and Acetylsalicylic Acid Inhibit Alcohol Consumption by Different Mechanisms: Combined Protection.* Front Behav Neurosci 14:122.

Quintanilla, ME, Ezquer, F, Morales, P, Santapau, D, Berríos-Cárcamo, P, Ezquer, M, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2019). *Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: mechanism and translational options.* Stem Cell Res Ther 10(1):205.

Quintanilla, ME, Israel, Y, Sapag, A & Tampier, L (2006). *The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake.* Addict Biol 11:310–323.

Quintanilla, ME, Morales, P, Ezquer, F, Ezquer, M, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2021). *Administration of N-acetylcysteine Plus Acetylsalicylic Acid Markedly Inhibits Nicotine Reinstatement Following Chronic Oral Nicotine Intake in Female Rats.* Front Behav Neurosci 14:617418.

Quintanilla, ME, Morales, P, Ezquer, F, Ezquer, M, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2018). *Commonality of Ethanol and Nicotine Reinforcement and Relapse*

in Wistar-Derived UChB Rats: Inhibition by N-Acetylcysteine. Alcohol Clin Exp Res 42(10):1988-1999.

Quintanilla, ME, Rivera-Meza, M, Berrios-Cárcamo, P, Bustamante, D, Buscaglia, M, Morales, P, Karahanian, E, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2014). *Salsolinol, free of isosalsolinol, exerts ethanol-like motivational/sensitization effects leading to increases in ethanol intake.* Alcohol 48(6):551-559.

Quintanilla, ME, Rivera-Meza, M, Berríos-Cárcamo, P & Cassels, BK (2023). *Reduction of nicotine and ethanol intake in alcohol-preferring (UChB) female rats by the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonists 5-bromocytisine and cytisine.* Drug Alcohol Depend 250:110900.

Quintanilla, ME, Rivera-Meza, M, Berríos-Cárcamo, P, Cassels, BK, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2015). *(R)-Salsolinol, a product of ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake.* Addiction Biology 21:1063–1071.

Quintanilla, ME, Rivera-Meza, M, Berríos-Cárcamo, P, Salinas-Luypaert, C, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2016). *Beyond the “First Hit”: Marked Inhibition by N-Acetyl Cysteine of Chronic Ethanol Intake But Not of Early Ethanol Intake. Parallel Effects on Ethanol-Induced Saccharin Motivation.* Alcohol Clin Exp Res 40(5):1044-51.

Rahman, I, Kode, A & Biswas, SK (2007). *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method.* Nat Protoc 1(6):3159-65.

Ramana, KV, Bhatnagar, A, Srivastava, S, Yadav, UC, Awasthi, S, Awasthi, YC & Srivastava, SK (2006). *Mitogenic Responses of Vascular Smooth Muscle Cells to Lipid Peroxidation-derived Aldehyde 4-Hydroxy-trans-2-nonenal (HNE):*

Role of Aldose Reductase-Catalyzed Reduction of the HNE-Glutathione Conjugates in Regulating Cell Growth. J Biol Chem 281(26):17652-60.

Ramirez-Niño, AM, D'Souza, MS, & Markou, A (2013). *N-acetylcysteine decreased nicotine self-administration and cue-induced reinstatement of nicotine seeking in rats: Comparison with the effects of N-acetylcysteine on food responding and food seeking.* Psychopharmacology (Berl) 225(2):473–482.

Reid, MS, Fox, L, Ho, LB & Berger, SP (2000). *Nicotine Stimulation of Extracellular Glutamate Levels in the Nucleus Accumbens: Neuropharmacological Characterization.* Synapse 35(2):129-36.

Reith, M, Li, M & Yan, Q (1997). *Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers.* Psychopharmacology 134:309–317.

Reynolds, IJ & Hastings, TG (1995). *Glutamate Induces the Production of Reactive Oxygen Species in Cultured Forebrain Neurons Following NMDA Receptor Activation.* J Neurosci 15(5 Pt 1):3318-27.

Rivera-Meza, M, Vásquez, D, Quintanilla, ME, Lagos, D, Rojas, B, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2019). *Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and maintenance of ethanol intake in rats: A dual mechanism?.* Neuropharmacology 146:175-183.

Rivera-Meza, M, Muñoz, D, Jerez, E, Quintanilla, ME, Salinas-Luypaert, C, Fernandez, K & Karahanian, E (2017). *Fenofibrate Administration Reduces Alcohol and Saccharin Intake in Rats: Possible Effects at Peripheral and Central Levels.* Front Behav Neurosci 11:133.

Rodd, ZA, Bell, RL, Zhang, Y, Goldstein, A, Zaffaroni, A, McBride, WJ & Li, T (2003). *Salsolinol produces reinforcing effects in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring (P) rats*. *Alcohol Clin Exp Res* 27(3):440-9.

Rodd, ZA, Bell, RL, Zhang, Y, Murphy, JM, Goldstein, A, Zaffaroni, A, Li, T & McBride, WJ (2005). *Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin*. *Neuropsychopharmacology* 30:330–338.

Rossetti, ZL & Carboni, S (1995). *Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum*. *Eur J Pharmacol* 283(1-3):177-83.

Sango, K, Maruyama, W, Matsubara, K, Dostert, P, Minami, C, Kawai, M & Naoi, M (2000). *Enantio-selective occurrence of (S)-tetrahydropapaveroline in human brain*. *Neurosci Lett* 283(3):224-226.

Saravia, R, Ten-Blanco, M, Grande, MT, Maldonado, R & Berrendero, F (2018). *Anti-inflammatory agents for smoking cessation? Focus on cognitive deficits associated with nicotine withdrawal in male mice*. *Brain Behav Immun* 75:228-239.

SENDA (Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol) (2018) *Décimo Tercer Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile 2018*. Santiago, Chile: Observatorio Chileno de Drogas, ISBN: 978-956-9141-64-5.

Sesack, SR & Grace, AA (2010). *Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry*. *Neuropsychopharmacology* 35(1):27-47.

Shabestari, A, Zadeh, S, Zahmatkesh, P, Baghdadabad, L, Mirzaei, A, Mashhadi, R, Mesbah, G, Khajavi, A, Akbarzadehmoallemkolaei, M, Khoshchereh, M, Rahimnia, R & Aghamir, S (2023). *The impact of*

conventional smoking versus electronic cigarette on the expression of VEGF, PEMPA1, and PTEN in rat prostate. Prostate International 11:76-82.

Shingo, AS & Kito, S (2005). *Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons.* J Neural Transm (Vienna) 112(11):1475-8.

