



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Farmacología Experimental

**EFFECTO DE FLURBIPROFENO Y ALDA-1 EN LA
EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA
ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) EN CÉLULAS PC12
EN CULTIVO**

Profesor Patrocinante
Prof. Mario Rivera Meza
Depto. de Química Farmacológica y Toxicológica
Universidad de Chile

Director
Prof. Mario Rivera Meza
Químico Farmacéutico

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

JUAN MANUEL TORRES ANDRADE

Santiago de Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Farmacología Experimental entre abril 2021 y Julio 2022. Este proyecto no podría haber sido realizado sin la ayuda del Profesor Mario Rivera, quien me asignó esta oportunidad, a pesar de no haber hecho siquiera una unidad de investigación; nombro también a la Asistente de Investigación María Elena Quilaqueo, quien me enseñó gran parte de las técnicas que realicé durante este trabajo. También agradecer a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial al departamento Farmacología Molecular y Clínica, quienes siempre me dejaron realizar los experimentos que necesité hacer. La ayuda de Juan Santibáñez y Alejandro fue fundamental cuando trabajé con animales.

Deseo éxito al Laboratorio de Farmacología Experimental en el futuro y espero que otros estudiantes se interesen en realizar otros proyectos.

Finalmente, agradecer a mi familia por haberme dado la oportunidad de llegar hasta esta etapa de mi vida.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto de investigación se pudo llevar a cabo gracias al financiamiento del proyecto ANID FONDECYT 1201577.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Alcoholismo como problema de salud.....	1
1.2. Farmacología del alcoholismo.....	1
1.3. Acetaldehído, ALDH2 y su rol en el alcoholismo	3
1.4. Alda-1, un activador farmacológico de la ALDH2.....	5
1.5. Flurbiprofeno, otro activador de la ALDH2.	6
2. HIPÓTESIS.....	8
3. OBJETIVO GENERAL	8
3.1. Objetivos Específicos.....	8
4. MATERIALES	9
4.1. Material Biológico	9
4.2 Tampones.....	9
4.3 Anticuerpos.....	9
4.3 Materiales Generales	9
5. METODOLOGÍA.....	10
5.1 Cultivos de células PC12.....	10
5.2. Lisis celular	10
5.3. Medición de la actividad ALDH2	11
5.4. Actividad ALDH2 de células PC12 frente a distintas concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno.	11
5.5. Determinación de los niveles de proteína ALDH2 mediante Western Blot....	11
5.6. Animales.....	13
5.8. Medición de actividad de ALDH2 en tejido de rata hepático y cerebral.....	15
5.9. Análisis estadísticos.....	16
6. RESULTADOS	17
6.1. Optimizar la medición de la actividad de la ALDH2 en células PC12 incluyendo la determinación del rango lineal de la relación actividad enzimática versus proteínas totales.....	17

6.1.1 Optimización del ensayo enzimático de actividad de la ALDH2.....	17
6.3. Determinar el efecto de distintas proporciones Alda-1/flurbiprofeno en la expresión, actividad y niveles proteicos de la ALDH2 en células PC12.	22
6.4. Estudio del efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol en ratas bebedoras UChB.	24
6.5. Estudio del efecto de una misma dosis de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en el consumo crónico de alcohol en ratas UChB.	27
6.6. Efecto de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 en tejido cerebral y hepático de ratas UChB.....	30
7. DISCUSIÓN.....	34
8. CONCLUSIONES.....	44
9. REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la oxidación del etanol.	3
Figura 2. Estructuras moleculares de Alda-1 y flurbiprofeno.....	7
Figura 3. Esquema experimental de los estudios farmacológicos realizado en ratas UChB.	14
Figura 4. Actividad ALDH2 a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 cultivadas en placa de 100 mm.....	17
Figura 5. Actividad ALDH2 a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 cultivadas en placa de 35 mm.....	18
Figura 6. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de Alda-1	19
Figura 7. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de flurbiprofeno	20
Figura 8. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de ibuprofeno	21
Figura 9. Análisis de Western blot de los niveles proteicos de ALDH2 y beta actina en células PC12 expuestas a distintas concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno	22
Figura 10. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes y combinadas de flurbiprofeno y Alda-1.....	24
Figura 11. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol de ratas UChB.....	25
Figura 12. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en el consumo total de fluidos por ratas UChB expuestas a un paradigma de adquisición del consumo de etanol.....	26
Figura 13. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en el consumo de agua por ratas UChB expuestas a un paradigma de adquisición del consumo de etanol..	27
Figura 14. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en la mantención del consumo crónico de alcohol en ratas UChB	28
Figura 15. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en el consumo total de fluidos de ratas UChB expuestas al consumo crónico de etanol	29
Figura 16. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en el consumo de agua de ratas UChB expuestas al consumo crónico de etanol.....	30
Figura 17. Actividad ALDH2 en tejido cerebral y hepático de ratas UChB tratadas con vehículo, Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno.....	32
Figura 18. Actividad cerebral de la ALDH2 versus consumo de alcohol de ratas UChB tratadas con Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno 5 mg/kg	33
Figura 19. Relación estructura actividad de compuestos tipo Alda-1 como activadores de la ALDH2.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos actualmente utilizados para tratar el alcoholismo.....	2
Tabla 2. Combinatorias de distintas concentraciones de Alda-1 y flurbiprofeno estudiadas en células PC12	22

