

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACIÓN IN VITRO DE LA TOXICIDAD DE ALDA-1, UN  
COMPUESTO EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DEL  
ALCOHOLISMO***

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

***MARÍA ELENA QUILAQUEO MAULÉN***

Director de Tesis: Dr. Mario Rivera  
Codirectores de Tesis: Dr. Marcelo Kogan  
Dr. David Vásquez

Santiago-CHILE

Mayo 2022

**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

**MARÍA ELENA QUILAQUEO MAULÉN**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 24 de mayo de 2022.

**Director de Tesis:**

**Dr. Mario Rivera Meza**

---

**Co-directores de Tesis:**

**Dr. Marcelo Kogan**

---

**Dr. David Vásquez**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Mario Chiong**

---

**Dra. Soledad Bollo**

---

**Dr. Mario Faúndez**

---

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología Experimental del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Fue financiada por los siguientes proyectos: DQFT 2018-1 (Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile), PII 2018 (Dirección de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile), FONDECYT 1201577, FONDAP 15130011 y CONICYT (CONICYT-PFCHA/Magíster Nacional/2019 – 22191656).

## **PRESENTACIÓN EN CONGRESO**

Los resultados de los experimentos desarrollados en esta tesis fueron presentados en:

**Quilaqueo, M. Rivera, M.**

"*In vitro* toxicity of Alda-1, a potential drug for the treatment of alcohol use-disorders". I Virtual LASBRA Meeting. 2-4 de diciembre de 2020.

**Quilaqueo, M. Rivera, M.**

"*In vitro* toxicity evaluation of Alda-1, an experimental compound for the treatment of alcohol use disorders". XLII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI). 1-3 de diciembre de 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

Después de un largo tiempo termina este proceso tan importante. Ha sido difícil, y más extenso de lo que tenía planeado, pero sin duda ha sido de mucho aprendizaje y muy gratificante. Quiero agradecer a todas las personas que han estado apoyándome durante todos estos años.

En primer lugar, agradecer a mis padres María Elena y Abelardo, y a mis hermanos Benjamín, Catalina, Lucía y Antonio por acompañarme siempre. A mi pareja José Valdivia, quien sin duda me ha dado todo el apoyo y motivación cada día, y me ha acompañado en todo momento.

A mi director de tesis, Dr. Mario Rivera, por guiarme durante todo el desarrollo de esta tesis, por sus consejos y por darme la oportunidad de crecer como investigadora. También agradecer a quienes fueron mis compañeros de laboratorio durante estos años, Adolfo, por su ayuda y compañía cuando inicié esta tesis, así como también agradecer a mis compañeras más recientes Sofía y Fresia, por su apoyo y hacer más gratos los días de trabajo en el laboratorio.

Además, agradecer a compañeros de otros laboratorios en especial a Jenaro por sus consejos, ayuda y compañía en todo este proceso.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos Pancho, Daniel, Angi, Chang y Dana, a quienes conocí durante el transcurso de esta carrera, gracias por el apoyo y compartir grandes momentos juntos.

## ÍNDICE GENERAL

<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	<b>I</b>
<b>PRESENTACIÓN EN CONGRESO</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Alcohol y Salud Pública.....	1
1.2. Tratamiento Farmacológico del Alcoholismo.....	1
1.3. Metabolismo del Etanol .....	2
1.4. Efectos del acetaldehído a nivel cerebral .....	3
1.5. Efectos farmacológicos y potencial toxicidad de Alda-1 .....	4
1.6. Determinación de la toxicidad de un fármaco.....	6
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>9</b>
<b>5. MATERIALES</b> .....	<b>10</b>
5.1. Líneas celulares .....	10
5.2. Reactivos de cultivo celular .....	10
5.3. Reactivos generales .....	10
<b>6. MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
6.1. Cultivo de líneas celulares.....	12
6.2. Sembrado de células para ensayos de toxicidad.....	12
6.3. Ensayo de exclusión azul de tripán .....	13
6.4. Ensayo reducción de MTS .....	13

6.5. Medición de actividad de lactato deshidrogenasa .....	14
6.6. Ensayo del cometa.....	14
6.7. Análisis Estadísticos.....	15
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
7.1. Selección del solvente de Alda-1 para los ensayos de citotoxicidad .....	17
7.2. Optimización del número de células sembradas para cada línea celular .....	18
7.3. Optimización de las concentraciones de peróxido de hidrógeno como control positivo de citotoxicidad .....	18
7.4. Determinación de la citotoxicidad de Alda-1 en cultivos celulares.....	20
7.4.1. Efecto de Alda-1 en la proliferación de cultivos celulares.....	21
7.4.2. Efecto de Alda-1 en la viabilidad de cultivos celulares.....	23
7.4.3. Efecto de Alda-1 en la función metabólica de cultivos celulares.....	24
7.4.4. Efecto de Alda-1 en la permeabilidad de la membrana plasmática.....	27
7.5. Optimización de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como control positivo de.....	30
genotoxicidad .....	30
7.6. Determinación de la genotoxicidad de Alda-1 en células SH-SY5Y.....	32
7.7. Determinación de la genotoxicidad de Alda-1 en células HepG2 .....	34
7.8. Determinación del potencial efecto protector de Alda-1 frente a la genotoxicidad del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en células SH-SY5Y y HepG2.....	36
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo del etanol en el cerebro.....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura de Alda-1.....	5
<b>Figura 3.</b> Proliferación y viabilidad de células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de DMSO y metanol.....	18
<b>Figura 4.</b> Viabilidad de las líneas celulares a distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	20
<b>Figura 5.</b> Proliferación de células tratadas con distintas concentraciones de Alda- 1.....	22
<b>Figura 6.</b> Viabilidad de células tratadas con distintas concentraciones de Alda-1.....	24
<b>Figura 7.</b> Actividad reductora de MTS en células HepG2, SHSY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.....	26
<b>Figura 8.</b> Liberación de LDH en células HepG2, SHSY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.....	28
<b>Figura 9.</b> Liberación de LDH y actividad LDH intracelular en cultivo de células HEK-293 incubadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
<b>Figura 10.</b> LDH intracelular de células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.....	30
<b>Figura 11.</b> Categorías de índice de daño en ensayo de cometa.....	31
<b>Figura 12.</b> Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y y HepG2 expuestas a distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	32
<b>Figura 13.</b> Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y tratadas con Alda-1.....	33
<b>Figura 14.</b> Ensayo del cometa en células SH-SY5Y incubadas con Alda-1 durante 1 hora.....	33
<b>Figura 15.</b> Ensayo del cometa en células SH-SY5Y incubadas con Alda-1 durante 6 horas.....	34
<b>Figura 16.</b> Índice de daño en el ADN de células HepG2 tratadas con Alda-1.....	35
<b>Figura 17.</b> Ensayo del cometa en células HepG2 incubadas con Alda-1 durante 1 hora....	35
<b>Figura 18.</b> Ensayo del cometa en células HepG2 incubadas con Alda-1 durante 6 horas. .	36
<b>Figura 19.</b> Ensayo del cometa en células SH-SY5Y preincubadas con Alda-1 y luego tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
<b>Figura 20.</b> Ensayo del cometa en células HepG2 preincubadas con Alda-1 y luego tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Listado de ensayos de citotoxicidad usados para la detección de daño celular..... 7

**Tabla 2.** Listado de ensayos utilizados para evaluar genotoxicidad..... 8

## **ABREVIATURAS**

**ADH:** Deshidrogenasa alcohólica.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ALDH2:** Deshidrogenasa aldehídica.

**Alda-1:** *N*-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida.

**C3H/10T1/2:** Células embrionarias de fibroblastos de ratón C3H.

**DMEM:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

**DMEM-F12:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutriente F12.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**HEK-293:** Células embrionarias de riñón humano.

**HepG2:** Células de hepatocarcinoma humano.

**LDH:** Deshidrogenasa láctica.

**MTS:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.

**SH-SY5Y:** Células de neuroblastoma humano.

## RESUMEN

El alcohol es una sustancia psicoactiva con propiedades tóxicas y productoras de dependencia. La OMS estima que 3 millones de muertes anuales son atribuibles al consumo de alcohol. El tratamiento farmacológico actual del alcoholismo se basa en tres fármacos aprobados por la FDA: disulfiram, acamprosato y naltrexona, sin embargo, su uso clínico es limitado debido a sus bajas eficacias y efectos secundarios graves.

A nivel cerebral, el etanol es metabolizado a acetaldehído por acción de la enzima catalasa, y éste posteriormente es oxidado a acetato por la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2). Diversos estudios avalan que el acetaldehído generado en el cerebro tiene propiedades de refuerzo positivas, por lo que regular la concentración cerebral de este metabolito es un potencial blanco farmacológico en el tratamiento de la dependencia del alcohol. Estudios recientes en animales han mostrado que la administración de Alda-1, compuesto orgánico que activa la ALDH2 y promueve la eliminación del acetaldehído, resulta en una reducción tanto de la adquisición del hábito de beber alcohol como del consumo crónico en ratas. Estos resultados sugieren que Alda-1 podría ser una nueva alternativa farmacológica para el tratamiento del alcoholismo. A pesar de que en diversos modelos animales de isquemia/reperfusión Alda-1 ha mostrado efectos protectores, no hay estudios acerca de su toxicidad a nivel celular ni en animales.

Es por ello, que el objetivo de esta tesis fue evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de Alda-1 *in vitro* y determinar si este compuesto ejerce protección frente a la toxicidad inducida por  $H_2O_2$ .

La citotoxicidad de Alda-1 se verificó utilizando 5 concentraciones distintas (0,2; 2; 20; 50 y 100  $\mu M$ ) luego de la incubación por 24 y 48 horas en líneas celulares HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 y HEK293, mediante ensayos de exclusión de azul de tripán, reducción de MTS, y liberación de LDH. La evaluación de la genotoxicidad se realizó utilizando el método del cometa en células SH-SY5Y y HepG2 luego de 1 y 6 horas de incubación con Alda-1 (20-100  $\mu M$ ). Para medir protección genotóxica se preincubó por 6 horas con Alda-1 seguido de 1 hora de tratamiento con  $H_2O_2$ . Los resultados mostraron que Alda-1 no tiene efectos citotóxicos ni genotóxicos en las líneas celulares a los tiempos estudiados, pero no ejerce un efecto protector frente al daño en el ADN producido por  $H_2O_2$ . Por lo que Alda-1 no sería un compuesto tóxico a nivel *in vitro*.

## SUMMARY

Alcohol is a psychoactive substance with toxic and dependency-producing properties. WHO estimates that 3 million deaths per year are attributable to alcohol consumption. Current pharmacological treatment of alcoholism is based on three FDA-approved drugs: disulfiram, acamprosate and naltrexone, however, its clinical use is limited due to its low efficacy and serious side effects.

In the brain, ethanol is metabolized to acetaldehyde by the enzyme catalase, and further oxidized to acetate by mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). A number of studies support that acetaldehyde generated in the brain has positive reinforcing properties. Therefore, regulating the brain concentration of this metabolite may constitute a potential pharmacological target in the treatment of alcohol dependence. Recent studies in animals have shown that Alda-1 administration, an organic compound that activates ALDH2 and promotes the elimination of acetaldehyde, results in a reduction in both the acquisition of the habit of drinking alcohol and chronic consumption in rats. These results suggest that Alda-1 could be a new pharmacological alternative for the treatment of alcoholism. Although Alda-1 has shown protective effects in various animal models of ischemia/reperfusion, there are no studies on its toxicity in cellular or animal models.

The aim of this thesis was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of Alda-1 *in vitro* and determine if this compound exerts protection against the toxicity induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Alda-1 cytotoxicity was verified using 5 different concentrations (0.2; 2; 20; 50 and 100 μM) after incubation for 24 and 48 hours in HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 and HEK-293 cell lines, by trypan blue exclusion, MTS reduction, and LDH release assays. The evaluation of the genotoxicity was performed using the comet assay in SH-SY5Y and HepG2 cells after 1 and 6 hours of incubation with Alda-1 (20-100 μM). To measure the genotoxic protection cells were preincubated for 6 hours with Alda-1 followed by 1 hour of treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results showed that Alda-1 does not have cytotoxic or genotoxic effects on cell lines at the times studied but does not exert a protective effect against DNA damage produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Therefore, Alda-1 would not be a toxic compound at *in vitro* level.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Alcohol y Salud Pública

El consumo de alcohol es una práctica muy extendida en el mundo y se remonta a tiempos inmemoriales (Solimano, 2006). Las consecuencias sociosanitarias del consumo nocivo de alcohol son elevadas, siendo causa de considerables pérdidas sociales y económicas, tanto para las personas como para la sociedad en su conjunto (SENDA, 2016). Según lo estimado por la Organización Mundial de la Salud, 3 millones de muertes anuales son atribuibles al consumo de alcohol (OMS, 2018) y según reportes del Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA), el alcohol es el primer factor de riesgo que causa más muerte y discapacidad en Chile, y se relaciona con el 12,4% de los años de vida saludable (AVISA) perdidos por muerte o discapacidad (SENDA, 2016).

## 1.2. Tratamiento Farmacológico del Alcoholismo

El trastorno por consumo de alcohol (AUD, del inglés *Alcohol Use Disorder*), es un trastorno heterogéneo derivado de una interacción compleja de factores neurobiológicos, genéticos y ambientales. Como resultado de esta heterogeneidad, no existe aún un único tratamiento para el AUD (Litten y cols., 2016).

Actualmente, 3 medicamentos están aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la dependencia del alcohol: i) disulfiram, aprobado en 1949, que inhibe la aldehído deshidrogenasa (ALDH), enzima que metaboliza el acetaldehído, un metabolito tóxico del alcohol. Dicha inhibición aumenta rápidamente la concentración de acetaldehído y produce una reacción caracterizada por náuseas, sofocos, vómitos, entre otros, por lo que su efectividad se basa en el temor del paciente a estos efectos adversos, y no en una acción farmacológica directa. ii) Naltrexona, disponible para administración oral o intramuscular, funciona como un antagonista no selectivo de los receptores opioides ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), disminuyendo el consumo de alcohol por medio de la reducción de los efectos gratificantes del alcohol mediado por la neurotransmisión opioide. iii) Acamprosato, estructuralmente similar a los aminoácidos endógenos que actúan como neurotransmisores (glutamato, GABA, glicina) en varias regiones del cerebro. Aunque el mecanismo exacto de su acción no está del todo claro,

se ha propuesto que actúa modulando negativamente la neurotransmisión glutamatérgica (Wackernah y cols., 2014; Soyka y Müller, 2017; Kranzler y Soyka, 2018).

Hasta la fecha, el acamprosato y la naltrexona presentan una mayor eficacia que disulfiram en la prevención de recaídas o reducción del consumo de alcohol, aunque sus efectos son modestos y no se prescriben con frecuencia (Soyka y Müller, 2017). Es por ello, que se necesita investigación adicional para identificar nuevos compuestos que sean más efectivos para el tratamiento del alcoholismo y con menos efectos secundarios.

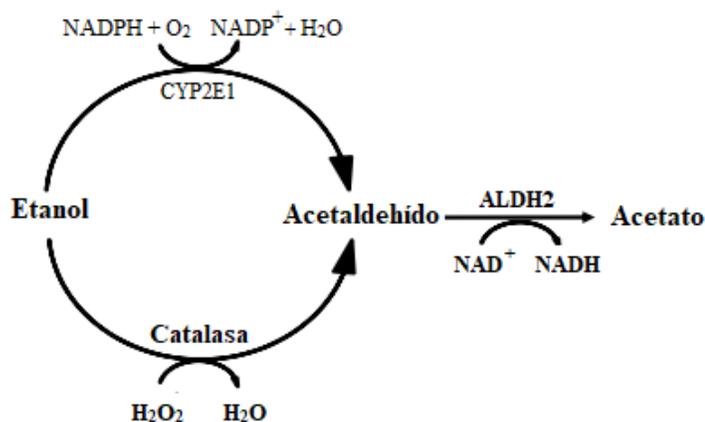
### **1.3. Metabolismo del Etanol**

En humanos, el 90% del alcohol ingerido se elimina por metabolismo hepático. El etanol se transforma primero en acetaldehído a través de varios mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Quertemont, 2004), siendo la principal vía enzimática la alcohol deshidrogenasa (ADH), y en menor proporción el sistema microsomal de oxidación de etanol, cuya enzima principal es el citocromo P450 2E1 (Teschke, 1976; Matsumoto y Fukui, 2002).

El acetaldehído se oxida posteriormente a acetato por acción de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2), la cual se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, pero más abundantemente en el hígado. También se ha encontrado en altas cantidades en órganos que requieren alta fosforilación oxidativa mitocondrial, como el corazón y el cerebro (Chen y cols., 2014). Fármacos como disulfiram y polimorfismos genéticos de la ALDH2 (ALDH2\*2) reducen la actividad de esta enzima y llevan a un aumento en los niveles sanguíneos de acetaldehído luego del consumo de alcohol (Enomoto y cols., 1991). La acumulación de acetaldehído en la sangre produce síntomas altamente desagradables (ej. náuseas, enrojecimiento facial, palpitaciones, dificultad respiratoria) que resultan en la aversión del paciente a consumir bebidas alcohólicas (Swift, 2007).

La barrera hematoencefálica (BHE) limita la difusión del acetaldehído hacia el cerebro (Sippel, 1974) debido a la presencia de ALDH en la microvasculatura cerebral (Zimatkin, 1991). Por lo tanto, la concentración de acetaldehído en el sistema nervioso central (SNC) está determinada principalmente por la producción local a partir de etanol. A diferencia del metabolismo hepático, a nivel cerebral la oxidación del etanol es llevada a cabo en un 60%

por efecto de la enzima catalasa, y minoritariamente por actividad del CYP2E1; mientras que la ADH presenta una muy baja expresión en el SNC (Zimatkin y cols., 2006) (**Figura 1**).



**Figura 1. Metabolismo del etanol en el cerebro.**

*A nivel cerebral el etanol es metabolizado principalmente mediante la enzima catalasa en los peroxisomas (60%), y minoritariamente por citocromo P450 2E1 (sistema microsomal). El acetaldehído que es generado se oxida a acetato por acción de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2).*

#### **1.4. Efectos del acetaldehído a nivel cerebral**

Al igual que otras drogas de abuso, el etanol puede influir en el comportamiento a través de su capacidad para estimular la liberación de dopamina (DA) en el sistema mesocorticolímbico. El sistema mesocorticolímbico dopaminérgico es una región del cerebro medio que cumple un rol fundamental en el efecto reforzante de distintas drogas de abuso que generan dependencia (Di Chiara e Imperato, 1988). Este circuito cerebral está constituido por neuronas dopaminérgicas cuyos somas se encuentran en el Área Tegmental Ventral (VTA), las que proyectan sus axones hacia el Núcleo Accumbens (nAc) y otras regiones corticales.