Shoeb, M, Ansari, NH, Srivastava, SK & Ramana, KV (2014). *4-hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases.* Curr Med Chem 21(2):230–237.

Sinclair, JD & Tiihonen, K (1988). *Lack of Alcohol-Deprivation Effect in AA Rats.* Alcohol 5:85-87.

Singh, IN, Gilmer, LK, Miller, DM, Cebak, JE, Wang, JA & Hall, ED (2013). *Phenelzine mitochondrial functional preservation and neuroprotection after traumatic brain injury related to scavenging of the lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal.* J Cereb Blood Flow Metab 33(4):593-9.

Skuja, S, Groma, V & Smane, L (2012). *Alcoholism and cellular vulnerability in different brain regions.* Ultrastruct Pathol 36(1):40-7.

Stefano, GB, Ptáček, R, Kuželová, H & Kream, RM (2012). *Endogenous Morphine: Up-to-Date Review 2011.* Folia Biologica (Praha) 58:49-56.

Steinberg, ML, Lu, S & Williams, JM (2018). *Varenicline for smoking reduction in smokers not yet ready to quit: A double-blind, proof-of-concept randomized clinical trial.* Addict Behav 84:20-26.

Tampier, L, Quintanilla, ME, Karahanian, E, Rivera-Meza, M, Herrera-Marschitz, M & Israel, Y (2013). *The Alcohol Deprivation Effect: Marked Inhibition by Anticatalase Gene Administration into the Ventral Tegmental Area in Rats.* Alcohol Clin Exp Res 37(8):1278–1285.

- Tobiansky, DJ, Wallin-Miller, KG, Floresco, SB, Wood, RI & Soma, KK** (2018). *Androgen Regulation of the Mesocorticolimbic System and Executive Function*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:279.
- Townsend, DM, Tew, KD & Tapiero, H** (2003). *The importance of glutathione in human disease*. *Biomed Pharmacother* 57(3-4):145–155.
- Trotti, D, Danbolt, NC & Volterra, A** (1998). *Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?*. *Trends Pharmacol Sci* 19(8):328-34.
- Tsikak, D** (2017). *Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges*. *Anal Biochem* 524:13-30.
- Umhau, JC, Schwandt, M, Solomon, MG, Yuan, P, Nugent, A, Zarate, CA, Drevets, WC, Hall, SD, George, DT & Heilig, M** (2014). *Cerebrospinal Fluid Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Alcoholics: Support for a Neuroinflammatory Model of Chronic Alcoholism*. *Alcohol Clin Exp Res* 38(5):1301-6.
- Vengeliene, V, Bilbao, A & Spanagel, R** (2014). *The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: A comparison between rats and mice*. *Alcohol* 48:313-320.
- Vetreno, RP, Hall, JM & Savage, LM** (2011). *Alcohol-related amnesia and dementia: animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment*. *Neurobiol Learn Mem* 96(4):596-608.
- Walz, W & Lang, MK** (1998). *Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus*. *Neurosci Lett* 257:127–130.

- Weitz, CJ, Faull, KF & Goldstein, A** (1987). *Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver*. *Nature* 330(6149):674-7.
- West, R, Rodgers SP & Leasure, JL** (2021). *Neural Perturbations Associated With Recurrent Binge Alcohol in Male and Female Rats*. *Alcohol Clin Exp Res* 45(2):365-374.
- Wouterlood, FG, Engel, A, Daal, M, Houwen, G, Meinderts, A, Siquier, TJ, Beliën, JAM, van Dongen, YC, Scheel-Krüger, J, Thierry, AM, Groenewegen, HJ & Deniau, JM** (2018). *Mesencephalic dopamine neurons interfacing the shell of nucleus accumbens and the dorsolateral striatum in the rat*. *J Neuro Res* 96:1518–1542.
- Xu, H, Dexiang Liu, D, Chen, J, Li, H, Xu, M, Wen, W, Frank, JA, Grahame, NJ, Zhu, H & Luo, J** (2019). *Effects of Chronic Voluntary Alcohol Drinking on Thiamine Concentrations, Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Brain of Crossed High Alcohol Preferring Mice*. *Neurotox Res* 36(4): 777–787.
- Ypsilantis, P, Politou, M, Anagnostopoulos, C, Kortsaris, A & Simopoulos, C** (2012). *A Rat Model of Cigarette Smoke Abuse Liability*. *Comparative Medicine* 62(5):395–399.
- Zacny, JP** (1990). *Behavioral Aspects of Alcohol-tobacco Interactions*. *Recent Dev Alcohol* 8:205-19.
- Zimatkin, S, Pronko, S, Vasiliou, V, Gonzalez, F & Deitrich, R** (2006). *Enzymatic Mechanisms of Etanol Oxidation in the Brain*. *Alcohol Clin Exp Res* 30(9):1500-5.
- Zindel, LR & Kranzler, HR** (2014). *Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorders: Seventy-Five Years of Progress*. *J Stud Alcohol Drugs Suppl* 75 (Suppl 17):79-88.

11. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de los niveles de NeuN en muestras de proteínas purificadas desde tejido cerebral de rata.

Se presenta el siguiente anexo para constatar la estandarización de la determinación de los niveles proteicos de NeuN en HPC mediante Western Blot. Este trabajo fue realizado por la estudiante de Bioquímica Isidora Schneider en una Pasantía de Investigación dirigida por la asistente de investigación Msc. María Elena Quilaqueo y evaluada por el Dr. Mario Rivera Meza.

INFORME PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

Objetivos

- Estudiar por medio de la técnica Westernblot la presencia de la proteína NeuN en muestras de tejido de hipocampo cerebral previamente purificadas.
- Establecer un protocolo de Westernblot el cual este optimizado para analizar y semi cuantificar la presencia de proteína NeuN en una muestra purificada.

Introducción

Uno de los grandes problemas en el mundo moderno son las adicciones a sustancias que si bien son licitas son conocidas por ser adictivas y nocivas para la salud, una de estas sustancias es el alcohol el cual tiene una gran prevalencia en Chile, un 48,9% de la población es consumidora entre los 12 a 64 años y el consumo intenso o “binge” llega a un 43,6% de los consumidores de alcohol (Senda, 2016), esto es particularmente preocupante dado a que se sabe que el alcohol, especialmente en consumo crónico causa daño cerebral al aumentar el estrés oxidativo e inflamación de las neuronas (Meda et all,. 2018).