ABREVIATURAS

AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Deshidrogenasa aldehídica
ALDH2	Deshidrogenasa aldehídica 2
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
NIAA	Instituto Nacional sobre el Abuso de Alcohol y Alcoholismo
Rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Solución tris base salina
TBST	Solución tris base salina con Tween 20
ZQC	Zona gatillo quimiorreceptora

RESUMEN

Alda-1 es un compuesto que actúa como activador de la aldehído deshidrogenasa ALDH2, y ha mostrado reducir el consumo voluntario de alcohol en modelos animales. Este efecto se debería al aumento en la tasa de eliminación a nivel cerebral del acetaldehído, principal metabolito del etanol, el que ha sido asociado a los efectos adictivos del alcohol. Estudios recientes han mostrado que flurbiprofeno, un tipo de antiinflamatorio no esterooidal es capaz de aumentar la actividad de la ALDH2 de forma similar a Alda-1. En este trabajo se estudió y comparó en un modelo celular de células PC12 la potencia individual y en combinatoria de Alda-1 y flurbiprofeno en la activación de la ALDH2. También se realizaron estudios complementarios en un modelo animal de consumo de alcohol (ratas UChB). Para los estudios *in vitro*, cultivos de células PC12 fueron incubados con concentraciones crecientes de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno y se determinó su efecto en la actividad ALDH2. También se realizaron estudios de dosis combinadas de Alda-1 y flurbiprofeno. Para los estudios en animales se determinó el efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol y el efecto de una dosis de 5 mg/kg/día (5 días) de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en el consumo crónico de alcohol y en la actividad ALDH2 hepática y cerebral de los animales. Los resultados mostraron que Alda-1 y flurbiprofeno son capaces de aumentar la actividad ALDH2 en células PC12 con una potencia similar (3 veces a 40 μM). Sin embargo, a una concentración de 100 μM flurbiprofeno aumentó en casi 5 veces la actividad en células PC12. La incubación conjunta de distintas concentraciones de Alda-1 y flurbiprofeno en células PC12 mostró un efecto potenciador entre ambos fármacos en la activación de la ALDH2. Los estudios en animales mostraron que la administración por vía oral de flurbiprofeno fue eficaz en reducir la adquisición del consumo de alcohol en ratas bebedoras UChB. La administración oral de Alda-1 y flurbiprofeno mostró ser efectiva y de potencia similar en reducir el consumo crónico de alcohol en ratas UChB. La activación farmacológica de la actividad ALDH2 a nivel cerebral se correlacionó de forma inversamente proporcional al nivel de consumo de alcohol en ratas UChB. Los resultados de este trabajo sugieren que la activación farmacológica de la ALDH2 a nivel central podría representar un potencial blanco farmacológico para el tratamiento del alcoholismo.