A través de la autoadministración de acetaldehído directamente a ventrículos cerebrales (Brown y cols., 1979; Amit y Smith, 1985), así como su administración intravenosa (Myers y cols., 1984; Myers y Singer, 1984; Foddai y cols., 2004) se ha demostrado que las propiedades de refuerzo positivas generalmente atribuidas al etanol, son en realidad mediadas por su metabolito el acetaldehído. Además, algunos estudios sugieren que parte de los efectos neuroquímicos y del comportamiento mediados por el etanol están asociados al compuesto salsolinol, el cual se forma de la reacción del acetaldehído con la dopamina y que presenta

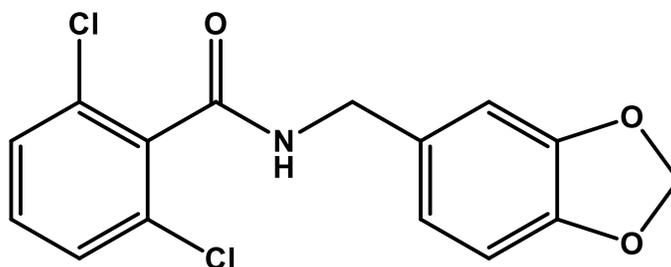
efectos reforzantes en animales (Peano y cols., 2016). Es por ello que diversos estudios se han centrado en la regulación de la concentración de acetaldehído cerebral como blanco farmacológico.

Tanto el bloqueo de la síntesis de catalasa en el VTA mediante la microinyección de un vector lentiviral codificante para un shRNA anticatalasa (Karahanian y cols., 2011), como la inhibición farmacológica por el compuesto 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (Peano y cols., 2015) reducen la adquisición del hábito de consumir etanol en ratas. Por otra parte, el aumento del metabolismo de acetaldehído mediante la administración en el VTA de un vector lentiviral codificante para ALDH2 reduce el consumo de etanol en ratas en 85-90% (Karahanian y cols., 2015). Sin embargo, tanto la administración de estos vectores lentivirales como el inhibidor de catalasa son inefectivos en reducir el consumo de etanol en ratas que hayan alcanzado un estado de consumo crónico de etanol.

Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que la administración de Alda-1, compuesto orgánico que activa la deshidrogenasa aldehídica y promueve la eliminación del acetaldehído, resulta en una reducción tanto de la adquisición del hábito de beber alcohol como del consumo crónico en ratas bebedoras. Los efectos de Alda-1 parecieran ser específicos para el etanol ya que no modifica el consumo de otros reforzantes como sacarina (Rivera-Meza y cols., 2019). Estos resultados sugieren que Alda-1 podría ser una nueva alternativa farmacológica para el tratamiento del alcoholismo.

### **1.5. Efectos farmacológicos y potencial toxicidad de Alda-1**

*N*-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida (Alda-1) es una molécula orgánica (**Figura 2**), que actúa como un activador de ALDH2, y que no posee efecto sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa. Mediante cristalografía de rayos X se determinó que Alda-1 se une a la enzima dentro del túnel de entrada del sustrato y mediante ensayos enzimáticos se determinó que aumenta la velocidad máxima de la ALDH2 al reducir el número de encuentros no productivos entre el sustrato y cofactor con el sitio activo, además de proteger a la enzima de la inactivación inducida por sustrato (Perez-Miller y cols. 2010). Además, se ha descrito que concentraciones micromolares (~20  $\mu$ M) de Alda-1 son suficientes para ejercer su acción tanto *in vitro* como *ex vivo* (Chen y cols., 2008).



**Figura 2. Estructura de Alda-1.**

La activación de la ALDH2 mediada por Alda-1 ha demostrado efectos cardioprotectores en modelos animales de insuficiencia cardíaca inducida por infarto. La administración de Alda-1 reduce el daño producido por la falla cardíaca mediante la disminución de la carga aldehídica, previniendo la disfunción mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (Gomes y cols., 2014). Estos efectos incluso se observan en modelos de cardiomiopatía post infarto al miocardio, luego de la infusión continua de Alda-1 mediante una bomba subcutánea (Gomes y cols., 2015). Además, la administración de este activador de la ALDH2 previo a un evento isquémico reduce el daño cardíaco asociado (Chen y cols., 2008). Diversos modelos de isquemia/reperfusión han evidenciado los efectos protectores de Alda-1, tanto a nivel cerebral (Fu y cols., 2014), pulmonar (Ding y cols., 2016), hepático (Li y cols., 2018; Zhang y cols., 2018) e intestinal (Zhu y cols., 2017).

Por otra parte, la administración tópica de Alda-1 retrasa la aparición de dermatitis por radiación en animales expuestos a radiación gamma, al reducir significativamente la acumulación de aductos de 4-hidroxinonanal (4-HNE), aldehído altamente reactivo y subproducto de la peroxidación lipídica inducida por estrés oxidativo, que interactúa con las proteínas y el DNA formando aductos que interfieren con la función celular y generando citotoxicidad (Ning y cols., 2012).

A nivel óseo, Mittal y cols. (2017) demostraron que a diferencia de otros fármacos como disulfiram que causan osteopenia grave en ratas adultas, Alda-1 tiene efectos osteogénicos cuando es administrado vía oral.

Además, la activación farmacológica de la ALDH2 mediada por Alda-1 revierte la esteatosis hepática alcohólica (Zhong y cols., 2015) e incluso protege de la esteatohepatitis no alcohólica promovida por la exposición a cloruro de vinilo mediante la depuración de aldehídos y la preservación de la función respiratoria mitocondrial (Chen y cols., 2019).

Otros estudios han demostrado que esta molécula orgánica a bajas concentraciones (100 nM- 1  $\mu$ M) es capaz de disminuir las características malignas de células de adenocarcinoma pulmonar, reduciendo la formación de colonias, esferas 3D y migración celular en células H1299 y A549 (Li y cols., 2019). Además, se ha observado que a nivel *in vitro* el pretratamiento con Alda-1 reduce la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivo celular de tenocitos (Liu y cols., 2020), sin embargo, no se ha descrito si Alda-1 ejerce un efecto protector frente al daño en el ADN inducido por estresores oxidativos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En cuanto a la toxicidad de este compuesto, los antecedentes son muy limitados. Estudios realizados por Ning y cols. (2012) muestran que la aplicación tópica de Alda-1 3 mM no tiene efecto sobre el crecimiento tumoral en modelos murinos de tumores subcutáneos (SSC VII y M21). Por otra parte, su administración oral en dosis de 40 mg/kg en ratas ovariectomizadas no tiene efecto en la función renal y hepática (Mittal y cols., 2017). Además, la administración intraperitoneal de Alda-1 10 mg/Kg en ratones C57BL/6 J no produce daño pancreático ni índices de apoptosis celular (Cao y cols., 2020). Sin embargo, contrario a estos resultados, un estudio de 2018 da cuenta que la infusión continua subcutánea de Alda-1 exacerba la disfunción tubular renal inducida por isquemia/reperfusión debido a la deposición de cristales intratubulares, sin embargo, el riñón que no fue sometido a isquemia mostró una arquitectura e histología normal (Hammad y cols., 2018).

Es por ello que se requiere de un estudio más riguroso sobre la toxicidad de Alda-1, aspecto fundamental en la proyección que podría tener esta sustancia para su uso en humanos. Así como también determinar si el potencial efecto protector de Alda-1 frente al daño en el ADN inducido por estresores oxidativos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **1.6. Determinación de la toxicidad de un fármaco**

La seguridad farmacéutica es un factor esencial en el desarrollo de nuevos medicamentos. Si bien la eficacia del compuesto tiene gran relevancia, por sí sola no es suficiente para lograr una medicación exitosa (Bácskay y cols., 2017). En pruebas preclínicas, problemas con respecto a la toxicidad y seguridad representan el 54% de las fallas en el desarrollo de nuevos fármacos (Segall y Barber, 2014).

Históricamente, el estudio de la toxicidad de fármacos se realiza primariamente en modelos animales. Aunque estos modelos tienen la capacidad de proporcionar una gran cantidad de

información útil para la evaluación de fármacos, son relativamente caros, de bajo rendimiento y presentan implicancias éticas (Zang y cols., 2012). En comparación con los estudios en animales, las pruebas basadas en células son más fáciles de realizar, reproducir y controlar en sus condiciones experimentales, menos costosas y sin implicaciones éticas (Mahto y cols., 2010).

Para los sistemas de cultivo celular *in vitro*, un compuesto o tratamiento se considera citotóxico si altera significativamente la morfología, afecta negativamente la tasa de crecimiento celular o causa la muerte celular (Niles y cols., 2008). Según lo estipulado por el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD), una célula es considerada muerta cuando cumple uno de los siguientes criterios moleculares o morfológicos: i) la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática, ii) la célula, incluido su núcleo, se ha fragmentado en cuerpos apoptóticos o iii) sus fragmentos han sido engullidos por una célula adyacente *in vivo* (Kroemer y cols., 2009).

Actualmente, la respuesta celular frente un compuesto se examina mediante las alteraciones morfológicas, el daño a la membrana, las irregularidades en los procesos bioquímicos y la condensación nuclear, utilizando las metodologías mostradas en la **Tabla 1**. De esta forma se puede evaluar los riesgos potenciales asociados con un producto químico. Es importante señalar que la manifestación de estos efectos depende en gran medida de la duración de la exposición y del mecanismo de la citotoxicidad (Niles y cols., 2008).

**Tabla 1. Listado de ensayos de citotoxicidad usados para la detección de daño celular**

Parámetros Celulares	Ensayos de Citotoxicidad
Número de células viables	Azul de Tripán, ensayo de tinción con azul de metileno, Hoechst, ensayo ALP, resazurina, sulforodamina B.
Viabilidad celular	Ensayo LDH, Alamar blue, cristal violeta, diacetato de fluoresceína, Calceína-AM, sensor de redox.
Permeabilidad de membrana	MTT, LDH, anexina, ensayos basados en granzimas, ensayos basados en caspasas.
Función metabólica	MTT, WST-1, MTS.
ATP celular	Ensayos luminiscentes basados en ATP.
Glucosa	Análogos fluorescentes de glucosa.
Calcio intracelular	Ensayo de sondas Fluo-322, Fluo-422.
Actividad lisosomal	Ensayo de rojo neutro, actividad de catepsina D, ensayos basados en granzimas.
Estructura nuclear	Tinción con yoduro de propidio, homodímero de etidio, BrdU, DAPI, Hoescht, ensayo TUNEL
Proteínas celulares totales	Ensayo SRB

ALP: Fosfatasa alcalina, LDH: Lactato deshidrogenasa, MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, WST-1: 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno disulfonato, MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, ATP: Adenosin trifosfato, BrdU: Bromodesoxiuridina, DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, SRB: Sulforodamina B. Adaptado de Mahto y cols. (2010).

Las pruebas de toxicología genética se han convertido en un requisito reglamentario para todas las sustancias químicas nuevas, debido a que la carcinogenicidad y efectos hereditarios se consideran una de las principales preocupaciones públicas. La genotoxicidad es un término que se refiere a cualquier cambio perjudicial en el material genético independiente del mecanismo por cual se induce dicho cambio, por lo que la toxicidad genética abarca más que solo la mutagenicidad de un compuesto, si no que incluye otro tipo de daños al ADN, como aberraciones cromosómicas o rompimiento de hebras (Müller y cols., 1999; Turkez y cols., 2017).

Diversas pruebas de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* han sido diseñadas para detectar mutaciones genéticas o daño cromosómico a mayor escala. En general una batería estándar de ensayos incluye i) la evaluación de la mutagenicidad mediante pruebas de reversión de mutaciones en bacterias y ii) la evaluación de genotoxicidad en células de mamíferos *in vitro* y/o *in vivo* (Guideline I. H. T, 2011). Algunos de los ensayos utilizados se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Listado de ensayos utilizados para evaluar genotoxicidad**

Parámetro	Ensayo
<b>Mutagenicidad</b>	Test de Ames, ensayo de linfoma de ratón, mutación de HPRT en células de mamíferos o animales transgénicos.
<b>Genotoxicidad (sin mutagenicidad)</b>	Test de aberración cromosómica, micronúcleos, ensayo del cometa, intercambio de cromátidas hermanas, síntesis de ADN no programada.

HPRT: Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa. Información extraída de Turkez y cols. (2017)

Considerando la falta de datos acerca de la toxicidad de Alda-1 y sus efectos protectores mencionados anteriormente, en este trabajo se propone realizar estudios *in vitro* para demostrar la hipótesis de que concentraciones micromolares de Alda-1 no generan efectos tóxicos metabólicos ni genéticos en cultivos celulares.

## **2. HIPÓTESIS**

El compuesto Alda-1 no es tóxico a concentraciones farmacológicamente activas en cultivos de células de origen hepático (HepG2), neuronal (SH-SY5Y), fibroblastos (C3H/10T1/2) y renal (HEK-293) y ejerce protección frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la citotoxicidad y genotoxicidad de Alda-1, y el grado de protección que ejerce Alda-1 frente al daño genotóxico inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos de células de origen hepático (HepG2), neuronal (SH-SY5Y), fibroblastos (C3H/10T1/2) y renal (HEK-293).

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la citotoxicidad de distintas concentraciones de Alda-1 ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M) en cultivos de células HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 mediante ensayos de exclusión de azul de tripán, reducción de MTS y liberación de LDH.
2. Evaluar la genotoxicidad de Alda-1 en cultivos de células HepG2 y SH-SY5Y mediante ensayos de cometa.
3. Determinar si Alda-1 (20-100  $\mu$ M) protege frente al daño genotóxico inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 5. MATERIALES

### 5.1.Líneas celulares

Se utilizaron 4 líneas celulares: HEK-293 (ATCC CRL-1573) de riñón de embrión humano, HepG2 derivadas de un hepatocarcinoma humano (ATCC HB-8065), ambas provenientes de American Type Collection Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU. La línea celular SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) de origen de neuroblastoma humano, proporcionada por el Dr. Mario Faúndez, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile y C3H/10T1/2 (ATCC CCL-226), de morfología de fibroblasto de ratón, que fue suministrada por el Dr. Marcelo Kogan, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

### 5.2.Reactivos de cultivo celular

De Gibco (Grand Island, NY, EE. UU): medios de cultivo DMEM (#12800058), DMEM/F-12 (#12500-039), y DMEM F12 sin rojo fenol (#21041025), tripsina-EDTA 0,25% (#25200072), penicilina 10.000 U/mL-estreptomicina 10.000 µg/mL (#15140122) y suero fetal bovino (#10437028).

### 5.3.Reactivos generales

De Merck (Darmstadt, Alemania): Ácido acético glacial, cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato di-ácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sodio (NaOH), metanol, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.): Agarosa de bajo punto de fusión, bromuro de etidio, cloruro de yodo tetrazolio (INT), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), N-lauroilsarcosina de sodio, tritón X-100; de Lonza (Cohasset, MN, EE.UU.): Agarosa; de Winkler (Lampa, Santiago, Chile): Cloruro de sodio, EDTA sal disódica; de Chemix (Farmalatina, Lampa, Santiago, Chile): Ácido clorhídrico (HCl); de Riedel de Haen (Seelze, Alemania): Bicarbonato de sodio; de Chemcruz (Dallas, TX, EE.UU): (L+)-ácido láctico, nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), tris -HCl; de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EE.UU): Dimetilsulfóxido (DMSO); de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU): fosfato ácido de sodio; de Promega (Madison, WI, EE.UU); sal de tetrazolio MTS,

metilsulfato de fenazinio (PMS); de VWR Life science (AMRESCO, Fountain Parkway Solon, OH, EE.UU); De Gibco BRL (Grand Island, NY, EE. UU): Azul de tripán.

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).

## **6. MÉTODOS**

### **6.1. Cultivo de líneas celulares**

Las células HEK-293, HepG2 y C3H/10T1/2 se cultivaron en medio DMEM, suplementado con 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, esterilizado mediante filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemania) y complementado con 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomicina y suero fetal bovino al 10%.

En el caso de las células SH-SY5Y estas fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 (1:1), suplementado con 2,4 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, esterilizado y complementado con antibióticos y suero fetal bovino en las mismas condiciones anteriores.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora Series 8000 WJ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron en placas de poliestireno de 100 x 20 mm (Corning, NY, EE. UU.) hasta que alcanzaran una confluencia del 80%, para luego realizar un traspaso, iniciando un nuevo ciclo de cultivo. El traspaso se realizó retirando el medio de cultivo, lavando las células con 2 mL de PBS (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4) (a excepción del cultivo de células HEK-293 donde se omitió este paso) para retirar cualquier resto de medio, y luego añadiendo 1 mL de tripsina-EDTA 0,25%. Se incubó a 37°C por 5 minutos, luego se agregaron 4 mL de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y mediante pipeteo se desprendieron completamente las células de la placa. Se tomó una cantidad adecuada de células para traspasarlas a una nueva placa de cultivo conteniendo 13 mL de medio completo. Después, se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.2. Sembrado de células para ensayos de toxicidad**

Para los ensayos de azul de tripán, LDH y cometa se sembraron las distintas líneas celulares en placas de 24 pocillos (Jet Biofil, Guangzhou, China). El número de células sembradas varió de una línea celular a otra, siendo 100.000, 60.000, 30.000 y 36.000 células/pocillo para las células HEK-293, HepG2, SH-SY5Y y C3H/10T1/2, respectivamente, en un volumen total de 400 µL. En el caso del ensayo de reducción de MTS se utilizaron placas de 96 pocillos (Corning, NY, EE. UU). Para ello se sembraron 15.000 y 10.000 para las líneas

celulares HEK-293 y HepG2, mientras que para las células SH-SY5Y y C3H/10T1/2 se sembraron 5.000 células/pocillo. El volumen total de medio en cada pocillo fue de 100  $\mu$ L.

### **6.3. Ensayo de exclusión azul de tripán**

De cada pocillo se recolectó el medio en tubos de 1,5 mL (Jet Biofil, Guangzhou, China). Se realizó un lavado con 160  $\mu$ L de PBS (excepto en la línea celular HEK-293, donde se omitió este paso) que también se recolectó en el mismo tubo de 1,5 mL. Las células se desprendieron agregando 80  $\mu$ L de tripsina-EDTA 0,25% e incubando por 5 minutos a 37°C, luego se añadieron 320  $\mu$ L de medio completo para inactivar la tripsina. Mediante pipeteo se soltaron las células y todo fue recolectado en el mismo tubo de 1,5 mL. Los tubos se centrifugaron a 100 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de PBS. Las células fueron mezcladas con azul de tripán 0,4 % en una razón 1:1 (10  $\mu$ L células + 10  $\mu$ L azul de tripán), se incubó por un minuto y luego se contó en cámara de Neubauer el número de células vivas y muertas (azules).

### **6.4. Ensayo reducción de MTS**

Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se realizó un lavado con 50  $\mu$ L de PBS. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de medio DMEM F12 sin rojo fenol y 20  $\mu$ L de la solución MTS/PMS (1 mL de MTS 2 mg/mL +50  $\mu$ L PMS 0,92 mg/mL en DPBS (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 0,5mM, CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 0,9 mM, pH 7,35)). La placa se incubó protegida de la luz a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 3 horas, y posteriormente se midió la absorbancia a 490 (producto de reducción de MTS) y 655 nm (absorbancia celular) en lector de microplacas Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, VT, USA). Los valores de absorbancia a 490 nm de cada replicado fueron corregidos a través de la resta de la absorbancia del blanco y la absorbancia individual observada a 655 nm. Luego se obtuvo el promedio de las réplicas para cada punto experimental. Para establecer una varianza para el control sin tratar, los promedios de cada punto experimental fueron divididos por la sumatoria de los promedios de todos los puntos experimentales. El porcentaje relativo de reducción de MTS para cada punto experimental se expresó como porcentaje del control sin tratar.

### **6.5. Medición de actividad de lactato deshidrogenasa**

De cada pocillo se tomaron 50  $\mu$ L de medio de cultivo y 50  $\mu$ L de lisado celular. Para obtener el lisado celular, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 400  $\mu$ L de solución de lisis (Tritón x-100 al 0,1% en medio completo) y se homogenizó mediante pipeteo.