Ante este problema se han estudiado múltiples terapias que puedan asistir a los bebedores crónicos, uno de estos tratamientos en estudio utiliza el compuesto orgánico Alda-1 el cual en ciertos estudios ha sido capaz de reducir la toxicidad neuronal en el periodo de abstinencia y reducir el consumo de alcohol en ratas consumidoras crónicas (Chen et al., 2008)

En el estudio de tejido cerebral usualmente se utiliza la proteína nuclear NeuN como blanco de anticuerpos monoclonales en técnicas de inmunohistoquímica, es utilizado como marcador de presencia neuronal y de neuronas post mitosis. Esta proteína está presente en el núcleo de casi todas las células neuronales (Watson et al., 2010), por lo tanto, en el estudio de los efectos de sustancias nocivas que causan degradación sobre las neuronas, la disminución de la presencia de NeuN de una muestra obtenida de un tejido afectado en comparación a un control que no haya sido expuesto a la dicha sustancia, puede ser determinante en indicar daño o muerte neuronal.

Existen una gran cantidad de técnicas para cuantificar la presencia de una proteína en una muestra, en este trabajo se utilizará la técnica de Westernblot la cual ha sido utilizada extensivamente para la detección y en menor medida una semi cuantificación de una proteína específica en mezcla de diferentes proteínas contenidas en una muestra.

Materiales y métodos

En este estudio las muestras obtenidas fueron de hipocampo de ratas las cuales tratadas con el fármaco Alda-1 y sus respectivos controles (vehículo vacío y sin tratamiento).

Los materiales utilizados para esta pasantía fueron muestras de hipocampo de rata previamente purificadas, anticuerpo monoclonal primario anti-NeuN (# MAB377) y anticuerpo secundario anti-mouse. Se sabe gracias a la información entregada por el fabricante del anticuerpo primario que en el momento de revelar

el gel se apreciaran aparte de las dobles bandas esperadas de NeuN en 48 [KDa] y 46 [KDa] una tercera en 60 [KDa] la cual no está relacionada con NeuN.

Los materiales para proceder con el Westernblot son los utilizados regularmente en la técnica, el gel separador que se utilizó fue en concentración de 10% y el gel concentrador a 5%.

En cuanto a el bloqueo con leche, este en todos los casos se llevó a cabo por 1 [hr]. La incubación con anticuerpo primario se extendió por toda la noche en refrigeración, mientras que la incubación con anticuerpo secundario transcurre por 1 [hr] a temperatura ambiente.

Mientras que protocolos de Westernblot para otras proteínas existe, fue necesario ajustar los parámetros para lograr una buena corrida y resolución de la proteína NeuN, los parámetros que fueron ajustados fueron la cantidad de proteína cargada y las diluciones utilizadas de anticuerpos tanto primarios como secundarios.

De este primer protocolo [fig. 1] se descubrió que cargas superiores a 20 [µg] de proteína es demasiada cantidad y causara que las bandas obtenidas al revelar sean demasiado gruesas y difusas por lo tanto se procedió con cantidades menores en siguientes ajustes. En este primer protocolo también se determinó que la mejor concentración de anticuerpo primario la cual entrega una buena resolución de las bandas es de 1:1000 y se mantuvo para siguientes ajustes. Por último, tanto en el segundo protocolo [fig. 2] como en el tercer protocolo [fig. 3] se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo secundario, determinándose que a concentraciones de 1:60000 se logra una buena resolución sin aparición de interferencias.

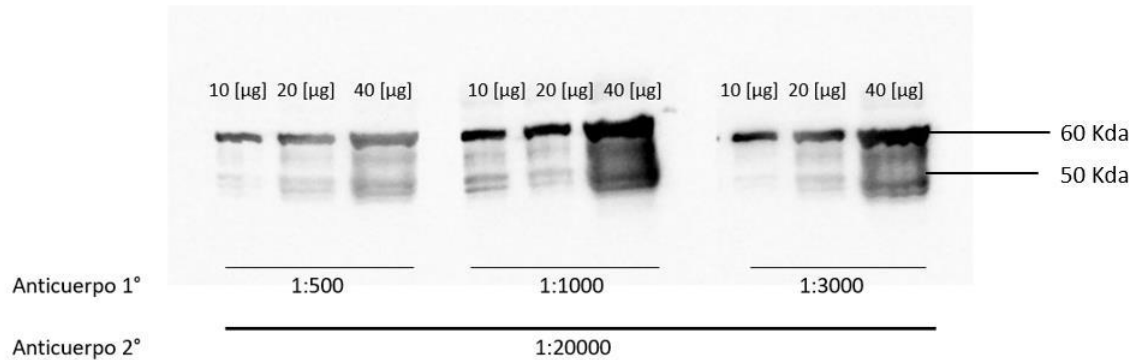


Figura 1. Primer protocolo Westernblot. Protocolo utiliza muestra hipocampo (hip) 38 creando 3 grupos, cada grupo posee de tres cargas diferentes de 10 [µg], 20 [µg] y 40 [µg] proteína. Cada grupo posee una dilución anticuerpo primario diferente, uno posee una dilución de 1:500, 1:1000 y 1:3000 respectivamente y dilución anticuerpo secundario de 1:20000.

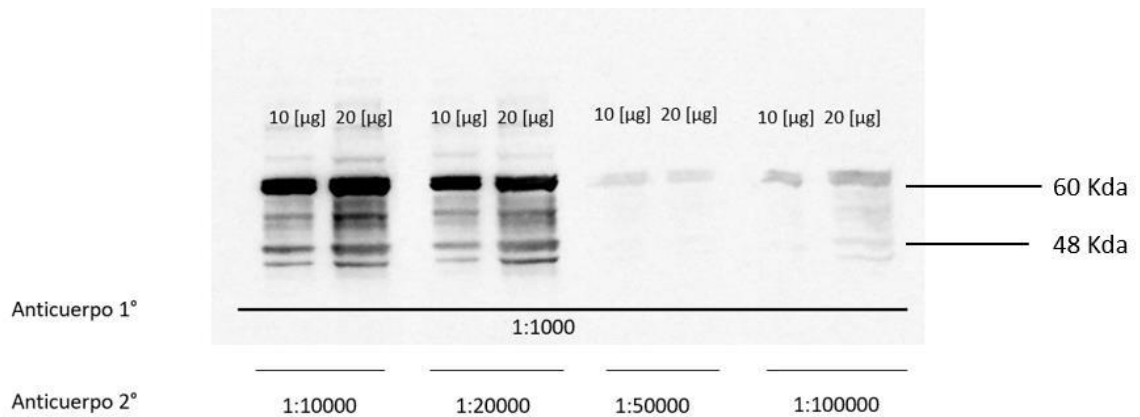


Figura 2. Segundo protocolo Westernblot. Protocolo utiliza muestra hipocampo (hip) 38 creando 4 grupos, cada grupo posee dos cargas de proteínas, una de 10 [µg] y 20 [µg]. Cada grupo posee una dilución anticuerpo primario de 1:1000 y dilución de anticuerpo secundario de 1:10000, 1:20000, 1:50000 y 1:100000 respectivamente.