SUMMARY

Alda-1 is a compound that acts as an activator of the aldehyde dehydrogenase ALDH2 and has been shown to reduce voluntary alcohol consumption in animal models. This effect is due to the increased rate of brain elimination of acetaldehyde, the main metabolite of ethanol, which has been associated with the addictive effects of alcohol. Recent studies have shown that flurbiprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is able to increase ALDH2 activity in a similar way to Alda-1. In this work, the individual and combinatorial potency of Alda-1 and flurbiprofen on ALDH2 activation was studied and compared in a PC12 cell model. Complementary studies were also performed in an animal model of alcohol consumption (UChB rats). For *in vitro* studies, PC12 cell cultures were incubated with increasing concentrations of Alda-1, flurbiprofen and ibuprofen and their effect on ALDH2 activity was determined. Combined dose studies of Alda-1 and flurbiprofen were also performed. For the animal studies, the effect of different doses of flurbiprofen on the acquisition of alcohol consumption and the effect of a dose of 5 mg/kg/day (5 days) of Alda-1, flurbiprofen and ibuprofen on chronic alcohol consumption and on hepatic and brain ALDH2 activity in animals were determined. The results showed that Alda-1 and flurbiprofen are able to increase ALDH2 activity in PC12 cells with a similar potency (3-fold at 40 μ M). However, at a concentration of 100 μ M flurbiprofen increased the activity in PC12 cells by almost 5-fold. Joint incubation of different concentrations of Alda-1 and flurbiprofen in PC12 cells showed a potentiating effect between both drugs on ALDH2 activation. Animal studies showed that oral administration of flurbiprofen was effective in reducing the acquisition of alcohol consumption in UChB drinking rats. Oral administration of Alda-1 and flurbiprofen was shown to be effective and of similar potency in reducing chronic alcohol consumption in UChB rats. The pharmacological activation of ALDH2 activity at the brain level correlated inversely with the level of alcohol consumption in UChB rats. The results obtained in this work suggest that the pharmacological activation of brain ALDH2 could represent a pharmacological target for the treatment of alcohol use disorders.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcoholismo como problema de salud

El alcoholismo o trastorno por consumo de alcohol, es definido por la NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism) como *“un problema con el consumo de alcohol que se agrava en el tiempo y, eventualmente, recibe un diagnóstico médico. Se trata de un trastorno cerebral crónico recidivante que se caracteriza por un deterioro de la capacidad para detener o controlar el consumo de alcohol, a pesar de las consecuencias sociales, laborales o de salud adversas”* (NIAAA, 2020). En el año 2018, la OMS estableció en su publicación *Informe Mundial de Situación sobre Alcohol y Salud*, que cerca de 3 millones de personas fallecen a causa de esta patología anualmente y en la misma añade *“de todas las muertes atribuibles al alcohol, el 28% se debieron a lesiones, como las causadas por accidentes de tránsito, autolesiones y violencia interpersonal; el 21% a trastornos digestivos; el 19% a enfermedades cardiovasculares, y el resto a enfermedades infecciosas, cánceres, trastornos mentales y otras afecciones”* (OMS, 2020). Es decir, el sistema sanitario no sólo es afectado por las muertes violentas que sufren estas personas, sino que también se ve sobrecargado por enfermedades en las que el alcohol es un factor de riesgo.

1.2. Farmacología del alcoholismo

La farmacología actual del alcoholismo se basa en el uso de 3 fármacos principales: disulfiram, naltrexona y acamprosato. En la tabla 1 se muestra información farmacológica de estos fármacos:

Fármaco	Mecanismo de Acción	Dosis	Aprobación FDA
<i>Disulfiram</i>	<i>Inhibidor ALDH</i>	<i>Inicio: 250 mg/día, luego 500 mg/día</i>	<i>Sí</i>
<i>Naltrexona</i>	<i>Antagonista receptores opioides</i>	<i>50/100 mg/día</i>	<i>Sí</i>
<i>Acamprosato</i>	<i>Modula negativamente la neurotransmisión glutamatérgica</i>	<i>333 mg/día</i>	<i>Sí</i>

Tabla 1. Fármacos actualmente utilizados para tratar el alcoholismo. *En la tabla se indica el nombre del medicamento, su mecanismo de acción farmacológico, la dosis recomendada y estatus de aprobación ante la FDA.*

Un problema inherente al uso de estos medicamentos es su falta de efectividad, lo que se puede deber a que los mecanismos moleculares de la adicción al alcohol no están del todo clarificados. En el caso del disulfiram, este fármaco no reduce las ansias del paciente por beber, sino que genera un rechazo al consumo de alcohol, ya que al inhibir la enzima deshidrogenasa aldehídica (ALDH) reduce la eliminación del metabolito acetaldehído, el que al aumentar sus concentraciones plasmáticas genera reacciones desagradables como enrojecimiento facial, cefaleas e hipotensión (Winslow y cols., 2016). Una de las mayores complicaciones de este fármaco, es su falta de adherencia debido a los numerosos efectos secundarios que genera.