Las alícuotas de medio de cultivo o lisado celular se mezclaron con 50  $\mu$ L de mix de reacción (INT 0,66 mM; Tris HCl 0,2 M pH 8,2; (L+) -ácido láctico 54 mM; NAD<sup>+</sup> 1,3 mM y PMS 0,28 mM) y se incubaron a 37°C durante 20 minutos, protegido de la luz. La reacción se detuvo agregando 100  $\mu$ L de ácido acético 1 M e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm en lector de microplacas Epoch (Biotek instruments, Winooski, VT, USA). El porcentaje de liberación de LDH se calculó comparando la absorbancia del medio de cultivo (restándole el valor del blanco) con respecto a la absorbancia total (del medio de cultivo + lisado intracelular).

### **6.6. Ensayo del cometa**

Se tomaron portaobjetos de vidrio (25,4 x 76,2 mm) lo que fueron sumergidos en solución de agarosa de punto de fusión normal al 1% en PBS y se secaron a 50°C en estufa (Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Este paso se realizó dos veces, para obtener dos capas de agarosa.

Luego de 1 y 6 horas post-tratamiento de los cultivos celulares se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, se lavó con 160  $\mu$ L de PBS y posteriormente se incubó a 37°C con 80  $\mu$ L de tripsina durante 5 minutos. Se añadieron 320  $\mu$ L de medio completo, se soltaron las células mediante pipeteo y se recolectaron en tubos de 1,5 mL. Se centrifugó a 100 x g durante 5 minutos y luego las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de medio.

Se tomó una alícuota de 15  $\mu$ L de células para mezclarlas con 75  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en PBS, previamente entibiada a 37°C. La mezcla se agregó a un portaobjetos preparado con dos capas de agarosa de punto de fusión normal y se dejó gelificar por 20 minutos a 4°C.

Los portaobjetos se incubaron en solución de lisis (NaCl 2,5 M; Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris Base 10 mM, Tritón x-100 al 1% y N-lauroilsarcosina de sodio al 0.1%, pH 10) a 4°C toda la noche, protegidos de la luz.

Se realizaron dos lavados con PBS frío de 5 minutos cada uno (sumersión), y posteriormente se colocaron los portaobjetos en la cámara de electroforesis (CBS Scientific, San Diego, CA, EE. UU) se agregó aproximadamente 400 mL de buffer de electroforesis frío (NaOH 0,3 N; EDTA 1 mM pH >13), se cubrió la cámara con hielo y se dejó incubar durante 20 minutos. Luego, se realizó una electroforesis a 19V durante 20 minutos, se retiraron los portaobjetos y se lavaron 3 veces mediante sumersión en buffer de neutralización (Tris HCl 0,4 M pH 7,5) durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, se agregaron 15 µL de bromuro de etidio 2 µg/mL sobre la agarosa y se cubrió con un cubreobjeto redondo (25 mm). Antes de 24 horas los portaobjetos fueron observados utilizando el filtro de excitación G (480-550 nm) del sistema iluminador de fluorescencia reflejada Olympus CKX-RFA (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japón) del microscopio invertido Olympus CKX41 (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japón), asociado a una fuente de fluorescencia Olympus U-RFL-T (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japón). Las capturas fotográficas se realizaron con un objetivo 10X utilizando una cámara Nikon DS-Fi2 (Nikon, Tokio, Japón).

El daño en el ADN fue evaluado mediante la determinación del índice de daño (ID), utilizando 5 categorías; clase 0 (sin daño), clase 1 (poco daño, con la longitud de la cola más corta que el diámetro del núcleo), clase 2 (daño medio, con longitud de la cola una vez mayor que el diámetro del núcleo), clase 3 (daño significativo con la longitud de la cola dos veces mayor que el diámetro del núcleo) y clase 4 (daño significativo con la longitud de la cola tres veces mayor que el diámetro del núcleo) (Şimşek y cols., 2020).

Para calcular el ID por cada tratamiento se utilizó la fórmula:

$$ID = N1*1 + N2*2 + N3*3 + N4*4$$

En donde N1, N2, N3 y N4 corresponden al número de células con daño en el ADN de clase 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Por cada tratamiento se analizaron 50 cometas, por lo tanto, el ID máximo a alcanzar sería de 200.

### **6.7. Análisis Estadísticos**

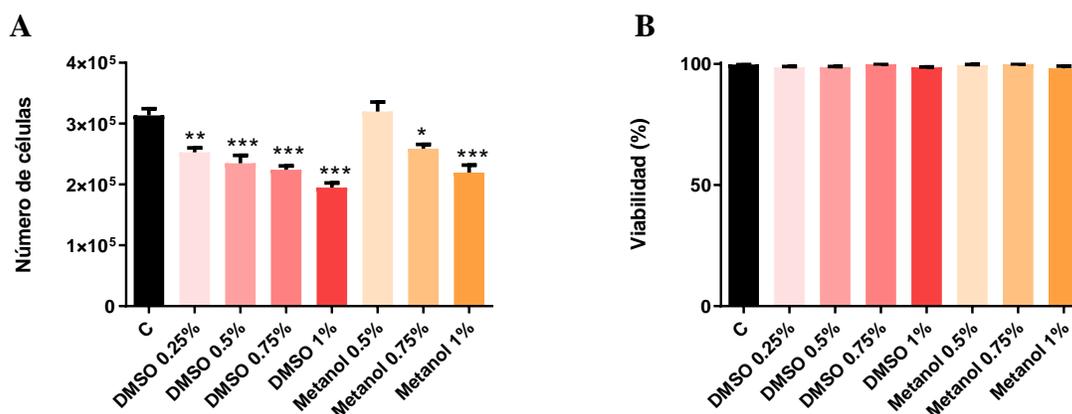
Para cada ensayo se realizaron tres experimentos independientes con tres (ensayos de citotoxicidad) o dos (ensayo del cometa) réplicas cada uno. Los datos se expresaron como promedio ± SEM y se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett o ANOVA de dos vías seguida de la prueba *post hoc* de Sidak, según se indique.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Selección del solvente de Alda-1 para los ensayos de citotoxicidad

Debido a que Alda-1 es una molécula lipofílica ( $\log P = 4$ ), éste presenta una solubilidad adecuada en solventes orgánicos, por lo que seleccionó DMSO y metanol debido a su capacidad de disolver Alda-1 y su amplio uso en estudios de química medicinal (Alfonsi y cols., 2008). Un primer ensayo se diseñó para evaluar los efectos de distintas concentraciones de estos solventes en la proliferación y viabilidad de células HEK-293, considerando que esta línea celular es mucho más sensible para desprender las células que las demás líneas celulares. Para ello las células fueron tratadas por 24 horas con distintas concentraciones finales en el medio de cultivo de DMSO (0; 0,25%; 0,5%; 0,75 y 1% v/v) y metanol (0; 0,5%, 0,75% y 1% v/v), y posteriormente se determinó el número de células totales (mediante conteo en Cámara de Neubauer) y el porcentaje de viabilidad mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán. En este último ensayo, sólo las células vivas con membrana celular intacta pueden excluir el colorante, mientras que células muertas o con membrana defectuosa, no excluyen el colorante y pueden ser visualizadas al microscopio de color azul (Strober, 2015). Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa en el número de células (desde un 20 a 30%) con relación al control, luego de la incubación con DMSO a todas las concentraciones utilizadas (ANOVA de una vía;  $F_{(7, 16)} = 17,55$ ;  $p < 0,0001$ ) y solo una disminución significativa en el número de células en los cultivos tratados con metanol a concentraciones mayores o iguales a 0,75% v/v ( $p < 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnet) (**Figura 3A**). En cuanto a la viabilidad no hubo variación en este parámetro en ninguna de las concentraciones de solvente utilizadas en relación al control ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnet) (**Figura 3B**), lo que indica que a pesar de que no hay cambios en cuanto al porcentaje de células vivas, si hay una diferencia en la proliferación de las células tratadas con DMSO y ciertas concentraciones de metanol. Es por ello que para los ensayos de citotoxicidad de Alda-1 se decidió utilizar metanol a una concentración final de 0.5% como vehículo, ya que es la única condición que no produjo cambios en proliferación y viabilidad celular respecto del control sin tratar.



**Figura 3. Proliferación y viabilidad de células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de DMSO y metanol.**

Número de células (A) y porcentaje de viabilidad (B) de células HEK-293 incubadas por 24 horas con distintas concentraciones de DMSO y metanol. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres réplicas. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett. \* =  $p < 0,05$  vs control (C; células sin tratar). \*\* =  $p < 0,01$  vs C. \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C.

## 7.2. Optimización del número de células sembradas para cada línea celular

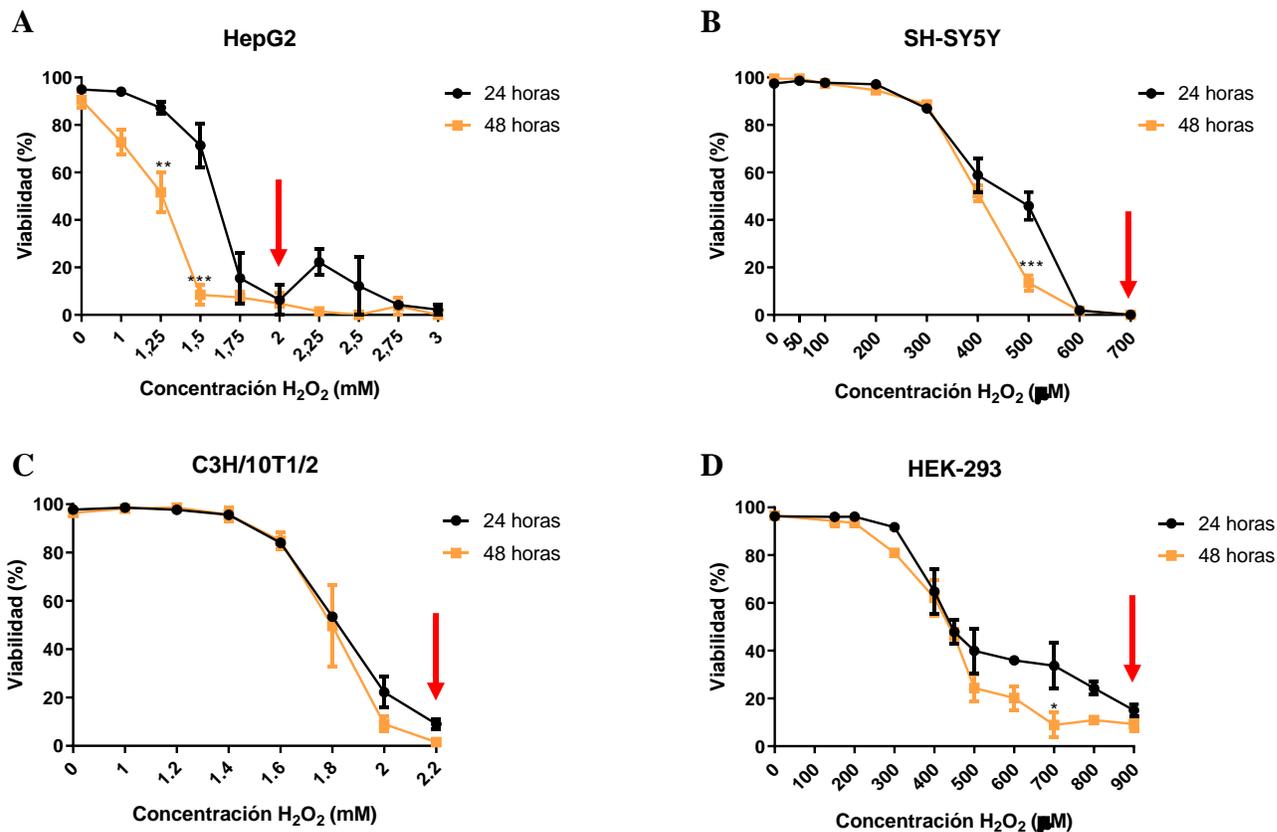
Debido a que la velocidad de proliferación para cada línea celular es distinta, se realizó un ajuste en el sembrado para cada tipo celular. Inicialmente se sembraron 100.000 células/pocillos y de acuerdo con la velocidad de proliferación se disminuyó el número de células sembradas de manera que no se excediera el 100% de confluencia a 72 horas y no se produjera muerte celular por estrés debido a la falta de espacio. De esta forma, se determinó que el número óptimo de células a sembrar fue de 60.000, 30.000, 36.000 y 100.000 células/pocillo (15,6 mm de diámetro) para las líneas celulares HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293, respectivamente.

## 7.3. Optimización de las concentraciones de peróxido de hidrógeno como control positivo de citotoxicidad

El establecimiento de un control positivo de citotoxicidad es necesario para verificar la sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos de toxicidad celular y establecer un punto de comparación relativa para la posible citotoxicidad de Alda-1. De acuerdo a reportes previos

en la literatura se decidió usar como control positivo de citotoxicidad al peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Gülden y cols., 2010). Este compuesto puede fácilmente penetrar las membranas biológicas, y una vez dentro de la célula formar el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) mediante la reacción de Fenton (Halliwell y cols., 2000). El  $\text{OH}\cdot$  es un radical libre altamente reactivo, que puede reaccionar con moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos, causando un daño severo a las células (Phaniendra y cols., 2015). Para determinar las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a utilizar en cada línea celular se realizó una incubación por 24 y 48 horas con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evaluando posteriormente el porcentaje de viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán. Debido a que existe gran variabilidad en la sensibilidad de cada línea celular al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Halliwell y cols., 2000), se determinó la menor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que produjera al menos un 90% de reducción en la viabilidad para cada linaje celular utilizado tanto a 24 como a 48 horas post exposición.

En una primera instancia se utilizó un rango de concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  desde 0 a 900  $\mu\text{M}$ , y en el caso de que no se produjera una disminución en la viabilidad, se probó con un rango mayor llegando a un máximo de 3 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En las cuatro líneas celulares utilizadas se observó una disminución de la viabilidad celular al aumentar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se observó también una reducción significativa en la viabilidad cuando las células fueron incubadas en medio con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 48 en comparación a 24 horas en las líneas celulares HepG2 (ANOVA de dos vías:  $F_{(1, 20)} = 47,13$ ,  $p < 0.0001$ ), SH-SY5Y (ANOVA de dos vías:  $F_{(1, 18)} = 12,05$ ,  $p = 0.0027$ ) y HEK-293 (ANOVA de dos vías:  $F_{(1, 22)} = 18,66$ ,  $p = 0.0003$ ) (**Figura 4**). En base al criterio de la mínima concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que generara una reducción del 90% de viabilidad celular, las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  seleccionadas como control positivo de citotoxicidad fueron 2 mM para células HepG2, 700  $\mu\text{M}$  para células SH-SY5Y, 2,2 mM para células C3H/10T1/2 y 900  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para células HEK-293 (**Figura 4**).



**Figura 4. Viabilidad de las líneas celulares a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Porcentaje de viabilidad (medidas a través de tinción con azul de tripán) de células HepG2 (A), SH-SY5Y (B), C3H/10T1/2 (C) y HEK-293 (D) incubadas durante 24 o 48 horas con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos corresponden al promedio ± SEM de dos réplicas por cada concentración. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de dos vías (variables concentración y tiempo) con prueba post hoc de Sidak. \* =  $p < 0,05$  vs 24 horas; \*\*  $p < 0,01$  vs 24 horas; \*\*\* =  $p < 0,001$  vs 24 horas. Flecha roja representa la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seleccionada como control positivo de citotoxicidad en cada línea celular.

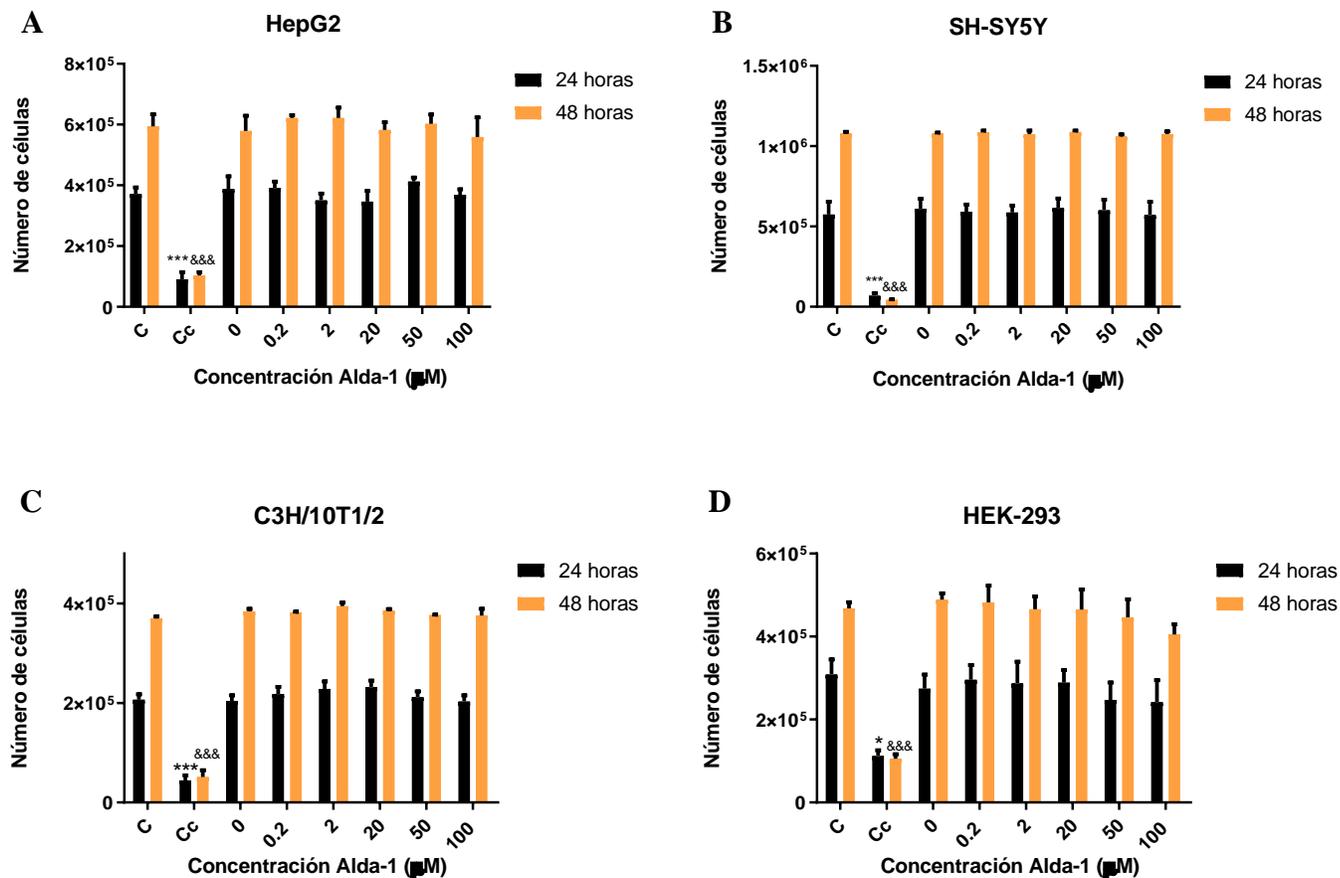
#### 7.4. Determinación de la citotoxicidad de Alda-1 en cultivos celulares

La toxicidad celular de Alda-1 se determinó evaluando el efecto de distintas concentraciones de Alda-1 en el número de células, la viabilidad celular (método de exclusión de azul de tripán), en la función metabólica (ensayo de MTS) y en la permeabilidad de la membrana plasmática (ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa) en cultivos de células HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293.