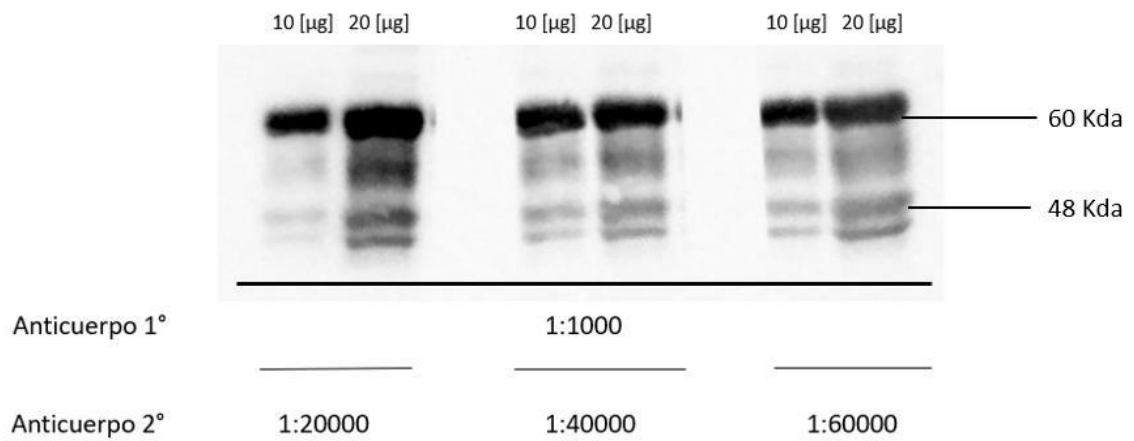


Figura 3. Tercer protocolo Westernblot. Protocolo utiliza la muestra hipocampo (hip) 66 creando 3 grupos, cada grupo cargo 2 pocillos, uno de 10 [µg] y un segundo de 20 [µg] de proteína respectivamente. Cada grupo posee una dilución de anticuerpo primario idéntica de 1:1000 y una dilución de anticuerpo secundario diferente, uno expuesto a una dilución de 1:20000, otro expuesto a 1:40000 y por último uno expuesto a 1:60000.

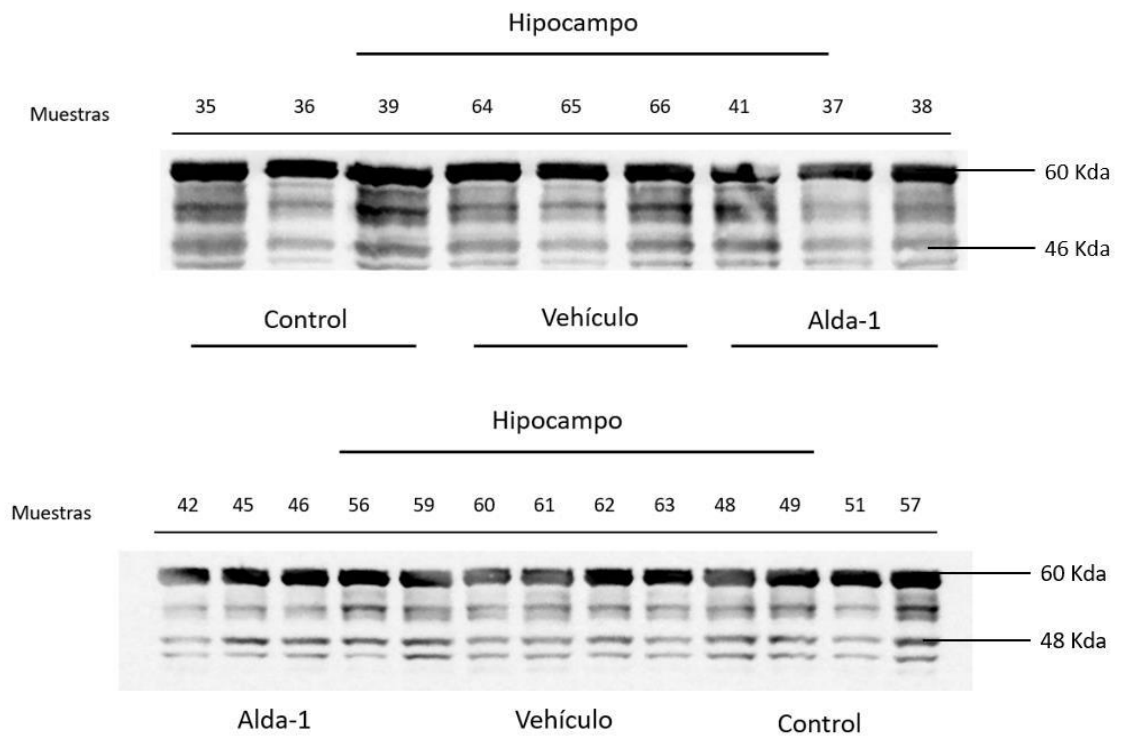


Figura 4. Cuarto protocolo Westernblot. Se utilizan todas las muestras Hip separadas en 1 gel de 10 pocillos y 1 gel de 15 pocillos, de estas muestras se cargan 10 [µg] de cada una. Para este protocolo se utilizó una dilución del anticuerpo primario 1:1000 y de anticuerpo secundario de 1:60000.

El protocolo final establecido el cual ha sido optimizado para la proteína NeuN [fig. 4] permitiendo una resolución de banda clara y con mínimas interferencias incluye una carga de 10 [µg] de proteína, una dilución de anticuerpo primario de 1:1000 y 1:60000 de anticuerpo secundario.