En relación a la naltrexona, este es un antagonista de los receptores μ opioides, los cuales están involucrados en la respuesta placentera que causa el alcohol a nivel cerebral y, a diferencia del disulfiram, sí reduce las ansias por beber. Si bien sus efectos secundarios son más tolerables que los del disulfiram, tiene efectos moderados en la disminución del consumo de alcohol y carece de efectividad respecto a la recaída. Sin embargo, parece ser una buena alternativa para tratar el alcoholismo, a pesar del desconocimiento que se tiene sobre los beneficios de la naltrexona (Garbutt, 2010).

El acamprosato, a través del antagonismo de los receptores de glutamato de tipo NMDA, reduce el estado sobre excitado que presentan los pacientes alcohólicos

luego que suspenden su consumo de alcohol, el que representa un alto potencial para la recaída en el hábito. La farmacología de este medicamento es compleja y entendida parcialmente. Este fármaco carece de efectividad en pacientes que son bebedores frecuentes y, de hecho, se ha establecido que sus efectos son levemente distinguibles de un placebo, pese al buen perfil de efectos secundarios que tiene (Witkiewitz y cols., 2012). Es por todo lo explicado que es necesario actualizar el arsenal farmacológico contra el alcoholismo, ya que las herramientas disponibles ofrecen una pobre efectividad y efectos adversos que limitan la adherencia de los pacientes, en especial en el caso del disulfiram.

1.3. Acetaldehído, ALDH2 y su rol en el alcoholismo

El metabolismo del etanol está ampliamente estudiado y es importante entenderlo cuando se habla de fármacos para el tratamiento del alcoholismo como el disulfiram. El alcohol se metaboliza en gran medida en el hígado mediante su oxidación a acetaldehído, reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y en menor medida por el citocromo P-450 2E1. Luego de la oxidación del etanol a acetaldehído, se produce otra oxidación esta vez por la enzima ALDH2 a acetato (Cederbaum y cols., 2012). En la figura 1, se puede ver un resumen general del metabolismo hepático que sufre el etanol.

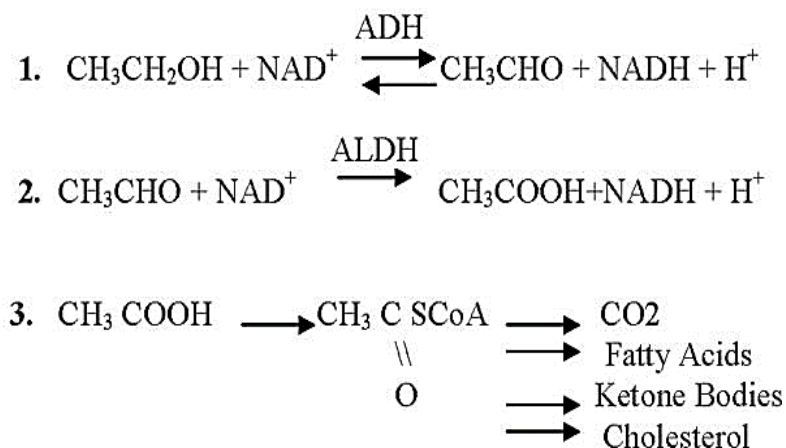


Figura 1. Esquema general de la oxidación hepática del etanol. El alcohol sufre 2 oxidaciones: una por la enzima alcohol deshidrogenasa y otra por la aldehído deshidrogenasa, hasta concluir en la formación del metabolito acetil-CoA. El uso de éste, dependerá de las necesidades del organismo y del estado nutricional del mismo. (Cederbaum y cols., 2012).

La farmacología ha usado esta vía metabólica como blanco para generar fármacos que actúen contra el alcoholismo, como el disulfiram. Desde el punto de vista de la inhibición farmacológica, si se bloquea la acción de la ALDH2 aumentan los niveles sanguíneos de acetaldehído generados a partir del alcohol. Este aumento de los niveles de acetaldehído está asociado a una serie de síntomas desagradables, tales como enrojecimiento, cefaleas y náuseas cuando consumen bebidas alcohólicas (Winslow y cols., 2016). Se propone que el acetaldehído actuaría en una estructura cerebral llamada zona gatillo quimiorreceptora (ZGQ) situada en el área postrema, en el suelo del cuarto ventrículo, que es muy sensible a los estímulos químicos. En esta zona, la barrera hematoencefálica está poco desarrollada y es fácilmente accesible a sustancias proeméticas de la circulación sistémica, como lo es el acetaldehído. Esta área integra estímulos químicos y nerviosos mediante las fibras aferentes vagales que transmiten estímulos al centro del vómito (Colomer, 2008). La principal isoforma de la ALDH que oxida al acetaldehído es la ALDH2 debido a que posee una afinidad muy alta por este metabolito del alcohol. De hecho, tiene una K_m de $0,2 \mu M$, que es 900 veces más baja que la K_m de la ALDH1. Esto convierte a la ALDH2 en una enzima muy eficiente en la eliminación de acetaldehído (Yanfeng y cols. 2018), lo cual determina que en condiciones normales sólo una pequeña cantidad de este metabolito alcance la circulación sanguínea sistémica (Klyosov y cols., 1996). En el cerebro, la oxidación del alcohol a acetaldehído es llevada a cabo por la catalasa, debido a la muy baja expresión de la ADH en el tejido cerebral (Zimatkin y cols., 2006).