#### 7.4.1. Efecto de Alda-1 en la proliferación de cultivos celulares

Se realizó una incubación durante 24 y 48 horas de los cultivos celulares con distintas concentraciones de Alda-1 (0; 0,2; 2; 20; 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) disuelto en metanol, las cuales fueron seleccionadas considerando que una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de Alda-1 es suficiente para aumentar la actividad de la ALDH2 tanto *in vitro* como *ex vivo* (Chen y cols., 2008) y estableciendo un límite de 100  $\mu\text{M}$  debido a que el compuesto cristaliza a partir de esta concentración en soluciones acuosas como el medio de cultivo.

Luego de la incubación con Alda-1 se determinó el número de células totales mediante el conteo en cámara de Neubauer. Los datos obtenidos fueron analizados realizando un ANOVA de una vía para comparar los distintos tratamientos, en cada tiempo de incubación. Los resultados mostraron que en todas las líneas celulares, la incubación con distintas concentraciones de Alda-1 no resultó en cambios significativos de la proliferación celular en comparación al control sin tratar (C), tanto a 24 como 48 horas en células (HepG2 24 h:  $F_{(7,16)}=15,56$ ;  $p<0,0001$ ; HepG2 48 h:  $F_{(7,16)}= 9,243$ ;  $p=0,0001$ ; SH-SY5Y 24 h:  $F_{(7,16)}= 9,512$ ;  $p=0,0001$ ; SH-SY5Y 48 h:  $F_{(7,16)}= 788$ ;  $p<0,0001$ ; C3H/10T1/2 24 h:  $F_{(7,16)}= 24,20$ ;  $p<0,0001$ ; C3H/10T1/2 48 h:  $F_{(7,16)}= 229,1$ ;  $p<0,0001$ ; HEK-293 24 h:  $F_{(7,16)}= 2,591$ ;  $p= 0,0544$ ; HEK-293 48 h:  $F_{(7,16)}= 16,24$ ;  $p<0,0001$ ;  $p >0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 5**). En relación al control de citotoxicidad (Cc), se encontró que para todas las líneas celulares se produjo una disminución significativa en la proliferación celular con respecto al control (C) luego de la incubación por 24 y 48 horas con la respectiva concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cc) seleccionada para cada línea celular ( $p <0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 5**).

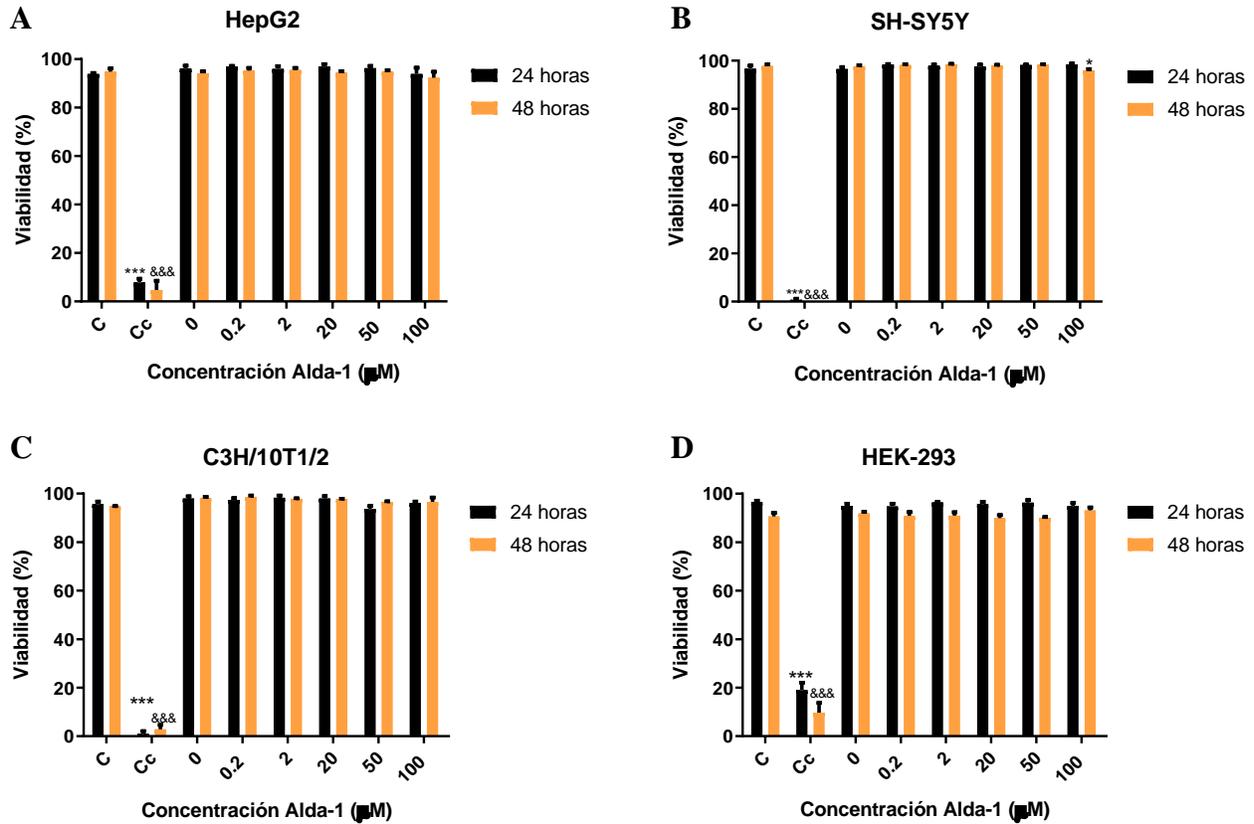


**Figura 5. Proliferación de células tratadas con distintas concentraciones de Alda- 1.**

Número de células de las líneas celulares HepG2 (A), SH-SY5Y (B), C3H/10T1/2 (C) y HEK-293 (D) luego de la incubación durante 24 o 48 horas a distintas concentraciones de Alda-1. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. C = Control (Células sin tratar), Cc= Control de citotoxicidad ( $H_2O_2$  2 mM para HepG2; 700  $\mu$ M para SH-SY5Y; 2,2 mM para C3H/10T1/2 y 900  $\mu$ M para HEK-293). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía para cada tiempo con prueba post hoc de Dunnett. \* =  $p < 0.05$  vs C 24 horas, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C 24 horas. &&&=  $p < 0,001$  vs C 48 horas.

#### 7.4.2. Efecto de Alda-1 sobre la viabilidad de cultivos celulares

Para la determinación del efecto de Alda-1 sobre la viabilidad celular, se incubaron durante 24 y 48 horas cultivos de células HepG2, SH-SY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 con distintas concentraciones de Alda-1 (0; 0,2; 2; 20; 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), además de los respectivos controles. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular (porcentaje de células vivas respecto al total de células) mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán. Los resultados mostraron que la incubación con distintas concentraciones de Alda-1, no resultó en cambios significativos sobre la viabilidad celular para las líneas celulares HepG2, C3H/10T1/2 y HEK-293 en comparación al control sin tratar (C) tanto a 24 como a 48 horas post-tratamiento (ANOVA de una vía HepG2 24 h:  $F_{(7,16)} = 558,4$ ;  $p < 0,0001$ ; HepG2 48 h:  $F_{(7,16)} = 305,3$ ;  $p = 0,0001$ ; C3H/10T1/2 24 h:  $F_{(7,16)} = 1232$ ;  $p < 0,0001$ ; C3H/10T1/2 48 h:  $F_{(7,16)} = 1214$ ;  $p < 0,0001$ ; HEK-293 24 h:  $F_{(7,16)} = 374,3$ ;  $p < 0,0001$ ; HEK-293 48 h:  $F_{(7,16)} = 246,5$ ;  $p < 0,0001$ );  $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 6A, 6C y 6D**). Con respecto a la línea celular SH-SY5Y, solo la incubación con 100  $\mu\text{M}$  de Alda-1 durante 48 horas produjo una disminución en la viabilidad celular con respecto al control sin tratar (C) (96% vs 98%) (ANOVA de una vía 24 h:  $F_{(7,16)} = 2406$ ;  $p < 0,0001$ ; 48 h:  $F_{(7,16)} = 8247$ ;  $p < 0,0001$ ) ( $p < 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 6C**). En relación al control positivo de citotoxicidad (Cc), se encontró que la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultó en una disminución significativa en la viabilidad celular con respecto al control sin tratar (C) en todas las líneas celulares, y a los dos tiempos estudiados ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 6**).



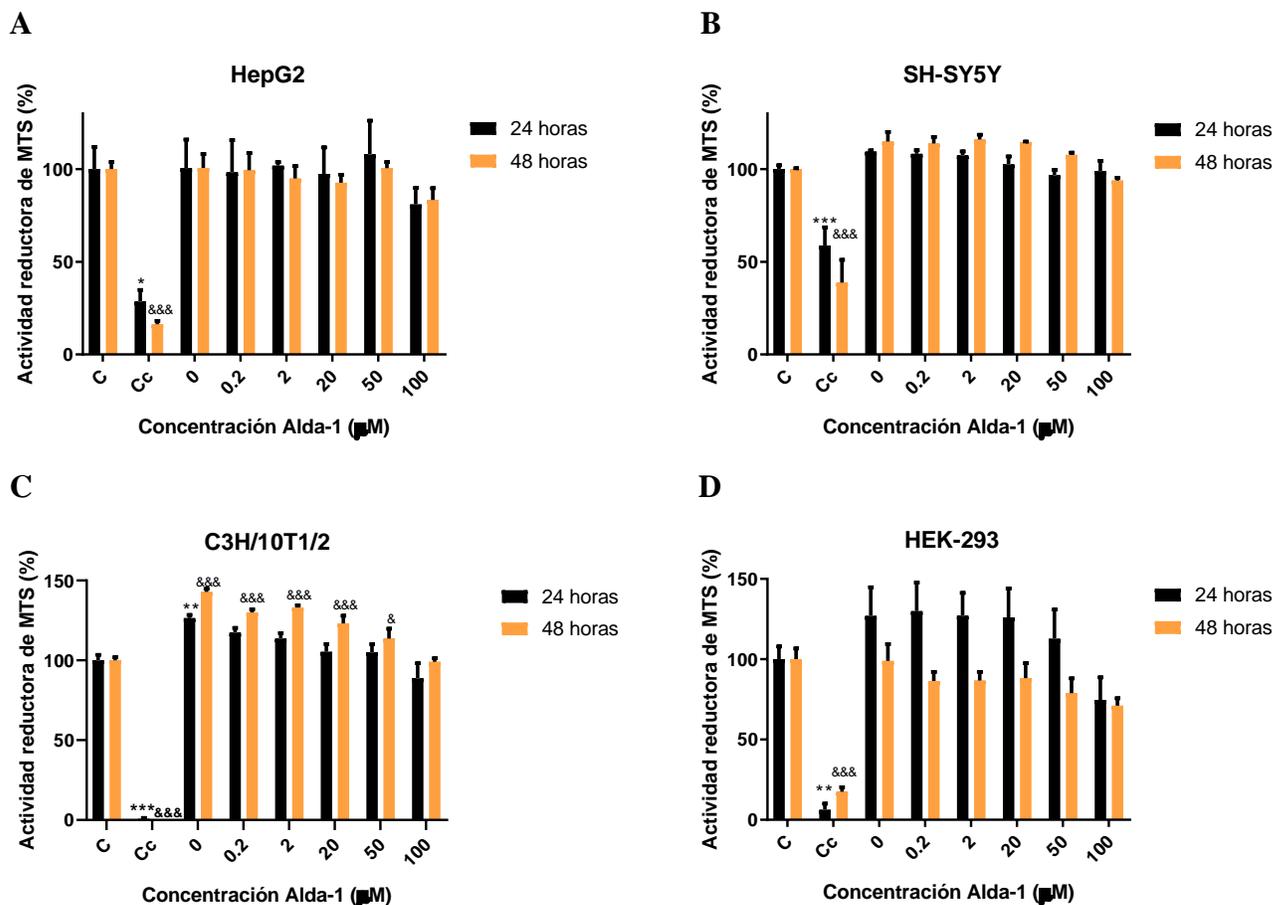
**Figura 6. Viabilidad de células tratadas con distintas concentraciones de Alda-1.**

Porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 (A), SH-SY5Y (B), C3H/10T1/2 (C) y HEK-293 (D) luego de incubación por 24 y 48 horas con Alda-1 a diversas concentraciones. La viabilidad se determinó mediante la tinción celular con azul de tripán. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. C = Control (Células sin tratar), Cc = Control de citotoxicidad ( $H_2O_2$  2 mM para HepG2, 700  $\mu$ M para SH-SY5Y, 2,2 mM para C3H/10T1/2 y 900  $\mu$ M para HEK-293). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía para cada tiempo con prueba post hoc de Dunnett, para cada tiempo de incubación. \* =  $p < 0,05$  vs C 24 horas. \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C 24 horas. &&& =  $p < 0,001$  vs C 48 horas.

### 7.4.3. Efecto de Alda-1 sobre la función metabólica de cultivos celulares

Luego de la incubación durante 24 y 48 horas con distintas concentraciones de Alda-1, se determinó la viabilidad de las líneas celulares en función de la actividad mitocondrial medida a través del ensayo de reducción de MTS. Los datos normalizados (ver Métodos 5.4) de la actividad reductora de MTS de las células para cada tratamiento se expresaron como un

porcentaje relativo al control sin tratar (C). Los resultados mostraron que no se producen variaciones significativas en la actividad reductora de MTS luego de la incubación con las distintas concentraciones de Alda-1 y a ambos tiempos estudiados en las líneas celulares HepG2, SH-SY5Y y HEK-293 ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett; ANOVA de una vía para todos los datos HepG2 24 h:  $F_{(7,16)} = 3,968$ ;  $p = 0,0106$ ; HepG2 48 h:  $F_{(7,16)} = 24,04$ ;  $p < 0,0001$ ; SH-SY5Y 24 h:  $F_{(7,16)} = 26,86$ ;  $p < 0,0001$ ; SH-SY5Y 48 h:  $F_{(7,16)} = 12,72$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ; HEK-293 24 h:  $F_{(7,16)} = 8,198$ ;  $p = 0,0003$ ; HEK-293 48 h:  $F_{(7,16)} = 19,57$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 7A,7B, 7D**). En cuanto a la línea celular C3H/10T1/2 se observó que la incubación con Alda-1 en concentraciones hasta 50  $\mu\text{M}$  produjo un aumento significativo en la actividad reductora de MTS respecto al control sin tratar (C) a 48 horas post-tratamiento ( $p < 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett; ANOVA de una vía C3H/10T1/2 24 h:  $F_{(7,16)} = 70,11$ ;  $p < 0,0001$ ; C3H/10T1/2 48 h:  $F_{(7,16)} = 198,3$ ) (**Figura 7C**). También se observó un aumento de 25% y 40% en la actividad reductora de MTS respecto al control (C), luego de la incubación con el control vehículo (0  $\mu\text{M}$  de Alda-1) a 24 horas y 48 horas post-tratamiento, respectivamente ( $p < 0,01$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 7C**). Con relación al control positivo citotoxicidad, en todas las líneas celulares se produjo una disminución significativa en la actividad reductora de MTS con respecto al control sin tratar (C) tanto a 24 como 48 horas post-tratamiento ( $p < 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 7**)



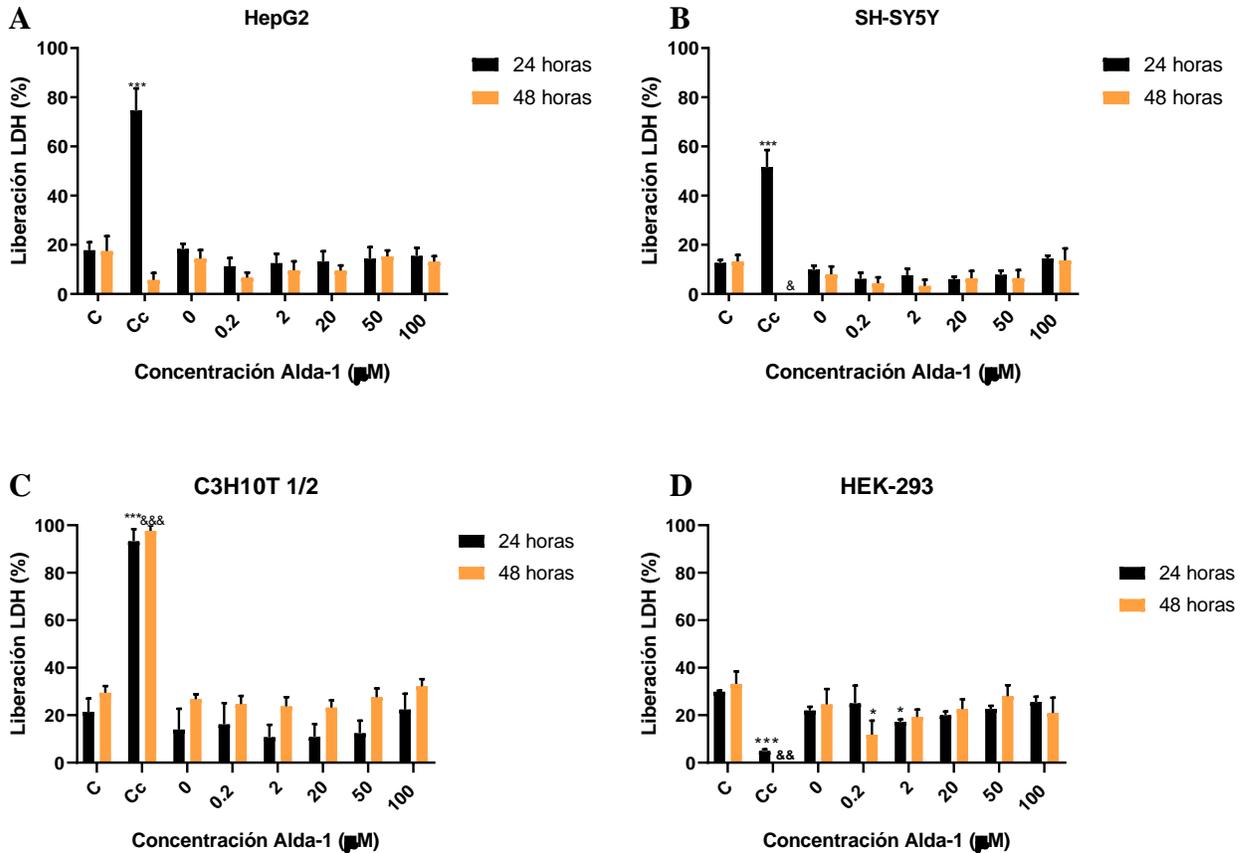
**Figura 7. Actividad reductora de MTS en células HepG2, SHSY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.**

Actividad reductora de MTS en las líneas celulares HepG2 (A), SH-SY5Y (B), C3H/10T1/2 (C) y HEK-293 (D) luego de la incubación durante 24 o 48 horas con distintas concentraciones de Alda-1. El porcentaje de cada tratamiento se relativizó respecto al control sin tratar (C). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. C = Control, Cc= Control de citotoxicidad ( $H_2O_2$  2 mM para HepG2, 700  $\mu$ M para SH-SY5Y, 2,2 mM para C3H/10T1/2 y 900  $\mu$ M para HEK-293). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett para ambos tiempos de incubación. \* =  $p < 0,05$  vs C 24 horas, \*\* =  $p < 0,01$  vs C 24 horas \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C 24 horas, & =  $p < 0,05$  vs C 48 horas, && =  $p < 0,001$  vs C 48 horas.