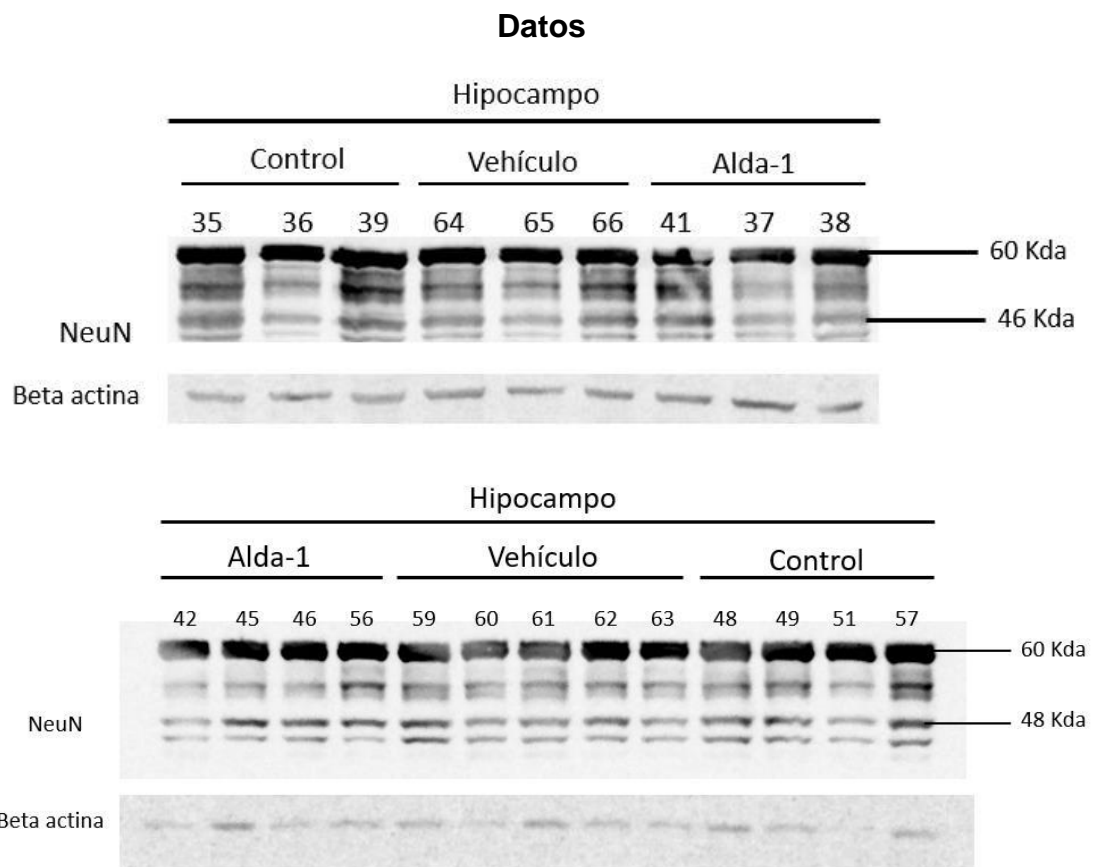


Figura 5. Westernblot a las muestras de hipocampo de rata, grupos control, Alda-1 y vehículo vacío, ambos gels con sus respectivos controles de beta actina.

Tabla 1. Datos obtenidos a través el programa ImageJ y la respectiva normalización proteína / Beta actina. Grupos separados por colores, en verde Alda-1, en azul vehículo, en amarillo control. Datos obtenidos de Westernblots anteriormente mostrados en fig.5, de tiempo de exposición 6 [min].

Muestras	Imagej area	beta actina	Imagej area	ratio proteína/ beta actina
41	13023,317	7	5855,882	2,223971897
37	7616,368	8	8040,953	0,947197179
38	9679,782	9	4843,64	1,998451991
42	3.376,518	1	3.494,347	0,966280109
45	6.920,933	2	7.318,175	0,945718434
46	7.289,882	3	4.195,054	1,737732577
56	6.023,054	4	5.373,811	1,120816121
59	9.955,004	5	5.707,640	1,744154151
60	4.861,882	6	3.330,933	1,459615669
61	5.991,882	7	6.688,246	0,895882418
62	6.186,347	8	4.303,154	1,437630863
63	4.271,640	9	3.891,711	1,097625183
64	10439,61	4	6336,468	1,647544026
65	5620,296	5	4557,64	1,233159267
66	11842,024	6	5343,347	2,216218411
35	16.057,61	1	4297,104	3,736844628
36	4838,225	2	5090,397	0,950461231
39	15638,489	3	5236,246	2,986584091
48	8.638,589	10	6.380,832	1,353834265
49	7.445,468	11	5.440,397	1,368552332
51	3.844,811	12	3.063,447	1,255060394
57	9.920,004	13	5.976,761	1,659762537

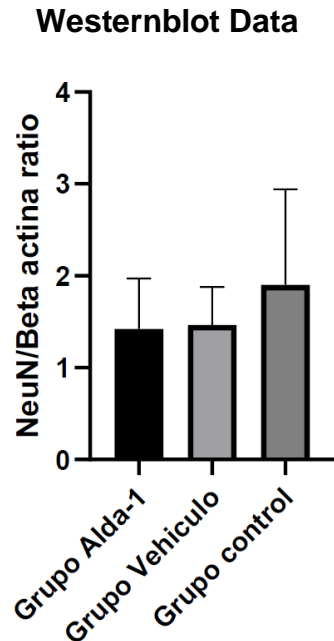


Figura 6. Gráficos obtenidos de la normalización de los datos obtenidos de los 3 grupos de estudio, se representan datos de proporción proteína/beta actina y desviación estándar.

Las 22 muestras de hipocampo (hip) fueron separadas en 3 grupos experimentales donde uno de estos grupos es el grupo estudio al cual se le administro Alda-1, mientras que los otros dos son controles, uno solo se administró el vehículo sin el fármaco y el tercer grupo no se le administro nada. Estas muestras fueron analizadas por westernblot donde se puede apreciar que las bandas de menor intensidad son aquellas del grupo Alda-1 [fig. 5] por ello se procedió con un una semi cuantificación por medio del programa ImageJ a las bandas de Neun obteniéndose los datos entregados en la tablas 1 con sus respectivas normalizaciones, estos datos se llevaron a un gráfico obteniéndose como resultado que la menor expresión de la proteína NeuN en ambos Westernblot es el grupo de estudio Alda-1 y la de mayor intensidad siendo el grupo control que no consumió alcohol [fig. 6].

Discusión y conclusiones

Alda-1 es un compuesto capaz de aumentar la actividad enzimática de ALDH2 el cual está relacionado con el metabolismo del etanol y su eliminación del cuerpo (Chen et al, 2008). Si bien esto daría a entender que luego de un consumo crónico de alcohol la administración de Alda-1 ayudaría al metabolismo a deshacerse del etanol de manera más eficiente, así evitando los efectos pro inflamatorios de este en el cerebro, lo que se ve evidenciado en estos resultados es que el daño neuronal causado por el alcohol no fue reducido por la administración de Alda-1, de hecho, posee la menor expresión de la proteína NeuN de los 3 grupos lo cual parece estar en contra de la evidencia dada por estudios anteriores donde Alda-1 ha demostrado tener capacidades neuro protectoras.