Es importante hablar de la actividad del acetaldehído a nivel cerebral, ya que se ha observado en experimentos animales que este compuesto es capaz de ser auto administrado en regiones cerebrales relacionadas con las sensaciones placenteras y el refuerzo de comportamientos (Rodd y cols., 2005). De esta forma, el acetaldehído ha sido propuesto como el metabolito del etanol que estaría mediando sus efectos adictivos. El etanol, como otras sustancias adictivas, es capaz de activar el sistema mesocorticolímbico, el cual está constituido por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares yacen en el área tegmental ventral y cuyos axones se proyectan hacia al núcleo accumbens y la corteza prefrontal. La estimulación de este sistema se ha relacionado con respuestas placenteras a comportamientos necesarios para la supervivencia de los individuos como la alimentación, reproducción, etc. (Israel y

cols., 2015). Existe evidencia de que la autoadministración de acetaldehído en ratas dentro del área tegmental ventral en concentraciones micromolares es capaz de aumentar los niveles de dopamina en el núcleo accumbens y promover su autoadministración (Deehan y cols., 2013). Considerando estos elementos, es posible que el reforzamiento del hábito alcohólico también sea mediado por el acetaldehído. En este mismo sentido, la administración a animales de fármacos que inhiben la catalasa como el 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), que reduciría la formación de acetaldehído a nivel cerebral, ha demostrado ser efectiva en reducir la adquisición del hábito alcohólico, pero no mostrando efectividad en reducir el consumo de etanol en etapas consolidadas (Peana y cols., 2015). Por otra parte, la sobreexpresión de ALDH2, con el consecuente aumento en la tasa de eliminación de acetaldehído, ha demostrado tener efecto en la disminución del consumo de alcohol a largo plazo en modelos animales (Karahanian y cols. 2015). Otra enzima de interés en este aspecto es la catalasa, que a nivel SNC se encarga de la oxidación primaria del alcohol y de la generación de acetaldehído. Es relevante comentar que cuando la expresión de la catalasa es silenciada en animales sin consumo previo de alcohol, éstos reducen el consumo voluntario de esta sustancia adictiva. Esto fue realizado administrando un vector lentiviral anticatalasa en el área tegmental ventral (VTA) en ratas UChB sin consumo previo de alcohol (Karahanian y cols. 2011). Estos antecedentes refuerzan la hipótesis de que el acetaldehído tendría un rol fundamental en los efectos adictivos del alcohol. De esta forma, una mayor actividad de la ALDH2 llevaría a una reducción de este metabolito y, por ende, a un menor reforzamiento del hábito alcohólico.

1.4. Alda-1, un activador farmacológico de la ALDH2.

En el año 2008, Chen y cols., (2008) reportaron el desarrollo de Alda-1, un activador de la enzima ALDH2 que es capaz de aumentar entre 2 a 3 veces la actividad de esta enzima. Se ha propuesto que Alda-1 actuaría como una chaperona química de la ALDH2, promoviendo su actividad catalítica al estabilizar la unión del sustrato y el cofactor al sitio catalítico. Este fármaco fue pensado para ser usado en un trastorno conocido como *Alcohol Flushing Reaction* que se observa en individuos principalmente asiáticos que portan una enzima ALDH2 mutada en su posición 487 (ALDH2*2), la cual es esencialmente inactiva *in vivo* (Hurley y cols., 2002). De esta forma, cuando estos individuos beben alcohol la eliminación del acetaldehído se ve

imposibilitada, lo que genera una serie de síntomas tales como rubor facial, cefalea, hipotensión y náuseas.