#### 7.4.4. Efecto de Alda-1 sobre la permeabilidad de la membrana plasmática

Posterior a la incubación de las células con distintas concentraciones de Alda-1 (0; 0,2; 2; 20; 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 y 48 horas, se determinó si hubo cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática mediante el ensayo de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El porcentaje de liberación de LDH fue calculado considerando la actividad de LDH extracelular (en el medio de cultivo) con respecto a la actividad total (extracelular + intracelular). Los resultados obtenidos mostraron que la incubación durante 24 y 48 horas con Alda-1 a todas las concentraciones utilizadas, no produjo cambios significativos en la liberación de LDH en las líneas celulares HepG2, SH-SY5Y y C3H/10T1/2, respecto al control sin tratar (C) ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett; ANOVA de una vía para todos los datos HepG2 24 h:  $F_{(7,16)} = 20,93$ ;  $p < 0,0001$ ; HepG2 48 h:  $F_{(7,16)} = 0,7311$ ;  $p = 0,6490$ ; SH-SY5Y 24 h:  $F_{(7,16)} = 26,36$ ;  $p < 0,0001$ ; SH-SY5Y 48 h:  $F_{(7,16)} = 2,446$ ;  $p = 0,0657$ ; C3H/10T1/2 24 h:  $F_{(7,16)} = 17,92$ ;  $p < 0,0001$ ; C3H/10T1/2 48 h:  $F_{(7,16)} = 65,32$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 8A, 8B y 8C**). Sólo en la línea celular HEK-293 se produjo una disminución significativa de la liberación de LDH respecto al control (C) luego de la incubación con 0,2  $\mu\text{M}$  de Alda-1 durante 48 horas y 2  $\mu\text{M}$  de Alda-1 durante 24 horas ( $p < 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett; ANOVA de una vía HEK-293 24 h:  $F_{(7,16)} = 6,369$ ;  $p = 0,0011$ ; HEK-293 48 h:  $F_{(7,16)} = 4,266$ ;  $p = 0,0077$ ) (**Figura 8D**).

Respecto al control de citotoxicidad (Cc), luego de la incubación durante 24 horas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produjo un aumento significativo en la liberación de LDH respecto a la del control sin tratar (C) en las líneas celulares HepG2, SH-SY5Y y C3H/10T1/2 ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 8A, 8B y 8C**), sin embargo, luego de la incubación durante 48 horas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este aumento en la liberación de LDH sólo se mantiene en la línea celular C3H/10T1/2 ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 8C**). Por otra parte, en las células HEK-293 tratadas con el control de citotoxicidad (Cc), se observó una disminución significativa en la liberación de LDH respecto al control sin tratar (C) tanto a 24 como 48 horas de tratamiento ( $p < 0,01$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 8D**).

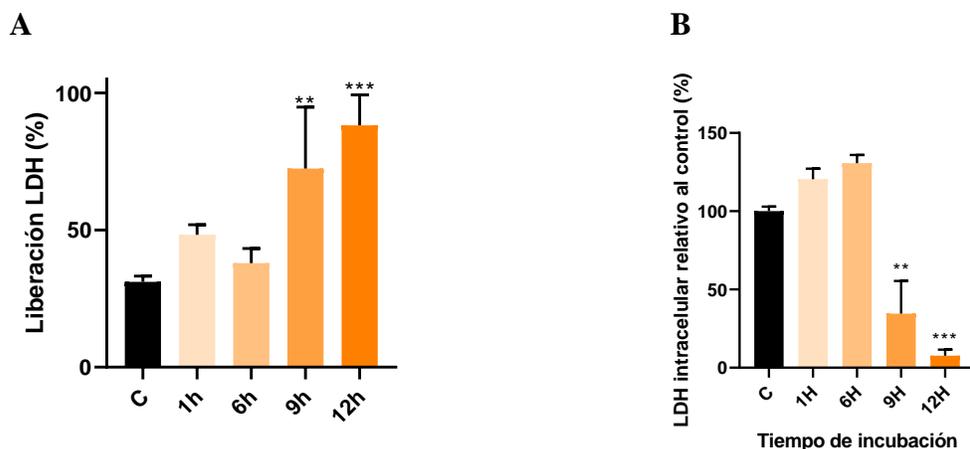


**Figura 8. Liberación de LDH en células HepG2, SHSY5Y, C3H/10T1/2 y HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.**

Liberación de LDH en las líneas celulares HepG2 (A), SH-SY5Y (B), C3H/10T1/2 (C) y HEK-293 (D) luego de la incubación durante 24 o 48 horas con distintas concentraciones de Alda-1. El porcentaje de cada tratamiento se relativizó respecto al control sin tratar (C). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. C = Control, Cc= Control de citotoxicidad ( $H_2O_2$  2 mM para HepG2, 700  $\mu$ M para SH-SY5Y, 2,2 mM para C3H/10T1/2 y 900  $\mu$ M para HEK-293). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett para ambos tiempos de incubación. \* =  $p < 0,05$  vs C 24 horas, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C 24 horas, & =  $p < 0,05$  vs C 48 horas, && =  $p < 0,01$  vs C 48 horas, &&& =  $p < 0,001$  vs C 48 horas.

Debido a que no se produjo un aumento en la liberación de LDH en la línea celular HEK-293 a 24 y 48 horas de incubación con  $H_2O_2$  900  $\mu$ M, se realizó un ensayo para determinar la liberación de LDH inducida por  $H_2O_2$  900  $\mu$ M pero a tiempos más cortos (1, 6, 9 y 12 horas). Los resultados mostraron que se produjo un aumento significativo en la liberación de LDH, respecto al control sin tratar, luego de 9 y 12 horas ( $p < 0,01$ ; prueba post hoc de

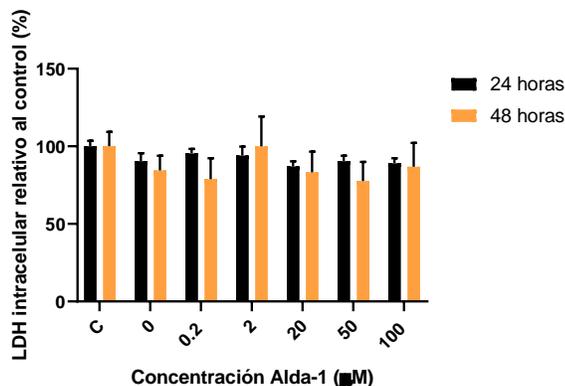
Dunnett; ANOVA de una vía:  $F_{(4,10)} = 12,88$ ;  $p = 0,0006$ ) (**Figura 9A**) lo cual se correlaciona con una disminución significativa de la actividad LDH intracelular ( $p < 0,01$ ; prueba *post hoc* de Dunnett; ANOVA de una vía:  $F_{(4,10)} = 27,82$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 9B**).



**Figura 9. Liberación de LDH y actividad LDH intracelular en cultivo de células HEK-293 incubadas con  $H_2O_2$ .**

*Liberación de LDH (A) y porcentaje de actividad LDH intracelular relativa al control (B) de células HEK-293 incubadas con  $900 \mu M$  de  $H_2O_2$  durante 1, 6, 9 y 12 horas. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres réplicas de un experimento. C = Control; células sin tratar. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Dunnett. \*\* =  $p < 0,01$  vs C, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs C.*

Al analizar la actividad LDH intracelular luego del tratamiento con Alda-1 en la línea celular HEK-293, se observó que no hay cambios significativos en el porcentaje de actividad LDH intracelular respecto al control (C) luego de 24 y 48 horas post-tratamiento, a ninguna de las concentraciones de Alda-1 utilizadas (ANOVA de una vía 24h:  $F_{(6,14)} = 1,209$ ;  $p = 0,3580$  ; 48h  $F_{(6,14)} = 0,4605$ ;  $p = 0,8260$ ) (**Figura 10**).



**Figura 10. LDH intracelular de células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Alda-1.**

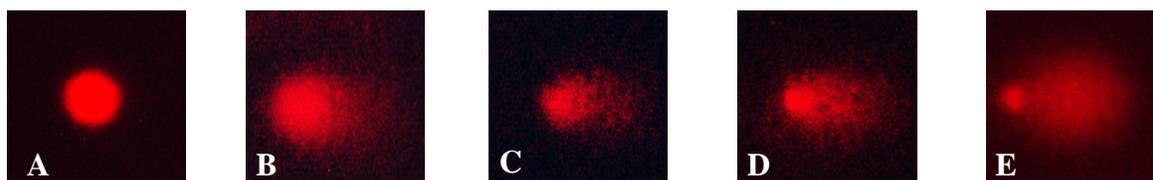
*Porcentaje de actividad LDH intracelular relativa al control de células HEK-293 luego de la incubación durante 24 o 48 horas con distintas concentraciones de Alda-1. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. C = Control; células sin tratar. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett para cada tiempo de incubación.*

### **7.5. Optimización de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como control positivo de genotoxicidad**

Posterior a los ensayos de citotoxicidad se determinó si Alda-1 podía generar efectos genotóxicos a nivel celular. Para ello se determinó el daño en el ADN mediante el ensayo del cometa (electroforesis en gel de célula única) en su versión alcalina. Este ensayo se basa en que células expuestas a agentes genotóxicos y mezcladas con agarosa, al ser tratadas con una solución altamente alcalina, exponen los sitios lábiles alcalinos de su nucleóide, debido al relajamiento del ADN sobreenrollado. De esta forma, los “cortes” en el ADN generados por el agente genotóxico migran hacia el ánodo cuando se exponen a la corriente durante la electroforesis, produciendo así una apariencia de cometa (Nandhakumar y cols., 2010).

Para este ensayo solo se utilizaron células HepG2 y SH-SY5Y, considerando el origen que tienen estas líneas celulares. Células SH-SY5Y tienen origen neuronal, por lo que están asociadas con el órgano blanco donde actúa Alda-1 como posible agente terapéutico para el tratamiento del alcoholismo (Rivera-Meza, y cols., 2019) y células HepG2 tienen origen hepático, el cual es el principal órgano encargado de la metabolización de fármacos y la excreción (vía hepática-biliar) de fármacos liposolubles (Rang y cols., 2012).

Inicialmente se determinó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesaria para visualizar cometas luego de una hora de incubación con este agente, el que es ampliamente utilizado en la literatura como control positivo para el ensayo de cometa (Collins y cols., 1997) (Visvardis y cols, 1997) (Benhusein y cols., 2010). Para ello, células SH-SY5Y y HepG2 fueron incubadas durante 1 hora con las mismas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas en la determinación de su concentración óptima para los ensayos de citotoxicidad (0; 100; 200; 400; 500 y 700 μM para células SH-SY5Y, y 0; 0,5; 1; 1,25; 1,5 y 2 mM para células HepG2). El daño en el ADN fue evaluado mediante la determinación del índice de daño (ID) (ver Métodos 5.6), utilizando 5 categorías, desde clase 0 (sin daño) hasta clase 4 (daño significativo con la longitud de la cola tres veces mayor que el diámetro del núcleo) (**Figura 11**).



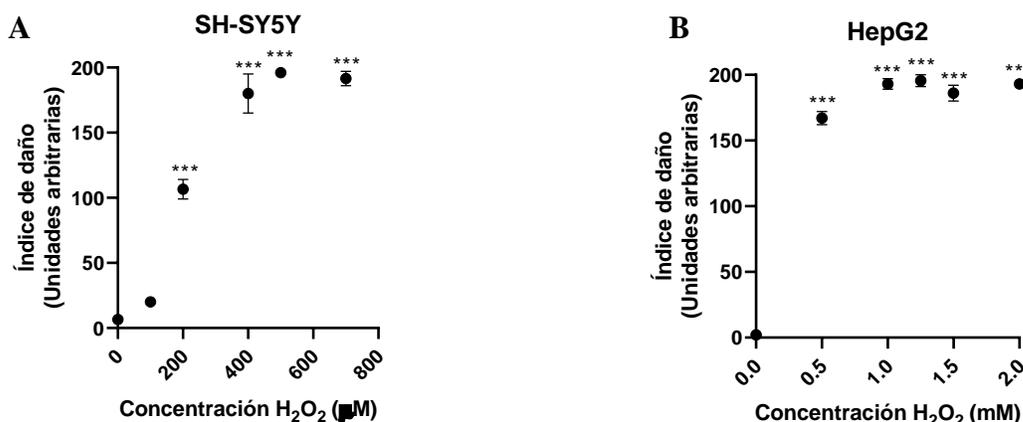
**Figura 11. Categorías de índice de daño en ensayo de cometa.**

*Imágenes de cometas (provenientes de células SH-SY5Y), teñidos con bromuro de etidio. Los cometas representan las categorías de índice de daño 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) y 4 (E).*

Luego de una hora de incubación se observó que en células SH-SY5Y se produjo un aumento significativo en el índice de daño, respecto al control, a partir del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett, ANOVA de una vía  $F_{(5,6)} = 139,4$ ;  $p < 0,0001$ ) alcanzando un ID de  $106,5 \pm 10,607$  (unidades arbitrarias). Además, concentraciones superiores a 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjeron un ID mayor a 180 (unidades arbitrarias) (**Figura 12A**). En cuanto a la línea celular HepG2, se produjo un aumento significativo en el índice de daño, respecto al control, luego de la incubación por una hora con todas las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas, las cuales alcanzaron un ID superior a 160 (unidades arbitrarias) ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett, ANOVA de una vía  $F_{(5,6)} = 316$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 12B**).

Como la mayoría de las concentraciones utilizadas generó altos ID se consideró como segundo parámetro de selección que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjera una reducción en la

viabilidad celular en un porcentaje cercano al 50% luego de la incubación durante 24 horas (**Figura 4**). De esta forma, se estableció como control positivo de genotoxicidad 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la línea celular SH-SY5Y y 1,5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la línea celular HepG2.

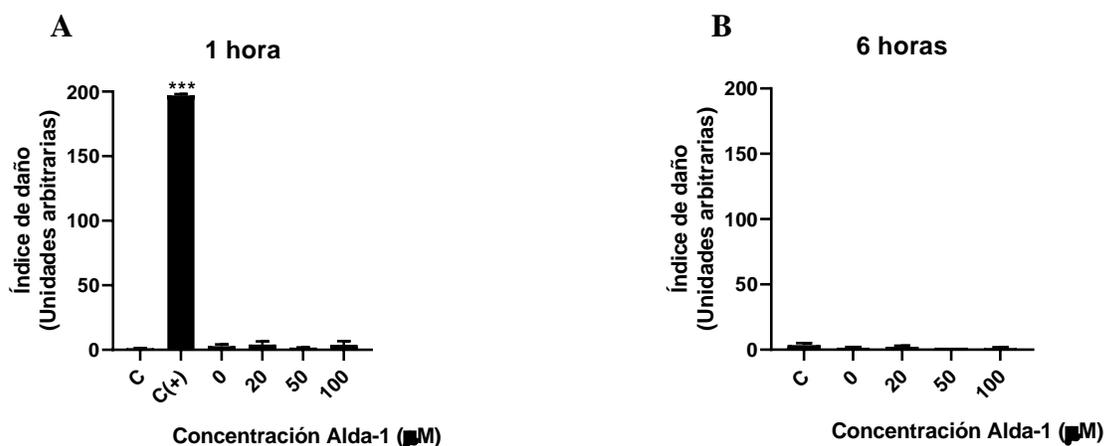


**Figura 12.** Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y y HepG2 expuestas a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y (A) y HepG2 (B) incubadas durante 1 hora a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de dos réplicas por tratamiento, analizando 50 cometas por réplica. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Dunnett. \*\*\*=  $p < 0,001$  vs C.

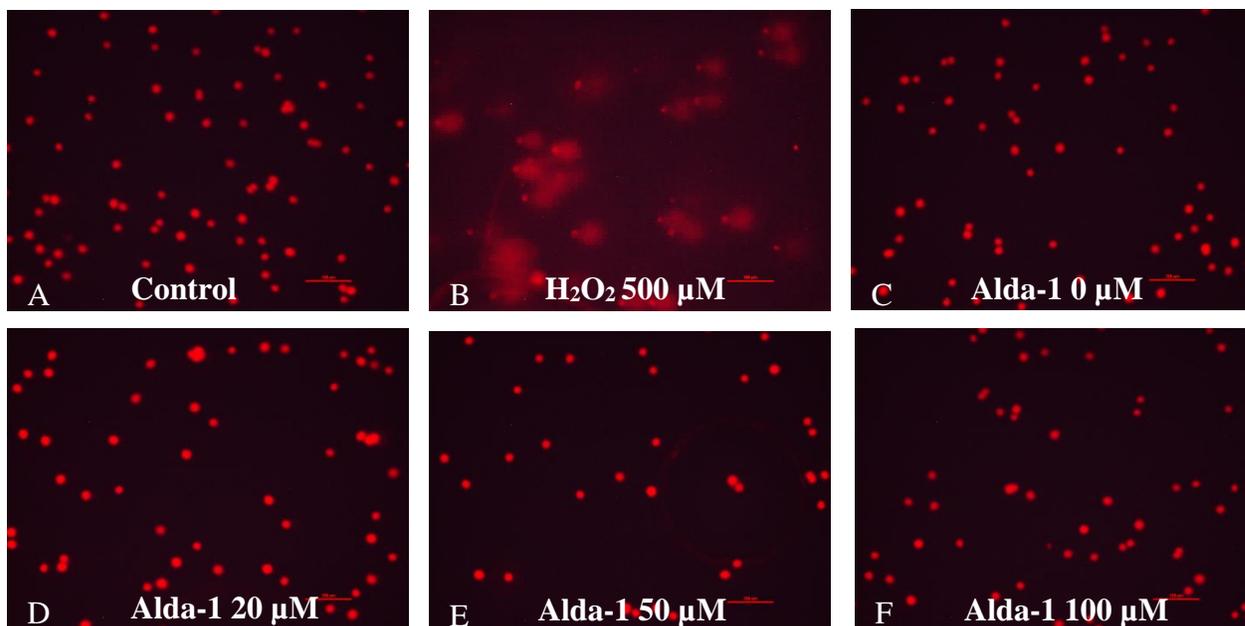
### 7.6. Determinación de la genotoxicidad de Alda-1 en células SH-SY5Y

La genotoxicidad de Alda-1 en células SH-SY5Y se determinó midiendo el índice de daño mediante el ensayo del cometa. Luego de la incubación por 1 y 6 horas con distintas concentraciones de Alda-1 (0, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) se observó que en la línea celular SH-SY5Y no se produjo un aumento significativo en el índice de daño a ambos tiempos de incubación y a ninguna de las concentraciones de Alda-1 utilizadas con respecto al control sin tratar (C) ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett ANOVA de una vía; 1 hora:  $F_{(5,12)} = 2114$ ;  $p < 0,0001$ ; 6 horas:  $F_{(4,10)} = 1,091$ ;  $p = 0,4120$ ), alcanzando ID menores a 10 (unidades arbitrarias) (**Figura 13, 14 y 15**). La incubación durante 1 hora con  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  (C<sub>(+)</sub>) produjo un aumento significativo en el índice de daño con respecto al control sin tratar (C) ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 13A,14B**).