Se ha de tener en cuenta que existe una discrepancia en la resolución de una beta actina con respecto a los geles, dicha beta actina requirió una exposición por una gran cantidad de tiempo en su revelado (superior a los 6 minutos respectivos de los geles) pero no se logró una resolución aceptable, esto trajo como consecuencia que la normalización respectiva a esta beta actina no sea la esperada y por lo tanto la conclusión antes dada puede estar sujeta a variación ante una repetición. Propongo entonces el estudio de las muestras restantes las cuales pertenecen a diferentes núcleos cerebrales dado que existe evidencia de que la proteína NeuN se disipa de neuronas dañadas en el hipocampo (Gusel'nikova, 2015) pudiendo ser el causante de este aparente resultado negativo de la protección de Alda-1, podría ser que en otros núcleos la capacidad protectora sea más evidente.

Referencias

- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008 Sep 12;321(5895):1493-5. doi: 10.1126/science.1158554. PMID: 18787169; PMCID: PMC2741612.
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta naturae*, 7(2), 42–47.
- Watson, C., Kirkcaldie, M., & Paxinos, G. (2010). Techniques for studying the brain. *The Brain*, 153–165. doi:10.1016/b978-0-12-373889-9.50011-5
- Meda, S. A., Hawkins, K. A., Dager, A. D., Tennen, H., Khadka, S., Austad, C. S., Wood, R. M., Raskin, S., Fallahi, C. R., & Pearlson, G. D. (2018). Longitudinal Effects of Alcohol Consumption on the Hippocampus and Parahippocampus in College Students. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, 3(7), 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.02.006>
- Senda. (n.d.). El Consumo de alcohol en Chile: Situación epidemiológica. Retrieved December 21, 2022, from https://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/media/estudios/otrosSENDAS/2016_Consumo_Alcohol_Chile.pdf

Anexo 2. Optimización de la extracción y detección de cotinina mediante HPLC-DAD en muestras de plasma de rata UChB.

Se presenta el siguiente anexo para constatar la prueba de concepto de la extracción y detección de cotinina mediante HPLC-DAD en muestras de plasma de rata UChB enriquecidas con cotinina, con el fin de determinar la concentración plasmática de nicotina relacionando la concentración plasmática de su metabolito, cotinina, con la de nicotina (Pozuelos y cols., 2000).

Los protocolos utilizados se basaron en Massadeh y cols. (2009) con modificaciones: para la separación cromatográfica y detección se utilizó un método isocrático con una fase móvil compuesta por 2 mM KH_2PO_4 (0,272 g, PM: 136,085 g/mol), 0,8 mM SOS (0,196 g, PM: 232,26 g/mol), 180 mL de acetonitrilo grado HPLC, 820 mL de agua nanopura y pH 3,2 ajustado con H_3PO_4 , filtrada al vacío y desgasificada mediante ultrasonido. El flujo utilizado fue de 0,5 mL/min y las longitudes de onda utilizadas fueron 254 nm y 260 nm. Se utilizó cotinina (Cayman Chemical), ditartrato de nicotina (Santa Cruz Biotechnology) y acetanilida (sintetizada en el Laboratorio de Síntesis Orgánica a cargo del Dr. Javier Romero) como estándares para la construcción de curvas de calibración de cada uno de estos compuestos. El equipamiento utilizado para la curva de calibración fue el sistema de HPLC (Jasco) compuesto de una bomba de gradiente cuaternario PU-2089S Plus, un compartimento de columna CO-2060 PLUS, un detector de arreglo de diodos (DAD) MD-2018 PLUS y una interfaz de hardware LC-Net II/ADC. Para la detección de cotinina en extractos de plasma se utilizó el sistema de HPLC YL9100 (YL Instruments, Anyang-si, Korea) que incluye un desgasificador de vacío YL9101, una bomba isocrática YL9112, un compartimento de columna YL9130 y un detector UV/Vis YL9120. En ambos casos se utilizó una columna NUCLEODUR® 100-5 C18 ec (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μm) (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

Trescientos microlitros de plasma obtenido de muestras de sangre de ratas UChB que consumieron nicotina (**Métodos 6.2.**) fueron traspasados a tubos cónicos de centrífuga de 15 mL, se le agregó acetanilida en metanol 50% v/v a una concentración final de 250 ng/mL, cotinina y ditartrato de nicotina en agua a una concentración final de 50, 100, 500 y 1000 ng/mL de cada compuesto (concentración de ditartrato de nicotina en base a la concentración de nicotina libre). Se alcalinizó con 100 μ L de NaOH 2,5 M y se mezcló en un vórtex a 2800 RPM por 30 segundos. Luego, a la mezcla se le agregó 3 mL de diclorometano:dietiléter 1:1 v/v, se mezcló en un vórtex a 2800 RPM por 3 minutos y se centrifugó a 350 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica de la mezcla se traspasó a un tubo de vidrio con 20 μ L de HCl 0,25 M, se evaporó a sequedad con una corriente suave de nitrógeno a 35°C y se reconstituyó en 250 μ L y 350 μ L de fase móvil.

Para determinar la concentración plasmática de nicotina consumida por los animales se realizaron estudios para establecer un protocolo de detección de nicotina y su metabolito cotinina mediante HPLC acoplado a detector DAD (HPLC-DAD). Se utilizaron soluciones de ditartrato de nicotina y estándar HPLC de cotinina para determinar las condiciones cromatográficas óptimas y construir curvas de calibración para cada compuesto. Además, se optimizó el uso de acetanilida como estándar interno.

Las pruebas realizadas para establecer un método cromatográfico para la separación y detección de nicotina y cotinina resultaron en condiciones cromatográficas similares a las reportadas por Massadeh y cols. (2009) con algunas modificaciones que resultaron en las siguientes condiciones: método isocrático con fase móvil compuesta por KH_2PO_4 2 mM (0,272 g, PM: 136,085 g/mol), SOS 0,8 mM (0,196 g, PM: 232,26 g/mol), 180 mL de acetonitrilo grado HPLC, 820 mL de agua nanopura y pH 3,2 ajustado con H_3PO_4 . El flujo utilizado fue de 0,5 mL/min con un loop de 200 μ L y la longitud de onda utilizada fue de 254

nm. La duración de la corrida fue de 40 minutos encontrándose el peak de la cotinina, acetanilida y nicotina, con tiempos de retención de $16,00 \pm 0,03$ min, $24,38 \pm 0,03$ min y $30,20 \pm 0,31$ min, respectivamente (**Figura 1**).