Alda-1 es un fármaco altamente lipofílico ($\log P = 4$) que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y activar la ALDH2 cerebral (Fu y cols., 2014). Ha demostrado además propiedades neuroprotectoras en modelos de isquemia/reperfusión asociados a estrés oxidativo, posiblemente a través del aumento de la tasa de eliminación de aldehídos tóxicos como el 4-hidroxinonenal y el malondialdehído (Chen y cols., 2014). Estudios en ratas UChB realizados por Rivera-Meza y cols., (2019), mostraron que la administración de Alda-1 aumenta la actividad de la ALDH2 en hígado y cerebro. Además, encontraron que animales tratados con Alda-1 no desarrollaban el hábito de beber alcohol y que al ser administrado a ratas UChB que consumían de forma crónica alcohol se generaba una reducción de más del 70% en el consumo. Otros aspectos importantes relacionados con este estudio es que el Alda-1 no alteró la tasa de eliminación de etanol ni cambio el consumo de otras sustancias de consumo placentero como la sacarina. Estos resultados posicionan a Alda-1 como un potencial agente farmacológico para el tratamiento del alcoholismo, sin embargo, presenta ciertas desventajas como su baja solubilidad en agua y su carácter experimental, lo que reduce sus posibilidades de ser usado en humanos.

1.5. Flurbiprofeno, otro activador de la ALDH2.

Hosoi y cols., (2014) informaron que el flurbiprofeno (Figura 2), un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido propiónico, era capaz de reducir la agregación de proteínas relacionadas con la señalización asociada a la hormona leptina. En estos estudios en animales, el flurbiprofeno era capaz de reducir la resistencia a la acción de la leptina inducida por el estrés del retículo endoplásmico y revertir cuadros de obesidad. Un hallazgo importante de este estudio fue que una de las proteínas con las que flurbiprofeno interactuaba era la ALDH2, encontrando que de forma similar a Alda-1, el flurbiprofeno era capaz de aumentar la velocidad catalítica de la ALDH2 sin modificar los niveles de expresión ni la estabilidad de la enzima.

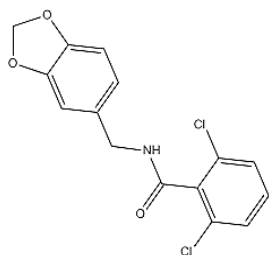
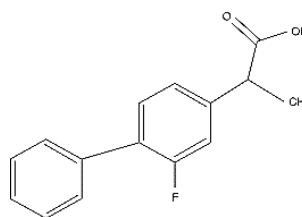
A**B**

Figura 2. Estructuras moleculares de Alda-1 (A) y flurbiprofeno (B).

Es un hallazgo importante el descubrimiento de la capacidad de Alda-1 de activar la ALDH2 y de reducir el consumo de alcohol en modelos animales, sin embargo, las proyecciones de uso clínico de este compuesto están limitadas debido a su carácter experimental actual. Por otro lado, flurbiprofeno presenta un efecto similar a Alda-1 en aumentar la actividad de la ALDH2, pero suma una ventaja adicional al ser un fármaco aprobado para uso en humanos, lo que podría acelerar su potencial uso terapéutico en el alcoholismo. Un punto importante, es que Alda-1 y flurbiprofeno presentan una estructura química diferente entre ellos (Figura 2), pero comparten un efecto farmacológico similar que es la activación de la ALDH2. Estos antecedentes nos permitirían hipotetizar que ambos compuestos aumentan la actividad de la ALDH2 por un mecanismo de acción diferente. Es por ello por lo que en este trabajo se planteó estudiar y comparar en un modelo celular de células PC12 la potencia individual y en combinatoria de Alda-1 y flurbiprofeno de activar la ALDH2 con el objetivo de obtener evidencia experimental de posibles diferencias en sus mecanismos de acción.

2. HIPÓTESIS

Flurbiprofeno y Alda-1 aumentan de forma equivalente la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) en células PC12 en cultivo.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si flurbiprofeno y Alda-1 aumentan de forma equivalente la actividad de la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2) en células PC12 en cultivo.