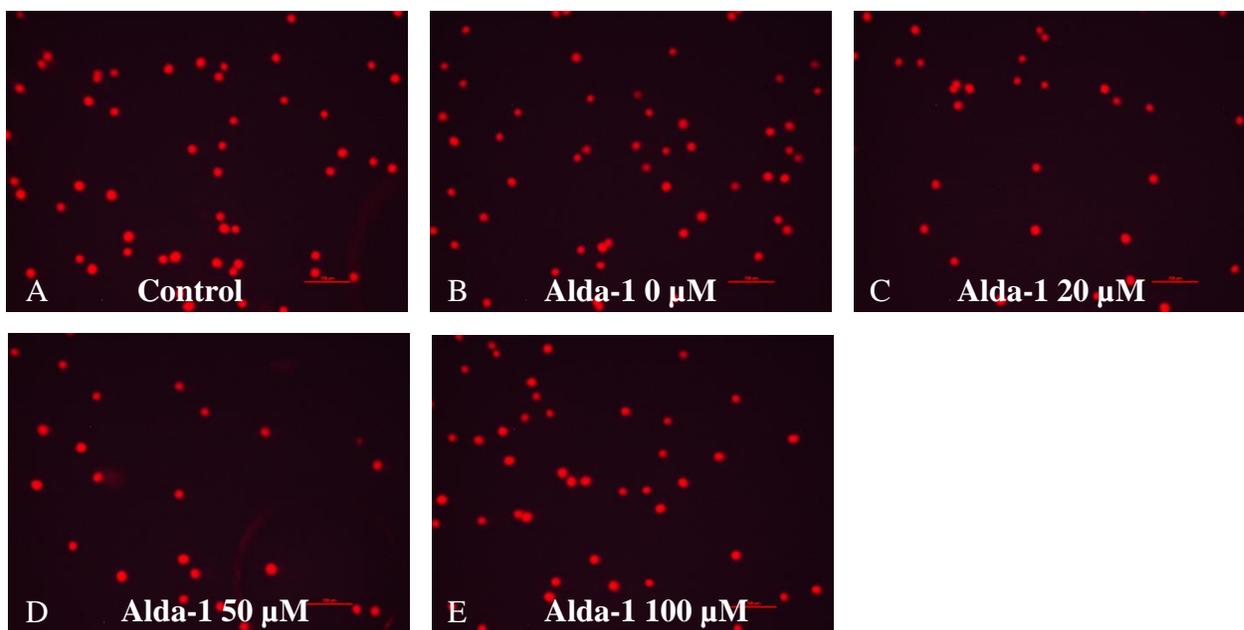
**Figura 13. Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y tratadas con Alda-1.**

Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y luego de la incubación durante 1 hora (A) y 6 horas (B) con distintas concentraciones de Alda-1. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno (analizando 50 cometas por réplica). C = Control; células sin tratar. C(+) = control positivo de genotoxicidad ( $H_2O_2$  500  $\mu$ M). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett. \*\*\*=  $p < 0,001$  vs C.



**Figura 14. Ensayo del cometa en células SH-SY5Y incubadas con Alda-1 durante 1 hora.**

Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células SH-SY5Y sin tratar (A), incubadas durante 1 hora con  $H_2O_2$  500  $\mu$ M (B), Alda-1 0  $\mu$ M (C), 20  $\mu$ M (D), 50  $\mu$ M (E) y 100  $\mu$ M (F). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100  $\mu$ m.

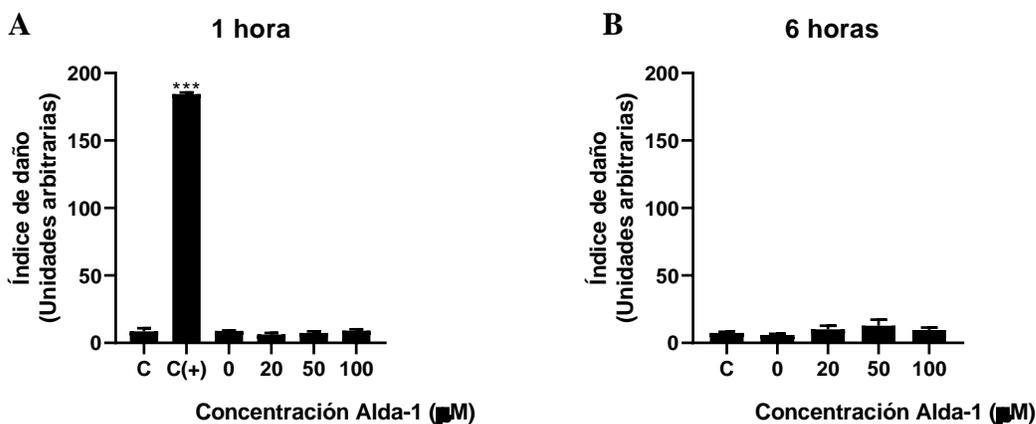


**Figura 15.** Ensayo del cometa en células SH-SY5Y incubadas con Alda-1 durante 6 horas.

Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células SH-SY5Y sin tratar (A), incubadas durante 6 horas con Alda-1 0  $\mu\text{M}$  (B), 20  $\mu\text{M}$  (C), 50  $\mu\text{M}$  (D) y 100  $\mu\text{M}$  (E). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100  $\mu\text{m}$ .

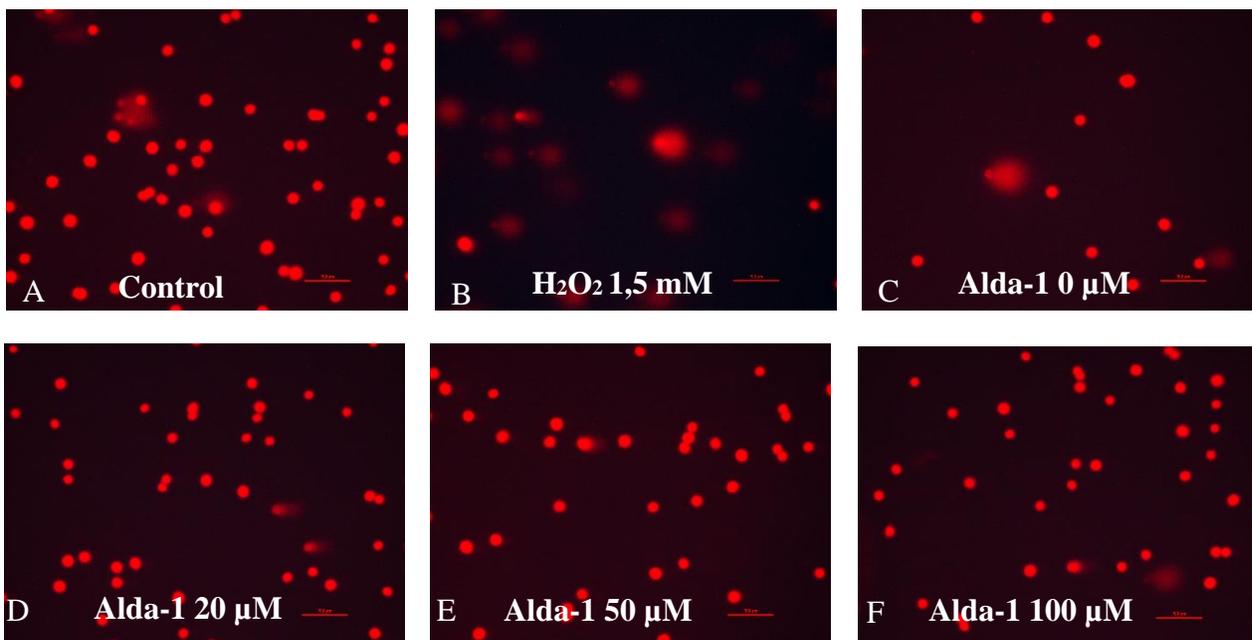
### 7.7. Determinación de la genotoxicidad de Alda-1 en células HepG2

La genotoxicidad de Alda-1 en células HepG2 se determinó midiendo el índice de daño mediante el ensayo del cometa. Luego de la incubación por 1 y 6 horas con distintas concentraciones de Alda-1 (0, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) y los respectivos controles, los resultados mostraron que posterior a la incubación con Alda-1, se produjo un índice de daño menor a 20 (unidades arbitrarias) en todas las concentraciones utilizadas y en ambos tiempos de incubación, por lo que no se produce un aumento significativo con respecto al control sin tratar (C) ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett ANOVA de una vía; 1 hora:  $F_{(5,12)} = 2642$ ;  $p < 0,0001$ ; 6 horas:  $F_{(4,10)} = 1$ ;  $p = 0,4514$ ) (**Figura 16, 17 y 18**). Con respecto al control positivo de genotoxicidad ( $C_{(+)} = \text{H}_2\text{O}_2$  1,5 mM) se produjo un aumento significativo en el ID, con respecto al control sin tratar (C) ( $p < 0,001$ ; prueba *post hoc* de Dunnett) (**Figura 16A, 17B**)



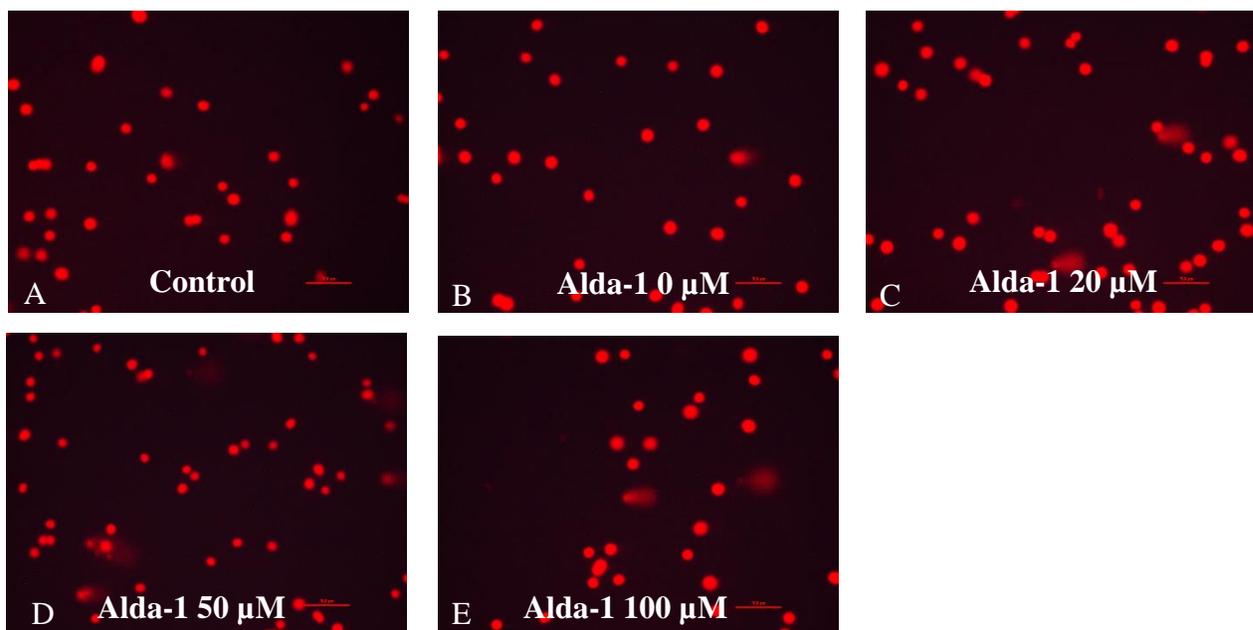
**Figura 16. Índice de daño en el ADN de células HepG2 tratadas con Alda-1.**

Índice de daño en el ADN de células HepG2 luego de la incubación durante 1 hora (A) y 6 horas (B) con distintas concentraciones de Alda-1. Los datos corresponden al promedio  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno (analizando 50 cometas por réplica). C = Control; células sin tratar. C(+) = control positivo de genotoxicidad ( $H_2O_2$  1,5 mM). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett. \*\*\*=  $p < 0,001$  vs C.



**Figura 17. Ensayo del cometa en células HepG2 incubadas con Alda-1 durante 1 hora.**

Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células HepG2 sin tratar (A), incubadas durante 1 hora con  $H_2O_2$  1,5 mM (B), Alda-1 0 µM (C), 20 µM (D), 50 µM (E) y 100 µM (F). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100 µm.

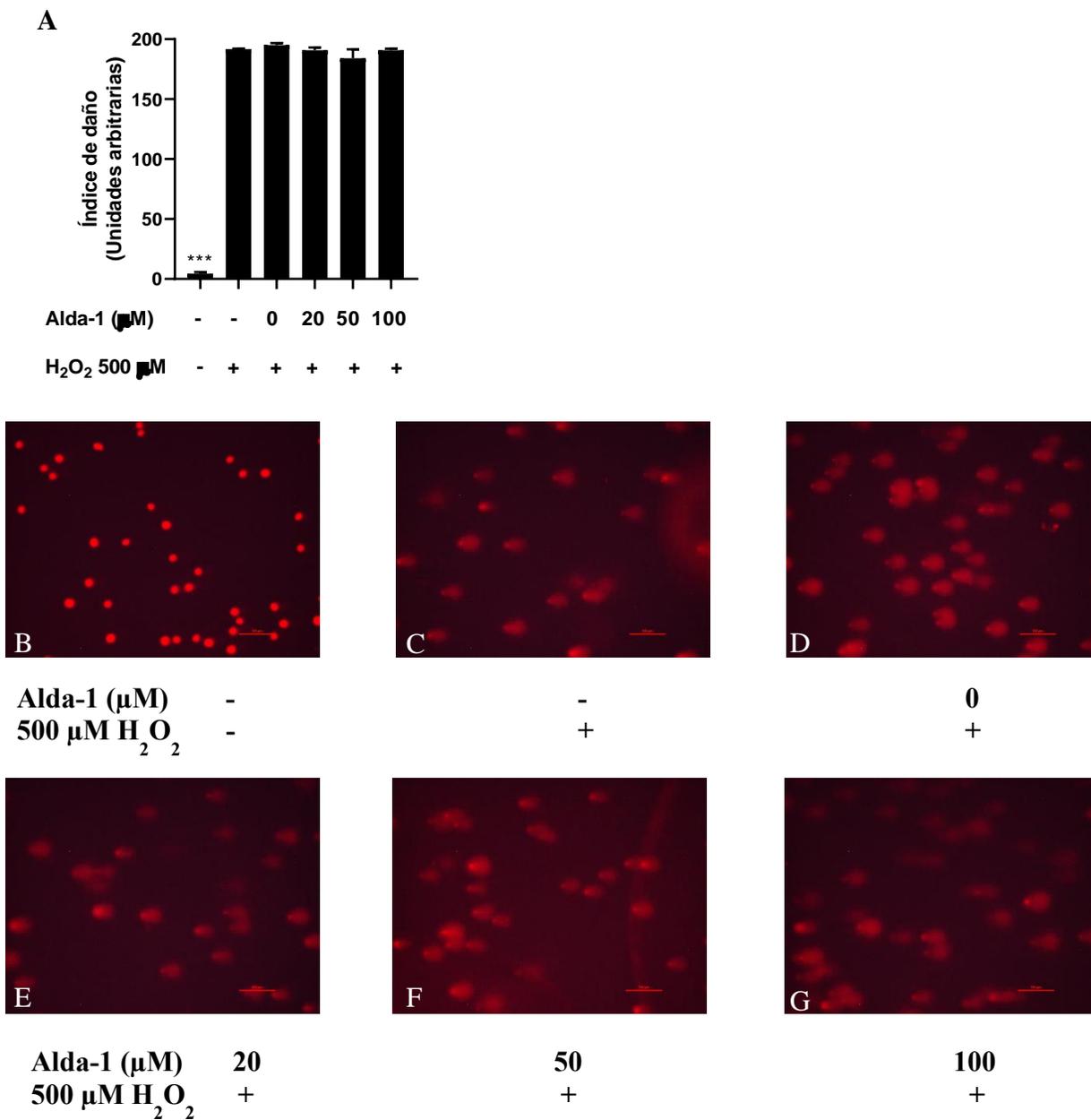


**Figura 18. Ensayo del cometa en células HepG2 incubadas con Alda-1 durante 6 horas.**

*Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células HepG2 sin tratar (A), incubadas durante 6 horas con Alda-1 0 μM (B), 20 μM (C), 50 μM (D) y 100 μM (E). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100 μm.*

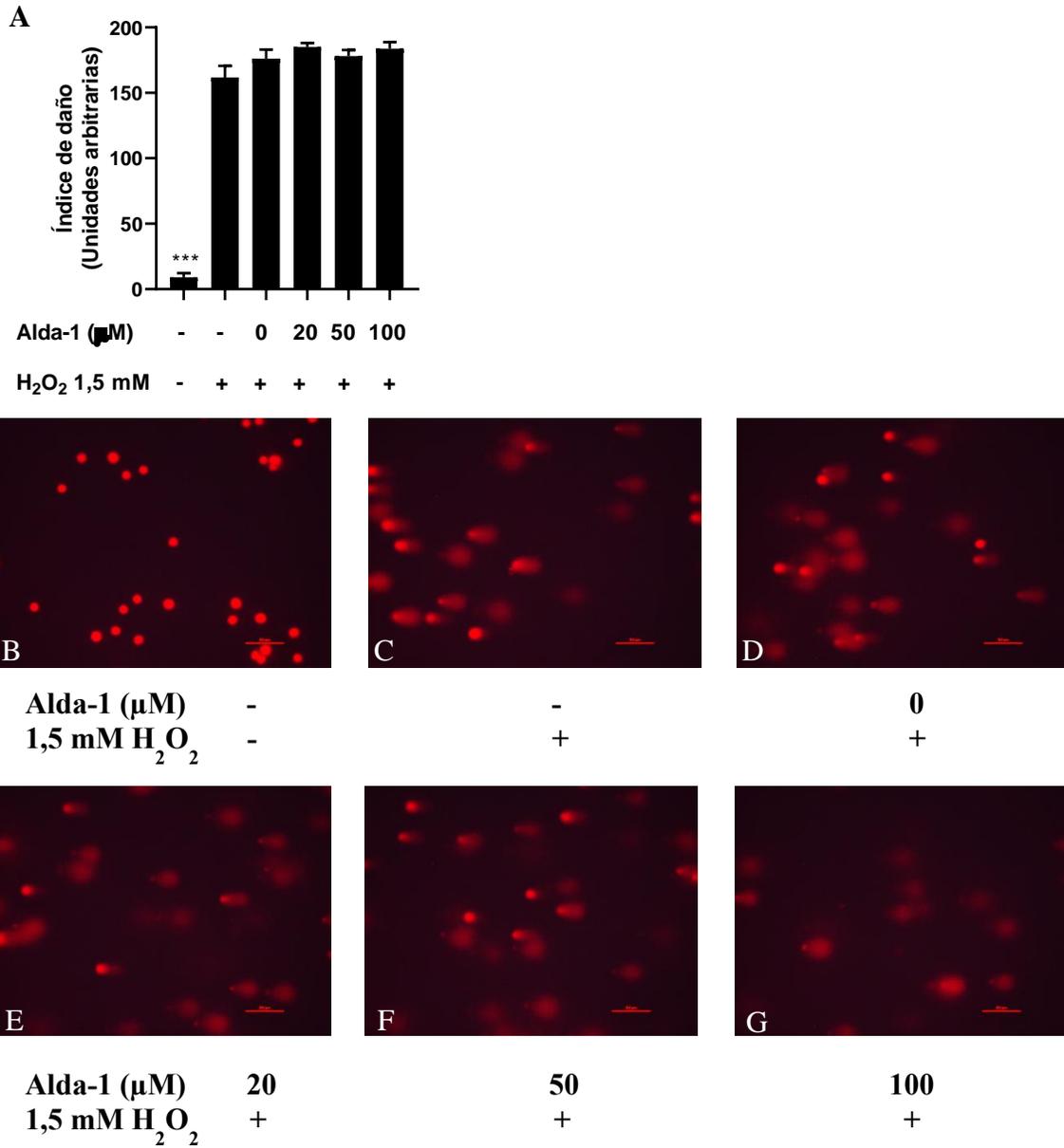
### **7.8. Determinación del potencial efecto protector de Alda-1 frente a la genotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células SH-SY5Y y HepG2.**

Para determinar si Alda-1 protege frente al daño en el ADN producido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, células SH-SY5Y y HepG2 fueron incubadas durante 6 horas con distintas concentraciones de Alda-1 (0, 20, 50 y 100 μM) seguido de una hora de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM para células SH-SY5Y y 1,5 mM para células HepG2). Posteriormente se determinó el daño genotóxico mediante el ensayo del cometa. Los resultados no mostraron una protección por parte de Alda-1 frente a la genotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con Alda-1, en células SH-SY5Y ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett ANOVA de una vía;  $F_{(5,12)} = 490,2$ ;  $p < 0,0001$ ) y en células HepG2 ( $p > 0,05$ ; prueba *post hoc* de Dunnett ANOVA de una vía;  $F_{(5,12)} = 145,7$ ;  $p < 0,0001$ ) alcanzando un ID mayor a 180 luego del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la línea celular SH-SY5Y (**Figura 19**) y mayor a 160 en la línea celular HepG2 (**Figura 20**).