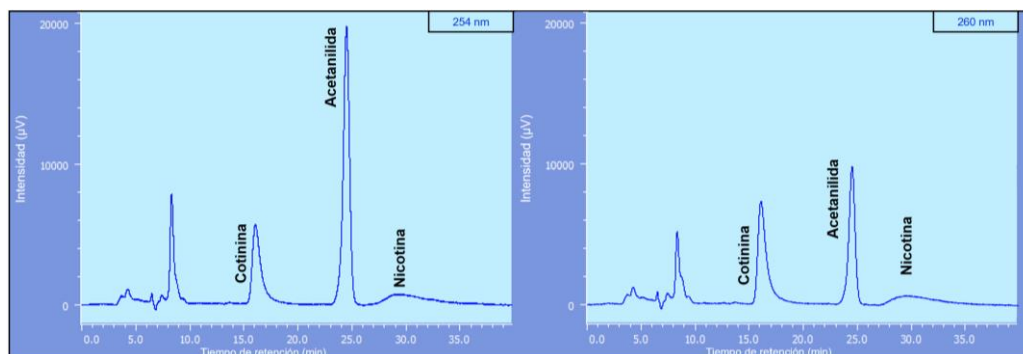


Figura 1. Cromatogramas de cotinina, acetanilida y nicotina detectados a 254 nm y 260 nm. Cromatogramas de estándares de cotinina, acetanilida y nicotina en concentraciones de 1000 ng/mL de cada compuesto preparados en fase móvil y detectados a 254 nm (izquierda) y 260 nm (derecha). La concentración de nicotina se encuentra en base a la concentración de nicotina libre en la sal de ditartrato utilizada. El eje X indica el tiempo de retención en minutos y el eje Y indica la intensidad de la señal detectada para cada compuesto en microvoltios (μV).

Luego de determinar los tiempos de retención de cada compuesto, se prosiguió con la construcción de las curvas de calibración de éstos. Las concentraciones de estándares utilizadas fueron de 100, 200, 400, 500 y 1000 ng/mL e inyectadas por duplicado. La solución de 100 ng/mL no se incluyó en las curvas de calibración ni en los gráficos debido a que la señal detectada para dicha concentración no se pudo integrar de forma certera por estar cercana a la señal del ruido en la línea base de la corrida. Las demás concentraciones fueron graficadas versus el área del peak ($\text{min} \cdot \mu\text{V}$) o altura máxima registrada (μV) para ambas longitudes de onda utilizadas en la medición (**Figura 2**).

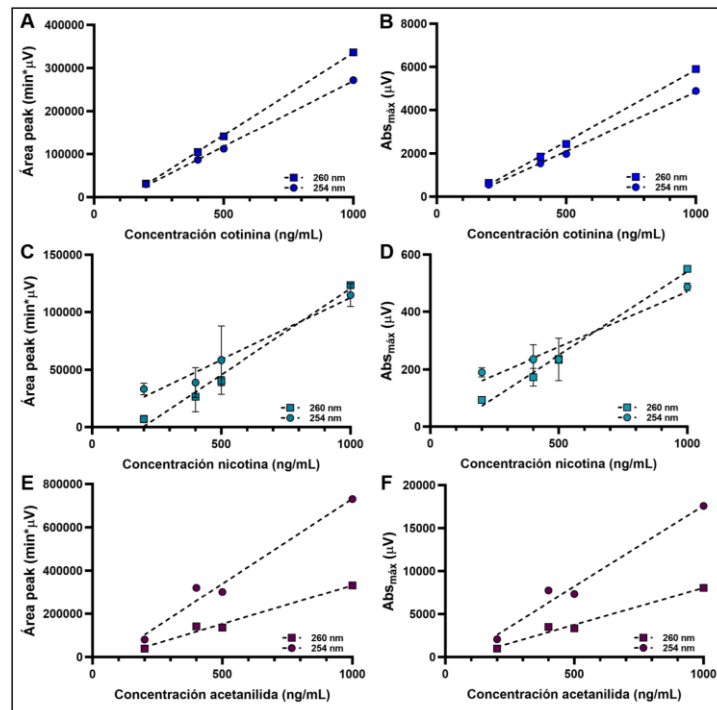


Figura 2. Curvas de calibración de cotinina, nicotina y acetanilida. En el eje X se presentan las concentraciones de cotinina (A y B), ditartrato de nicotina (C y D) y acetanilida (E y F) usadas en la construcción de las curvas de calibración. En el eje Y se presenta la señal obtenida para cada concentración utilizada. En cada uno, el cuadrado indica la señal obtenida a 260 nm y el círculo indica la señal obtenida a 254 nm, y la línea punteada indica la línea de tendencia de la curva de calibración. Los datos se encuentran expresados como promedio del área del peak ($\text{min}^* \mu\text{V}$) o $\text{Abs}_{\text{máx}}$ (μV) \pm SEM.

Las curvas de calibración de cada estándar fueron sometidas a un análisis de regresión lineal y de correlación de Pearson para evaluar la linealidad y correlación directa entre las variables en cuestión. De este análisis se observó que el coeficiente de correlación (R^2) de las curvas se encuentran en rango de 0,7539 a 0,9988 con sus respectivos valores p entre 0,0052 y $<0,0001$, comprobando el ajuste lineal de las curvas de calibración. Además, el coeficiente de Pearson se encontró entre 0,9836 y 0,9999 con sus respectivos valores p entre 0,0275 y 0,0001, indicando una relación directa entre las variables estudiadas. El detalle de

los resultados obtenidos del análisis de regresión lineal y coeficiente de Pearson se encuentra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ecuaciones de la recta, coeficientes de correlación y coeficientes de Pearson de los ajustes lineales de las curvas de calibración de cotinina, nicotina y acetanilida.