3.1. Objetivos específicos

- Optimizar la medición de la actividad de la ALDH2 en células PC12 incluyendo la determinación del rango lineal de la relación actividad enzimática versus proteínas totales.
- Determinar el efecto de concentraciones crecientes de Alda-1 en la expresión, actividad y niveles proteicos de la ALDH2 en células PC12.
- Determinar el efecto de concentraciones crecientes de flurbiprofeno e ibuprofeno en la viabilidad celular y la expresión, actividad y niveles proteicos de la ALDH2 en células PC12.
- Determinar el efecto de distintas proporciones Alda-1/flurbiprofeno en la expresión, actividad y niveles proteicos de la ALDH2 en células PC12.

4. MATERIALES

4.1. Material biológico

Células PC12 de feocromocitoma adrenal de rata (CRL-1721, ATCC, EE. UU.)

4.2 Tampones

- Tampón PBS 10X: KCl 0,027M, KH₂PO₄ 0,018 M, NaCl 1,37 M, Na₂HPO₄ 0,1 M.
- Tampón RIPA 1X: NaCl 150mM, Triton x 100 1% [v/v], Deoxicolato de sodio 0,5% [p/v], SDS 0,1% [p/v], TRIS pH 8 50mM.
- Tampón Laemmli 4X: 8% SDS, 20% 2-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,08% azul de bromofenol, Tris HCl 0,250 M pH 6,8.
- Tampón de Corrida: Tris HCl 25mM pH 8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1%
- Tampón de Transferencia: Tris HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM, metanol 20% [v/v].
- TBS 10X: Tris: 200 mM, NaCl 1500 mM pH 7,6 en 1L de agua destilada.
- TBST: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 y pH 7,6.

4.3 Anticuerpos

Anti ALDH2 (R&D, anti-rata, MAB10168-100)

Anti Beta Actina (ABM, anti-rata, G043).

Anticuerpo secundario cabra-anti rata (Invitrogen, anti-rata, 31430).

4.3 Materiales generales

De Sigma (EE.UU.): flurbiprofeno.

De Gibco (EE.UU.): medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); suero equino; suero fetal bovino; tripsina 0.25%-EDTA (1X); penicilina estreptomycin.

De Thermo Scientific (EE.UU.): estándar de peso molecular de proteínas PageRuler Prestained Protein Ladder.

De Whatman (EE. UU.): Membrana de nitrocelulosa 0,45 µm.

De BioRad (EE.UU.): Leche descremada.

De Winkler (Chile): Ponceau-S.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Chile: Alda-1 e ibuprofeno.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivos de células PC12

Las células PC-12 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, suplementado con 2 g/L de NaHCO₃, esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm y complementado con 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomicina. Para la preparación del medio de cultivo completo, se añadió suero equino hasta 10% y suero fetal bovino hasta 5%. Las células se incubaron en placas de poliestireno de 100 x 20 mm en un incubador Series 8000 WJ Thermo Scientific a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzaron 80% de confluencia se procedió a su traspaso para un nuevo ciclo de cultivo. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se agregó 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% y se incubó a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se agregó 4 mL de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y mediante pipeteo se desprendieron completamente las células de la placa. Las células se traspasaron en cantidad adecuada a una nueva placa de cultivo conteniendo 13 mL de medio de cultivo completo. Después, se incubó la placa a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (Maldonado, 2020).

5.2. Lisis celular

A partir de una placa de 10 cm de diámetro con células PC12 a un 80% de confluencia como mínimo, se tripsinaron las células con 1 mL de tripsina, se centrifugaron a 1000x g durante 5 minutos y se lisaron mediante pipeteo con 1 mL de TrisHCl 100 mM pH 8.0, DTT 10 mM, 20% glicerol, 1% Triton X100 (Solito y cols., 2013). Luego, se homogenizó con un ciclo de 5 pulsos con ultrasonido (Omniruptor 250, Omni Int., EE.UU.), manteniéndose en hielo. El homogeneizado se centrifugó a 13.000 x g, 4°C durante 20 min. Este mismo procedimiento se hizo con placas de 35 mm a 80% de confluencia de células PC12 como mínimo, cambiando los volúmenes de tripsina y buffer de lisis a 300 µL.

En ambos casos, las concentraciones de proteína en los homogeneizados se determinaron utilizando el kit BCA para determinación de proteínas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pierce).