**Figura 19. Ensayo del cometa en células SH-SY5Y preincubadas con Alda-1 y luego tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

(A) Índice de daño en el ADN de células SH-SY5Y luego de la incubación durante 6 horas con Alda-1 y posteriormente tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora. Los datos corresponden al promedio  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno (analizando 50 cometas por réplica). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett. \*\*\*=  $p < 0,001$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM. Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células SH-SY5Y sin tratar (B), incubadas por 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM (C), preincubadas durante 6 horas con Alda-1 (seguido de 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM) 0 μM (D), 20 μM (E), 50 μM (F) y 100 μM (G). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100 μm.



**Figura 20. Ensayo del cometa en células HepG2 preincubadas con Alda-1 y luego tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

(A) Índice de daño en el ADN de células HepG2 luego de la incubación durante 6 horas con Alda-1 y posteriormente tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora. Los datos corresponden al promedio  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno (analizando 50 cometas por réplica). Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett. \*\*\*=  $p < 0,001$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM. Fotografías de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo del cometa en células HepG2 sin tratar (B), incubadas por 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM (C), preincubadas durante 6 horas con Alda-1 (seguido de 1 hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM) 0 μM (D), 20 μM (E), 50 μM (F) y 100 μM (G). Barra roja en la parte inferior derecha indica la medida de 100 μm.

## 8. DISCUSIÓN

Diversos estudios se han centrado en la regulación de la concentración de acetaldehído cerebral como blanco farmacológico para disminuir el consumo de etanol (Karahanian y cols., 2011; Karahanian y cols., 2015; Peana y cols., 2015). En este sentido, el compuesto Alda-1 tiene la capacidad de activar la ALDH2, promoviendo la eliminación del acetaldehído y reduciendo la adquisición del hábito de beber alcohol y el consumo crónico en ratas bebedoras (Rivera-Meza y cols., 2019).

El presente trabajo determinó la citotoxicidad y genotoxicidad de Alda-1 *in vitro*, requerimiento fundamental para proyectar su uso en humanos. Previo a determinar la toxicidad de Alda-1 se seleccionó el solvente adecuado y la concentración óptima del solvente que permitiera el desarrollo de los experimentos *in vitro* sin afectar la viabilidad y proliferación de los cultivos celulares. Aunque muchos solventes orgánicos son tóxicos para las células a nivel *in vitro*, son necesarios para disolver los agentes farmacológicos que no son solubles en agua en ensayos biológicos, es por ello que es fundamental utilizar una concentración adecuada que no cause efectos dañinos en los experimentos celulares (Nguyen y cols., 2020). En este trabajo se observó que concentraciones de metanol iguales o superiores a 0,75% v/v y todas las concentraciones de DMSO utilizadas disminuyen la proliferación celular sin tener efecto en la viabilidad de las células (ver **Figura 1**). Estudios han demostrado que DMSO a concentraciones superiores al 2% v/v tienen efectos tóxicos en células HeLa, y concentraciones sobre el 1% v/v disminuyen el crecimiento celular (Forman y cols., 1999). Además, se ha visto que luego de la incubación por 24 horas con DMSO a concentraciones de 10; 5; 2,5 y 1,25% v/v se inhibe la proliferación celular en las líneas celulares HepG2, MDAMD-231, MCF-7 y VNBRC1, e incluso una concentración de 0,6% v/v disminuye la proliferación en células HepG2 comparado al tratamiento con DMSO al 0,3 y 0,15 % v/v (Nguyen y cols., 2020). En líneas celulares de mieloma se ha visto que concentraciones bajas de DMSO (0,05-0,8% v/v) pueden estimular la proliferación celular (Wen y cols., 2015), sin embargo, en este trabajo todas las concentraciones de DMSO utilizadas, incluyendo las más bajas (0,25 y 0,5% v/v) causaron una disminución en el número de células HEK-293. En cuanto a la incubación con metanol, se ha visto que

concentraciones iguales o inferiores a 0,4% v/v no tienen efecto en la proliferación en células de mieloma humano RPMI 8226, mientras que la concentración de 0,8% v/v disminuye la tasa de crecimiento celular respecto al control sin tratamiento en esta línea celular (Wen y cols., 2015). Por otra parte, se ha observado que en líneas celulares HepG2, MDAMD-231, MCF-7 y VNBRC1 concentraciones de metanol entre 0,15-1,25 % v/v no causan efectos en el número de células (Nguyen y cols., 2020). Considerando estos antecedentes y la solubilidad de Alda-1, se decidió usar metanol como solvente, fijando una concentración de 0,5% como valor máximo en el medio de cultivo celular.

En este estudio se utilizó  $H_2O_2$  como control positivo de citotoxicidad, debido a su amplio uso como agente oxidante capaz de disminuir la viabilidad celular (Arany y cols., 2004; Chung y cols., 2005). Se encontró que las concentraciones de  $H_2O_2$  que causaron muerte celular variaron de una línea celular a otra en un rango de 700  $\mu M$  a 2,2 mM (ver **Figura 4**). En general, las concentraciones de  $H_2O_2$  que producen efectos citotóxicos son variables de un tipo celular a otro, las cuales pueden ser menores a 10  $\mu M$  e incluso mayores a 1 mM (Gülden y cols., 2010) y además son dependientes de factores como el estado fisiológico de las células, el medio de cultivo y la duración de la exposición (Halliwell y cols., 2000). Se debe considerar que la concentración nominal de  $H_2O_2$  en el cultivo celular puede diferir de la calculada teóricamente, ya que este compuesto se degrada en el medio de cultivo. La velocidad de eliminación del  $H_2O_2$  depende de la concentración celular (número de células/mL de medio de cultivo) y del tipo celular, además de la actividad de enzimas antioxidantes capaces de metabolizar el  $H_2O_2$  como catalasa, glutatión peroxidasa, entre otras (Gülden y cols., 2010) (Makino y cols., 2008). En este sentido, dependiendo de la línea celular se pueden observar diferentes niveles de actividad de enzimas antioxidantes, por ejemplo, células HepG2 presentan mayor actividad de superóxido dismutasa (SOD) que células HEK-293, y frente al estrés oxidativo inducido por cadmio la línea celular HepG2 posee una mayor actividad de la enzima catalasa que la línea celular HEK-293 (Lawal y Ellis, 2010).

Los ensayos basados en células se utilizan a menudo para determinar si un compuesto tiene efecto sobre la proliferación celular o si muestran efectos citotóxicos directos que

eventualmente conducen a la muerte celular (Riss y cols., 2016). En este sentido parámetros como la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo, permeabilidad de la membrana plasmática y estructura nuclear son utilizados para medir la viabilidad celular (Mahto y cols., 2010). Encontrar el mejor método depende de varios factores que incluyen el modelo celular utilizado, el rendimiento deseado, costos de los reactivos y disponibilidad de instrumentación. Independiente del ensayo elegido, siempre es necesario validar el método y utilizar controles positivos adecuados para cada tipo de célula (Riss y cols., 2019). En este último punto es importante considerar la posible toxicidad selectiva del compuesto a estudiar entre diferentes tipos celulares, por ejemplo, frente al compuesto tóxico abrina (proveniente de la semilla de *Abrus precatorius*) células SH-SY5Y son más sensibles que células HEK-293 y a su vez estas son más sensibles a este compuesto que la línea celular HepG2 (Saxena y cols., 2022). Por otra parte, se ha observado que ciertas condiciones, como un aumento en el contenido de glucosa, o la fase de crecimiento celular (exponencial versus confluyente) pueden alterar la estimación de la viabilidad celular medida por la técnica de reducción de sales de tetrazolio, en comparación a otros ensayos de citotoxicidad. En este sentido, células en fase de crecimiento exponencial presentan mayor actividad mitocondrial medido a través de la reducción de sales de tetrazolio (Stepanenko y Dmitrenko, 2015). En este trabajo se observó que las líneas celulares HepG2, C3H/10T1/2 y HEK-293 presentaron una reducción de la viabilidad por exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medida mediante las pruebas de reducción de MTS y azul de tripán (ver **Figura 6 y 7**), sin embargo, en células SH-SY5Y luego de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produjo un alto porcentaje de actividad reductora de MTS (indicativo de una mayor viabilidad) a pesar de la disminución en la viabilidad celular medido por tinción con azul de tripán y el aumento en la liberación de LDH (ver **Figuras 6, 7 y 8**). Este fenómeno se vería explicado por la tasa de proliferación de células SH-SY5Y, que es mucho mayor que en las otras líneas celulares (ver **Figura 5**), por lo que esta condición podría aumentar la actividad reductora de MTS observada.

Ensayos como la medición de LDH extracelular, determina la pérdida de esta enzima intracelularmente y su liberación al medio de cultivo como indicador de una muerte celular irreversible debido al daño en la membrana celular (Fotakis y Timbrell, 2006). En general la vida media de la enzima LDH una vez liberada al medio extracelular es de aproximadamente

9 horas, pero puede variar dependiendo del mecanismo de muerte celular (Riss y cols., 2019). Cuando la muerte celular se produce apoptosis, la liberación del contenido enzimático sucede entre 4 a 48 horas desde la exposición al agente citotóxico, sin embargo, al producirse muerte celular por necrosis la liberación de enzimas ocurre luego de 30 minutos a 4 horas y luego decae con el tiempo (Niles y cols., 2008). En este trabajo se observó que luego de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tres de las líneas celulares utilizadas (HepG2, SH-SY5Y y C3H/10T1/2) se logró medir el aumento en la actividad extracelular de la LDH a 24 horas, pero en las líneas celulares HepG2 y SH-SY5Y no se observó actividad a 48 horas (ver **Figura 8**), lo que se debería a la degradación de la LDH a este tiempo de medición. En el caso de la línea celular HEK-293 solo en la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 9 y 12 horas se observó un aumento en la liberación de LDH lo que podría estar relacionado a una baja concentración intracelular de LDH a una mayor susceptibilidad de daño de la membrana por parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ver **Figura 8 y 9**). Experimentos adicionales no mostrados indicaron que los niveles de actividad LDH entre células HEK-293 y C3H/10T1/2 no diferían significativamente, por lo que se descartaría la hipótesis de un menor nivel de LDH intracelular en células HEK-293. Es importante destacar que para las células HEK-293 se requirió una menor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para obtener una reducción de 90% en la viabilidad celular en comparación a las células C3H/10T1/2 (ver **Figura 4**), lo que apoyaría la hipótesis de una mayor sensibilidad al daño por las células HEK-293. Se ha visto que otros compuestos como el gossipol (polifenol derivado de la planta del algodón) a concentraciones no citotóxicas no producen cambios en la actividad de LDH intracelular ni extracelular respecto al control, mientras que concentraciones más altas y citotóxicas producen un aumento en la actividad de la deshidrogenasa láctica extracelular y una disminución en la intracelular (Chen y cols., 2018). Ante estos resultados, considerando el decaimiento de la actividad de LDH luego de varias horas desde que ocurrió su liberación al medio extracelular, establecer la reducción de la actividad intracelular cuando la actividad extracelular es indetectable pareciera ser una buena aproximación a la citotoxicidad de un compuesto.

Para la determinación de la genotoxicidad uno de los ensayos más ampliamente utilizados es el ensayo del cometa, el cual es un método sensible y rápido que permite detectar el rompimiento de hebras en el ADN en células individuales (Fairbairn y cols., 1995). Estudios

han demostrado que compuestos oxidantes como el  $H_2O_2$  son capaces de producir cometas en células SH-SY5Y y luego de media hora de exposición concentraciones sobre  $200 \mu M$  aumentan significativamente el rompimiento de hebras de ADN alcanzando un máximo a concentraciones entre  $500$  y  $1000 \mu M$  (Pohl y cols., 2021), mismo comportamiento que se observó en este trabajo luego de una hora de incubación (ver **Figura 12**). Además, en células HepG2 la incubación con  $H_2O_2$   $25$  y  $50 \mu M$  a tiempos entre  $5$  minutos y una hora produce un aumento progresivo en la formación de cometas (Benhusein y cols., 2010), por lo que los altos ID producidos luego de una hora de incubación a todas las concentraciones de  $H_2O_2$  utilizadas ( $0,5$ - $2$  mM) (ver **Figura 12**) se debería a que el máximo daño ya se habría alcanzado a menores concentraciones. Además, la línea celular HepG2 ha demostrado ser apropiada para la determinación de daño en el ADN medida por ensayo del cometa, con una alta exactitud según el estudio de Hong y cols., en 2018, donde  $9$  de los  $10$  compuestos utilizados predijeron correctamente el potencial genotóxico, medido por el porcentaje de ADN en la cola del cometa. Por otra parte, diversos estudios recomiendan la determinación de cometas a tiempos cortos. Tice y cols. (2000) exponen que para ensayos *in vitro* los cultivos deben ser incubados con el compuesto de prueba durante  $3$  a  $6$  horas y además debido a que el daño al ADN está asociado con la muerte celular es fundamental que la dosis más alta utilizada no induzca una citotoxicidad excesiva. Sekihashi y cols. (2003) demostraron que en células CHO K1 sólo  $4$  de los  $8$  compuestos estudiados mantienen la formación de cometas luego de  $24$  horas, por lo que recomiendan tiempos de exposición entre  $1$  a  $4$  horas, esto debido a que algunos agentes mutagénicos son inactivados por componentes del medio extracelular, especialmente por el suero, por tanto, las lesiones en el ADN tienden a ser reparadas y no se producen nuevas. Además, la misma degradación del compuesto mediada por el metabolismo celular sumada a la reparación del ADN es una posible causa de la reducción de cometas formados al incrementar el tiempo de exposición a  $24$  horas en células HepG2 tratadas con  $H_2O_2$  tal como señalan Benhusein y cols. (2010). Si bien, para este estudio se utilizó como control de genotoxicidad  $H_2O_2$ , el cual difiere molecularmente en gran medida a Alda-1, compuestos orgánicos como el metanosulfonato de metilo, metanosulfonato de etilo, 4-nitroquinolina-1-óxido y actinomicina D son comúnmente empleados como control positivo de esta técnica debido a su acción mutagénica a tiempos cortos obteniéndose alta producción de cometas al igual que con  $H_2O_2$  (Sekihashi y cols.,

2003) (Sakaki y cols., 2015) (Hartmann y cols., 2003), por lo que la estructura de Alda-1 no sería una limitante en la generación de daño en el ADN medido a través del ensayo del cometa.

En cuanto a la citotoxicidad de Alda-1 (0,2 -100  $\mu\text{M}$ ) los resultados mostraron que no existe una disminución significativa en la proliferación (**Figura 5**), viabilidad celular (**Figura 6**) y función metabólica (**Figura 7**), ni tampoco un aumento en la liberación de LDH (**Figura 8**) en las cuatro líneas celulares estudiadas. Si bien pocos estudios se refieren a la toxicidad de Alda-1, se ha visto que en osteoblastos de rata no se producen cambios significativos en la reducción de MTT luego de la incubación con Alda-1 a concentraciones entre 10-500 nM, y en general la activación de la enzima ALDH2 mediada por Alda-1 se ha asociado con efectos protectores al daño inducido por isquemia/reperfusión y otros tipos de estresores oxidativos (Chen y cols., 2008; Zhong y cols., 2015; Ning y cols., 2012; Chen y cols., 2019). Aunque en este estudio no se midió apoptosis, según lo obtenido por Stachowicz y cols. (2016) en modelos animales Alda-1 no produce cambios en marcadores apoptóticos como Bax, y frente a una situación de estrés aumenta los niveles de mRNA del marcador antiapoptótico Bcl-2 en corteza frontal. Además, se ha visto que tanto *in vitro* como *in vivo* en células pancreáticas Alda-1 no aumenta los niveles de proteínas apoptóticas como Bax y caspasa 3 clivada pero tampoco aumenta los niveles de proteínas anti apoptóticas como Bcl-2. También no produce cambios en el porcentaje de células TUNEL positivo respecto al control (Cao y cols., 2020).

Para los ensayos de genotoxicidad sólo se utilizaron las líneas celulares SH-SY5Y y HepG2. Esta decisión fue tomada considerando la importancia del origen que tienen estas líneas celulares. Células SH-SY5Y tienen origen neuronal, por lo que están asociadas con el órgano blanco donde actúa Alda-1 como posible agente terapéutico para el tratamiento del alcoholismo (Rivera-Meza, y cols., 2019) y las células HepG2 tienen origen hepático, el cual es el principal órgano encargado de la metabolización de fármacos y la excreción (vía hepática-biliar) de fármacos liposolubles (Rang y cols., 2012). Los resultados del ensayo de genotoxicidad demostraron que Alda-1 no produce daño en el ADN en los tiempos y líneas celulares empleadas (ver **Figuras 13 -18**). Es sabido que la principal acción de Alda-1 es aumentar la actividad de la enzima ALDH2, y en este sentido un estudio de Li y cols. (2019)

demonstró que el aumento en la expresión de esta enzima no produce un daño genotóxico medido por el ensayo del cometa en células A549, y que incluso puede proteger de las lesiones en el ADN producidas por acetaldehído. Si bien, en el ensayo del cometa no observó un rompimiento de hebras de ADN, es necesario realizar más estudios para determinar si Alda-1 produce mutaciones en el material genético, por ejemplo, mediante el test de Ames.