		Cotinina	Nicotina	Acetanilida	
Área	254 nm	Ecuación (R ²)	y = 304,8x - 34628 (0,9960)	y = 107,7x + 4821 (0,7539)	y = 786,5x - 54244 (0,9744)
		F (p-value)	1510 (<0,0001)	18,38 (0,0052)	228,2 (<0,0001)
		R Pearson (p-value)	0,9993 (0,0007)	0,9836 (0,0164)	0,9873 (0,0127)
	260 nm	Ecuación (R ²)	y = 382,6x - 47279 (0,9988)	y = 150,0x - 29392 (0,9635)	y = 356,8x - 25085 (0,9790)
		F (p-value)	4892 (<0,0001)	158,5 (<0,0001)	279,7 (<0,0001)
		R Pearson (p-value)	0,9999 (0,0001)	0,9939 (0,0061)	0,9898 (0,0102)
Abs _{máx}	254 nm	Ecuación (R ²)	y = 5,467x - 628,2 (0,9949)	y = 0,3868x + 83,31 (0,8229)	y = 18,79x - 1174 (0,9756)
		F (p-value)	1171 (<0,0001)	27,89 (0,0019)	240,1 (<0,0001)
		R Pearson (p-value)	0,9988 (0,0012)	0,9725 (0,0275)	0,9879 (0,0121)
	260 nm	Ecuación (R ²)	y = 6,630x - 769,1 (0,9971)	y = 0,5853x - 44,65 (0,9833)	y = 8,582x - 529,1 (0,9777)
		F (p-value)	2029 (<0,0001)	353,6 (<0,0001)	262,9 (<0,0001)
		R Pearson (p-value)	0,9994 (0,0006)	0,9958 (0,0042)	0,9890 (0,0110)

Luego de la estandarización de las condiciones cromatográficas para la separación y detección de nicotina y cotinina, se procedió a estandarizar la extracción orgánica sólo de cotinina, pues este metabolito de la nicotina tiene un mayor tiempo de vida media que la nicotina. Se realizaron pruebas de extracción con concentraciones de cotinina de 50, 100, 500 y 1000 ng/mL inyectadas en plasma de ratas sin tratamiento, manteniendo constante la concentración de acetanilida (250 ng/mL), compuesto utilizado como estándar interno de la extracción. Los extractos fueron resuspendidos en 250 mL de fase móvil y se inyectaron 100 µL de la resuspensión para separación y detección por HPLC-UV.

Debido a un cambio en el equipamiento utilizado, se realizaron pruebas para comprobar que las condiciones cromatográficas funcionan en el nuevo equipo, en las que se inyectaron estándares de cotinina y acetanilida, ambas a 250 ng/mL. Las condiciones cromatográficas previas se mantuvieron cambiando solo el flujo utilizado de 0,5 mL/min a 1 mL/min, lo que produjo un acortamiento del tiempo de corrida a 20 minutos y tiempos de retención de $8,47 \pm 0,10$ minutos y $12,30 \pm 0,13$ minutos para la cotinina y acetanilida, respectivamente (**Figura 3A**).

Los resultados obtenidos de la separación y detección de los extractos de plasma de rata enriquecidos con cotinina en diferentes concentraciones (50 ng/mL - 1000 ng/mL) y acetanilida 250 ng/mL muestran un peak de acetanilida constante entre inyecciones, con un tiempo de retención promedio de $12,26 \pm 0,06$ min, área promedio de $136,11 \pm 8,86$ s*mV y altura promedio de $4,53 \pm 0,28$ mV (**Figura 3C, D, E, F**).

Por su parte, se observó señal de cotinina solamente en extractos de plasma inyectados con 500 ng/mL y 1000 ng/mL del compuesto, con un tiempo de retención promedio de $8,66 \pm 0,01$ min y una relación de señal proporcional a la concentración de cotinina inyectada, es decir, el extracto enriquecido con 1000 ng/mL de cotinina muestra el doble de la señal que el extracto enriquecido con 500 ng/mL de cotinina, aproximadamente (**Tabla 2; Figura 3E, F**). Los extractos de plasma inyectados con 50 y 100 ng/mL de cotinina no muestran señal de cotinina (**Figura 3C, D**), por lo que el límite de detección observado en este trabajo es de 500 ng/mL.

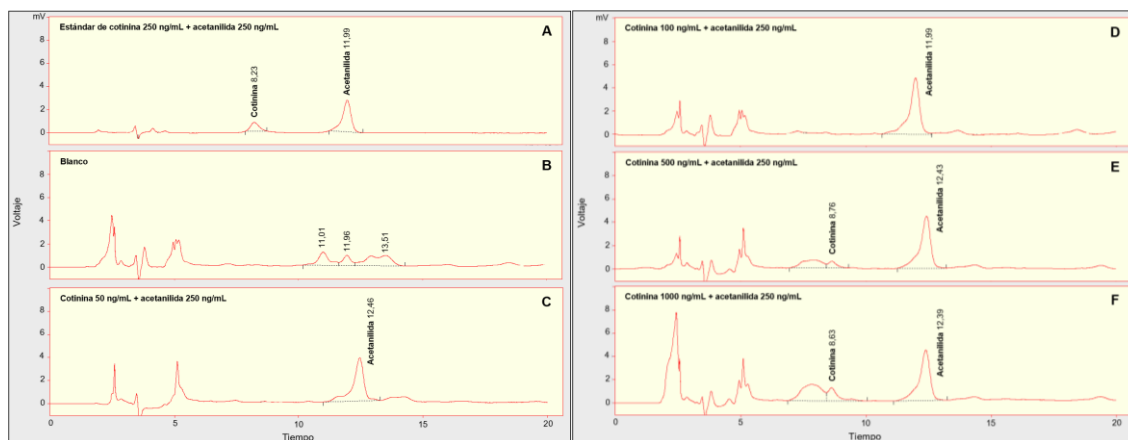


Figura 3. Cromatogramas de estándares de cotinina y acetanilida y extractos de plasma de ratas sin tratamiento enriquecidos con cotinina y acetanilida. Cromatogramas de estándares de cotinina y acetanilida a 250 ng/mL (**A**; n=5), extracto de plasma de rata sin tratamiento (**B**; n=2), extracto de plasma enriquecido con cotinina 50 ng/mL (**C**; n=4), 100 ng/mL (**D**; n=6), 500 ng/mL (**E**; n=2) y 1000 ng/mL (**F**; n=2). Todos los extractos enriquecidos en cotinina también fueron enriquecidos con acetanilida 250 ng/mL (estándar interno de

extracción). El eje X indica el tiempo de retención en minutos y el eje Y indica la intensidad de la señal en milivoltios (mV).

Tabla 2. Tiempo de retención, área y altura de señal, y la razón de las señales de cotinina obtenida de extractos de plasma enriquecidos con cotinina 500 y 1000 ng/mL.

Muestra	t _R (min)	Área (s*mV)	Altura (mV)
Extracto + COT 500 ng/mL	8,67	13,71	0,59
Extracto + COT 1000 ng/mL	8,65	35,05	1,33
Razón 1000/500	1	2,6	2,3

COT: cotinina

Referencias

Pozuelos, J, Martinena, E, Monago, I, Viejo, I, Pérez & Torralba, T (2000). Farmacología de la nicotina. Medicina Integral 35(9):409-417.

Massadeh, AD, Gharaibeh, AA & Omari, KW (2009). *A Single-Step Extraction Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian Smokers' Blood and Urine Samples by RP-HPLC and GC-MS.* J Chromatogr Sci 47(2):170-7.