De acuerdo con los resultados preliminares de la preincubación con Alda-1 seguido de una hora de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Alda-1 no protegería frente al daño en el ADN producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células SH-SY5Y y HepG2 (ver **Figuras 19 y 20**). Sin embargo, se ha visto que el tratamiento con 10 y 30 µM de Alda-1 durante 6 horas, seguido de la incubación de 24 horas con 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previene la reducción de la viabilidad celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos de tenocitos, así como también disminuye los niveles de marcadores apoptóticos (Liu y cols., 2020). Además, células PBMC transfectadas con un plásmido codificante para ALDH2, son levemente más resistentes a la toxicidad celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que células transfectadas con un plásmido vehículo y células no transfectadas (Hu y cols., 2011). Intracelularmente la concentración fisiológica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 1-10 nM, mientras que concentraciones sobre 0,1 µM desencadenan estrés oxidativo y producen daño a las biomoléculas (Sies, 2017). Por lo que, en ensayos posteriores se podría disminuir la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada, o modificar el tiempo de preincubación con Alda-1 utilizando el que genere mayor actividad de la enzima ALDH2, de manera de dilucidar si efectivamente Alda-1 puede prevenir el daño en el ADN producido por estresores oxidativos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Fisiológicamente el rol más conocido de la enzima ALDH2, blanco farmacológico de Alda-1, es su acción en el metabolismo del etanol, mediando la conversión del acetaldehído a acetato (Chen y cols., 2014). Sin embargo, también es capaz de metabolizar otros aldehídos alifáticos de cadenas cortas y aldehídos aromáticos y policíclicos (Klyosov, 1996). En específico, la enzima ALDH2 tiene un importante rol en la oxidación de aldehídos endógenos que se producen de la peroxidación lipídica cuando hay estrés oxidativo, como el 4-HNE y el malondialdehído, además de algunos aldehídos ambientales como la acroleína (presente en el humo del tabaco) (Chen y cols., 2014). Otra acción importante es la detoxificación de

los aldehídos formados luego de la biotransformación de catecolaminas, como el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL), metabolito de la dopamina, pues la acumulación de este compuesto produce modificaciones en las proteínas y acumulación de ROS que conllevan a la muerte neuronal (Marchitti y cols., 2007). Se ha reportado que el tratamiento por 14 días con Alda-1 atenúa el comportamiento de ansiedad y depresión en ratas estresadas prenatalmente. Si bien, se desconoce el mecanismo de acción por el cual ocurre este fenómeno, este estaría relacionado con la disminución plasmática de aductos de proteínas con 4-HNE, reducción de mRNA de TNF- $\alpha$  y cambios en la expresión de proteínas mitocondriales en hipocampo y corteza frontal, que sugieren un rol mitoprotector de Alda-1 (Stachowicz y cols., 2016). Por otra parte, es importante considerar que Alda-1 aumenta la actividad de la enzima ALDH2, sin aumentar la expresión de esta enzima (Fu y cols., 2014)

Considerando la lipofilicidad de Alda-1 ( $\log P=4$ ), es muy probable que este sea metabolizado vía hepática. Sin embargo, no existe información sobre que metabolitos se producirían y si estos mantienen las mismas características toxicológicas y funcionales de Alda-1. De acuerdo con la estructura de Alda-1 (ver **Figura 2**), este compuesto posee un grupo benzodioxol, el cual según literatura puede ser metabolizado por medio de la enzima citocromo P450, permitiendo la apertura del grupo epóxido (Anders y cols., 1984) (Meyer y cols., 2009). Según el estudio de Perez- Miller y cols. (2010) el grupo benzodioxol de Alda-1 se une a un sitio hidrofóbico de la enzima ALDH2, por lo que si se producen cambios debido a la metabolización del compuesto puede cambiar la forma en que Alda-1 se une a esta enzima y por tanto podría modificar la activación de la ALDH2. Por otra parte, el grupo amida que une al grupo metil-benzodioxol con el grupo diclorobenzamida, es difícil de separar considerando el impedimento estérico que producen los átomos de cloro pertenecientes a este último grupo funcional.

En estudios posteriores se podría determinar cuáles son los metabolitos de Alda-1 y las propiedades funcionales y toxicológicas de estos. Además de investigar si Alda-1 ejerce un efecto protector frente a la citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las cuatro líneas celulares que fueron estudiadas en este trabajo.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- Alda-1 (0,2-100  $\mu\text{M}$ ), activador de la ALDH2, no tiene efectos sobre la viabilidad en células de origen hepático (HepG2), neuronal (SH-SY5Y), fibroblastos (C3H/10T1/2) y renal (HEK-293) medido a través de la tinción de azul de tripán, reducción de MTS y liberación de LDH tanto a 24 como 48 horas pos-tratamiento.
- Alda-1 no presenta efectos genotóxicos a concentraciones entre 20-100  $\mu\text{M}$  luego de la incubación por 1 y 6 horas en células SH-SY5Y y HepG2.
- Alda-1 no mostró efectos protectores frente al daño genotóxico inducido por las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas en células SH-SY5Y y HepG2.
- Se deben realizar experimentos adicionales para determinar si Alda-1 genera mutaciones en el ADN y si puede presentar efectos protectores frente a la citotoxicidad inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en estas líneas celulares.
- Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que Alda-1 no sería un compuesto tóxico a nivel *in vitro*.

## 10. REFERENCIAS

Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P. J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T. A., Kleine, H., Knight, C., Nagy, M., Perry, D. & Stefaniak, M. (2008). Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organization. *Green Chemistry*, 10(1), 31-36.

Anders, M. W., Sunram, J. M., & Wilkinson, C. F. (1984). Mechanism of the metabolism of 1, 3-benzodioxoles to carbon monoxide. *Biochemical pharmacology*, 33(4), 577-580.

Amit, Z., & Smith, B. R. (1985). A multi-dimensional examination of the positive reinforcing properties of acetaldehyde. *Alcohol*, 2(2), 367-370.

Arany, I., Megyesi, J. K., Kaneto, H., Tanaka, S., & Safirstein, R. L. (2004). Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity in mouse renal proximal tubule cells. *Kidney international*, 65(4), 1231-1239.

Bácskay, I., Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M. & Ujhelyi, Z. (2017). Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. In *Cytotoxicity*. IntechOpen.

Benhusein, G., Mutch, E., Aburawi, S., & Williams, F. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, 5(1), 4637.

Brown, Z. W., Amit, Z., & Rockman, G. E. (1979). Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology*, 64(3), 271-276.

Cao, S., Bian, Y., Zhou, X., Yuan, Q., Wei, S., Xue, L., Yang, F., Wang, Q., Zheng, B., Zhang, J., Wang, Z., Han, Z., Yang, K., Rui, H., Zhang, Y., Xu, F. & Chen, Y. (2020). A small-molecule activator of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 reduces the severity of

cerulein-induced acute pancreatitis. *Biochemical and biophysical research communications*, 522(2), 518-524.

Chen, C. H., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Hurley, T. D., & Mochly-Rosen, D. (2008). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*, 321(5895), 1493-1495.

Chen, C. H., Ferreira, J. C. B., Gross, E. R., & Mochly-Rosen, D. (2014). Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiological reviews*, 94(1), 1-34.

Chen, C. W., Hu, S., Tsui, K. H., Hwang, G. S., Chen, S. T., Tang, T. K., Cheng, H.T., Yu, J. W., Wang, H.C., Juang, H. H., Wang, P. S & Wang, S. W. (2018). Anti-inflammatory effects of gossypol on human lymphocytic Jurkat cells via regulation of MAPK signaling and cell cycle. *Inflammation*, 41(6), 2265-2274

Chen, L., Lang, A. L., Poff, G. D., Ding, W. X., & Beier, J. I. (2019). Vinyl chloride-induced interaction of nonalcoholic and toxicant-associated steatohepatitis: Protection by the ALDH2 activator Alda-1. *Redox biology*, 24, 101205.

Chung, M. J., Walker, P. A., Brown, R. W., & Hogstrand, C. (2005). ZINC-mediated gene expression offers protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 205(3), 225-236.

Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Rašlova, K., & Vaughan, N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and molecular mutagenesis*, 30(2), 139-146.

Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278.

Ding, J., Zhang, Q., Luo, Q., Ying, Y., Liu, Y., Li, Y., Wei, W., Yan, F. & Zhang, H. (2016). Alda-1 attenuates lung ischemia-reperfusion injury by reducing 4-hydroxy-2-nonenal in alveolar epithelial cells. *Critical care medicine*, 44(7), e544-e552.

Enomoto, N., Takase, S., Yasuhara, M., & Takada, A. (1991). Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15(1), 141-144.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59.

Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., & Diana, M. (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*, 29(3), 530.

Forman, S., Ká's, J., Fini, F., Steinberg, M., & Ruml, T. (1999). The effect of different solvents on the ATP/ADP content and growth properties of HeLa cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 13(1), 11-15.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.

Fu, S. H., Zhang, H. F., Yang, Z. B., Li, T. B., Liu, B., Lou, Z., Ma, Q. L., Luo, X. J. & Peng, J. (2014). Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(1), 87-94.

Gomes, K. M., Campos, J. C., Bechara, L. R., Queliconi, B., Lima, V. M., Disatnik, M. H., Magno, P., Chen, C.H., Brum, P., Kowaltowski, A., Mochly-Rosen, D & Ferrera, J. C. (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function

and improves ventricular function and remodeling. *Cardiovascular research*, 103(4), 498-508.

Gomes, K. M., Bechara, L. R., Lima, V. M., Ribeiro, M. A., Campos, J. C., Dourado, P. M., Kowaltowski, A., Mochly-Rosen, D. & Ferreira, J. C. (2015). Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. *International journal of cardiology*, 179, 129-138.

Guideline, I. H. T. (2011, November). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). In *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group* (pp. 1-25).

Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., & Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), 1298-1305.

Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*, 486(1), 10-13.

Hammad, F. T., Al-Salam, S., Yuvaraju, P., & Lubbad, L. (2018). Alda-1, an aldehyde dehydrogenase-2 agonist, causes deterioration in renal functions following ischemia–reperfusion injury due to crystalline nephropathy. *Drug development research*, 79(7), 315-323.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. & Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

Hong, Y. H., Jeon, H. L., Ko, K. Y., Kim, J., Yi, J. S., Ahn, I., Kim, T. S. & Lee, J. K. (2018). Assessment of the predictive capacity of the optimized in vitro comet assay using HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 827, 59-67.

Hu, X. Y., Fang, Q., Wang, J. S., Xie, J. Q., Chai, B. S., Li, F. Q., Cui, X. & Yang, Y. (2011). Over-expression of aldehyde dehydrogenase-2 protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(2), 245-252.

Karahanian, E., Quintanilla, M. E., Tampier, L., Rivera-Meza, M., Bustamante, D., Gonzalez-Lira, V., Morales, P., Herrera-Marschitz, M. & Israel, Y. (2011). Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(4), 606-612.

Karahanian, E., Rivera-Meza, M., Tampier, L., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2015). Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH 2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addiction biology*, 20(2), 336-344.

Klyosov, A. A. (1996). Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry*, 35(14), 4457-4467.

Kranzler, H. R., & Soyka, M. (2018). Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: A review. *Jama*, 320(8), 815-824.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., & Melino, G. (2009). Classification of cell death:

recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3.

Lawal, A. O., & Ellis, E. (2010). Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 465-478.

Li, K., Guo, W., Li, Z., Wang, Y., Sun, B., Xu, D., Ling, J., Song, H., Liao, Y., Wang, T., Jing, B., Hu, M., Kuang, Y., Wang, Q., Yao, F., Zhu, L., Wang, L. & Deng, J. (2019). ALDH2 repression promotes lung tumor progression via accumulated acetaldehyde and DNA damage. *Neoplasia*, 21(6), 602-614.

Li, M., Xu, M., Li, J., Chen, L., Xu, D., Tong, Y., Zhang, J., Wu, H., Kong, X. & Xia, Q. (2018). Alda-1 Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury by Activating Aldehyde Dehydrogenase 2 and Enhancing Autophagy in Mice. *Journal of immunology research*, 2018.

Liu, Y. C., Wang, H. L., Huang, Y. Z., Weng, Y. H., Chen, R. S., Tsai, W. C., Yeh, T. H., Lu, C. S., Chen, Y. L., Lin, Y. W., Chen, Y. J., Chiu, C. H. & Chiu, C. C. (2020). Alda-1, an activator of ALDH2, ameliorates Achilles tendinopathy in cellular and mouse models. *Biochemical Pharmacology*, 175, 113919.

Litten, R. Z., Wilford, B. B., Falk, D. E., Ryan, M. L., & Fertig, J. B. (2016). Potential medications for the treatment of alcohol use disorder: an evaluation of clinical efficacy and safety. *Substance abuse*, 37(2), 286-298.

Mahto, S. K., Chandra, P., & Rhee, S. W. (2010). in vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2(2), 87-93.

Makino, N., Mise, T., & Sagara, J. I. (2008). Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells: analysis based on a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(6), 927-936.

Marchitti, S. A., Deitrich, R. A., & Vasiliou, V. (2007). Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3, 4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3, 4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacological reviews*, 59(2), 125-150.

Matsumoto, H., & Fukui, Y. (2002). Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addiction biology*, 7(1), 5-14.

Meyer, M. R., Peters, F. T., & Maurer, H. H. (2009). Investigations on the human hepatic cytochrome P450 isozymes involved in the metabolism of 3, 4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and benzodioxolyl-butanamine (BDB) enantiomers. *Toxicology letters*, 190(1), 54-60.

Mittal, M., Pal, S., China, S. P., Porwal, K., Dev, K., Shrivastava, R., Raju, K. S., Rashid, M., Trivedi, A. K., Sanyal, S., Wahajuddin, M., Bhaduria, S., Maurya, R. & Chattopadhyay, N. (2017). Pharmacological activation of aldehyde dehydrogenase 2 promotes osteoblast differentiation via bone morphogenetic protein-2 and induces bone anabolic effect. *Toxicology and applied pharmacology*, 316, 63-73.

Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T., & Tweats, D. (1999). ICH-harmonized guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 436(3), 195-225.

Myers, W. D., Ng, K. T., Marzuki, S., Myers, R. D., & Singer, G. (1984). Alteration of alcohol drinking in the rat by peripherally self-administered acetaldehyde. *Alcohol*, 1(3), 229-236.

Myers, W., Ng, K., & Singer, G. (1984). Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 40(9), 1008-1010.

Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M. M., Rao, K. R., Chand, P., & Bhat, B. V. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2(2), 107.

Nguyen, S. T., Nguyen, H. T. L., & Truong, K. D. (2020). Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7(7), 3855-3859.

Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert opinion on drug discovery*, 3(6), 655-669.

Ning, S., Budas, G. R., Churchill, E. N., Chen, C. H., Knox, S. J., & Mochly-Rosen, D. (2012). Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice. *Radiation research*, 178(1), 69-74.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Global status report on alcohol and health 2018.

Peana, A. T., 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*, 232(23), 4269-4276.

Peana, A. T., Rosas, M., Porru, S., & Acquas, E. (2016). From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10, JEN-S25099.

Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D., & Hurley, T. D. (2010). Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature structural & molecular biology*, 17(2), 159.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.

Pohl, F., Goua, M., Yates, K., Bermano, G., Russell, W. R., Maciel, P., & Kong Thoo Lin, P. (2021). Impact of rapeseed pomace extract on markers of oxidative stress and DNA damage in human SH-SY5Y cells. *Journal of food biochemistry*, 45(2), e13592.

Quertemont, E. (2004). Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Molecular psychiatry*, 9(6), 570.

Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R, Henderson G. Rang & Dale`s Pharmacology. 7th Edition. London: Elsevier, 2012. Chapter: 9

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2019). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rivera-Meza, M., Vásquez, D., Quintanilla, M. E., 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.

Sakaki, H., Kakehi, M., Sadamoto, K., Nemoto, S., & Kurata, M. (2015). In vitro comet assay in cultured human corneal epithelial cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2(4), 147-153.

Saxena, N., Phatak, P., & Chauhan, V. (2022). Differential toxicity of abrin in human cell lines of different organ origin. *Toxicology in Vitro*, 78, 105250.

Segall, M. D., & Barber, C. (2014). Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. *Drug discovery today*, 19(5), 688-693.

Sekihashi, K., Saitoh, H., Saga, A., Hori, K., Nakagawa, M., Miyagawa, M., & Sasaki, Y. F. (2003). Effect of in vitro exposure time on comet assay results. *Environmental Mutagen Research*, 25(2), 83-86.

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol-SENDA. (2016). El consumo de alcohol en Chile: Situación epidemiológica. Ministerio del Interior y Seguridad Pública, Chile.

Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology*, 11, 613-619.

Şimşek, S., Şüküroğlu, A. A., Yetkin, D., Özbek, B., Battal, D., & Genç, R. (2020). DNA-damage and cell cycle arrest initiated anti-cancer potency of super tiny carbon dots on MCF7 cell line. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.

Sippel, H. W. (1974). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 23(2), 451-452.

Solimano, G. (2006). Consumo de alcohol y efectos sobre la salud. *Revista Chilena de Salud Pública*, 10(3), 177-181.

Soyka, M., & Müller, C. A. (2017). Pharmacotherapy of alcoholism—an update on approved and off-label medications. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 18(12), 1187-1199.

Stachowicz, A., Głombik, K., Olszanecki, R., Basta-Kaim, A., Suski, M., Lasoń, W., & Korbut, R. (2016). The impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 on the behavioral and biochemical disturbances in animal model of depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 144-153.

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, *574*(2), 193-203.

Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, *111*(1), A3-B.

Swift, R. (2007). Emerging approaches to managing alcohol dependence. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *64*(5 Supplement 3), S12–S22.

Teschke, R., Hasumura, Y., & Lieber, C. S. (1976). Hepatic ethanol metabolism: Respective roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol-oxidizing system, and catalase. *Archives of biochemistry and biophysics*, *175*(2), 635-643.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, *35*(3), 206-221.

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *13*(10), 1089-1098.

Visvardis, E. E., Tassiou, A. M., & Piperakis, S. M. (1997). Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutation Research/DNA Repair*, *383*(1), 71-80.

Wackernah, R. C., Minnick, M. J., & Clapp, P. (2014). Alcohol use disorder: pathophysiology, effects, and pharmacologic options for treatment. *Substance abuse and rehabilitation*, *5*, 1.

Wen, J., Tong, Y., & Zu, Y. (2015). Low concentration DMSO stimulates cell growth and in vitro transformation of human multiple myeloma cells. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 65-74.

Zang, R., Li, D., Tang, I. C., Wang, J., & Yang, S. T. (2012). Cell-based assays in high-throughput screening for drug discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1(1), 31-51.

Zhang, T., Zhao, Q., Ye, F., Huang, C. Y., Chen, W. M., & Huang, W. Q. (2018). Alda-1, an ALDH2 activator, protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of oxidative stress. *Free radical research*, 52(6), 629-638.

Zhong, W., Zhang, W., Li, Q., Xie, G., Sun, Q., Sun, X., Tan, X., Sun, X., Jia, W. & Zhou, Z. (2015). Pharmacological activation of aldehyde dehydrogenase 2 by Alda-1 reverses alcohol-induced hepatic steatosis and cell death in mice. *Journal of hepatology*, 62(6), 1375-1381.

Zhu, Q., He, G., Wang, J., Wang, Y., & Chen, W. (2017). Pretreatment with the ALDH2 agonist Alda-1 reduces intestinal injury induced by ischemia and reperfusion in mice. *Clinical Science*, 131(11), 1123-1136.

Zimatkin, S. M. (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *Journal of neurochemistry*, 56(1), 1-11.

Zimatkin, S. M., Pronko, S. P., Vasiliou, V., Gonzalez, F. J., & Deitrich, R. A. (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 30(9), 1500-1505.