5.3. Medición de la actividad ALDH2

La actividad de ALDH2 se determinó en triplicado midiendo la generación de NADH a 340 nm. Para determinar la actividad ALDH2, primero fue necesario cuantificar la línea base de actividad, la cual se determinó a 35°C mezclando el homogeneizado (50-600 µg proteínas totales) en un medio de reacción conteniendo Na₂HPO₄ 34 mM (pH 8,5), pirazol 10 mM, MgCl₂ 5mM, DTT 4 mM, NAD⁺ 0,8mM, de NADH 10 M. Se midió la absorbancia a 340 nm cada 60 segundos durante 10 minutos. Una vez cuantificada la actividad basal, se agregó propionaldehído 21 µM (10 µL) y se cuantificó la actividad ALDH2. Se midió la absorbancia a 340 nm cada 60 segundos durante 10 minutos. Una vez obtenidas las pendientes (la de actividad ALDH2 y basal), se restaron entre ellas y se obtuvo la actividad ALDH2 neta. La actividad se determinó a partir del cambio en la concentración de NADH versus el tiempo y la actividad de ALDH2 se expresó en términos de nmol NADH/min/ mg de proteína.

5.4. Actividad ALDH2 de células PC12 frente a distintas concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno.

El cultivo de células PC12 se incubó con distintas concentraciones de Alda-1 (0, 5, 10, 20, 40 µM), flurbiprofeno (0, 5, 10, 20, 40 µM) e ibuprofeno (0, 5, 10, 20, 40 µM). Los fármacos se disolvieron en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración adecuada de forma que el DMSO no supere el 1% de concentración en el volumen final del medio de cultivo. Los 3 fármacos se obtuvieron de una solución stock preparada para cada uno de ellos: para Alda-1 se preparó una solución de flurbiprofeno 20 mM e ibuprofeno 40 mM. Se tomó una alícuota de stock y se diluyó en DMSO según la concentración requerida de cada fármaco, de tal forma que se inocularon 10 µL al medio de cultivo por cada concentración de fármaco, es decir, 1% del volumen del medio de cultivo. Cultivos controles sólo recibieron 10 µL de DMSO. La actividad ALDH2 en los cultivos se midió como se indica en el punto 5.3 a las 2 h horas de incubación con los fármacos.

5.5. Determinación de los niveles de proteína ALDH2 mediante Western blot.

Se tomó una placa de cultivo celular (10 cm diámetro), se dejó en hielo, se sacó el medio de cultivo y se lavó con PBS. Posteriormente, se drenó el PBS y se agregó 500 µL de tampón RIPA. Las células se homogenizaron mediante sonicación en 2 ciclos de 5 pulsos separados por un intervalo de 5 min en hielo y se centrifugaron a 13.000

x g, 4°C durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se cuantificó la cantidad total de proteínas con un ensayo BCA y se almacenaron las muestras a -20°C. Se mezclaron 3 partes de muestra con 1 parte de tampón Laemmli 4X y se calentó la mezcla a 95-100 ° C durante 10 minutos.

Los geles de poliacrilamida para la separación de las proteínas se generaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

Gel Resolutivo 10%	Cantidad para 2 geles
H2O dd	7,86 mL
Tris HCl 1.5M pH 8,8	5 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	6,7 mL
SDS 10%	200 µL
Persulfato de amonio 8,3%	200 µL
TEMED	10 µL
Total	20 mL

Gel concentrador 5%	Cantidad para 2 geles
H2O dd	5,125 mL
Tris HCl 1M pH 6,8	0,95 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,25 mL
SDS 10%	75 µL
Persulfato de amonio 8,3%	75 µL
TEMED	15 µL
Total	7,5 mL

Los geles se cargaron con 5 a 30 µg de proteínas totales. Como estándar de peso molecular se cargaron 6 µL de PageRuler Prestained Protein Ladder. La electroforesis se realizó en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell BIO-RAD conteniendo Tampón de Corrida a 80 V, 60 mA y 48 W durante 1 hora.

Una vez resueltas las proteínas de acuerdo a su peso molecular, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó formando un “sándwich” conformado por el gel en contacto con la membrana de nitrocelulosa (PROTRAN 0,45 µm, Whatman) y estos cubiertos por dos láminas de papel filtro, una a cada lado y estos cubiertos por dos esponjas de fibra, una por cada lado. La transferencia se llevó a cabo durante 120 minutos a 100 V, 350 mA y 50 W en Tampón de Transferencia. Posteriormente se verificó la correcta transferencia de las proteínas mediante tinción con una solución de rojo Ponceau-S (Ponceau S 0.1% [p/v], ácido acético 5% [v/v]). La tinción con rojo Ponceau-S se retiró mediante 2 lavados con agua destilada y 1 con TBST (Tris base 0,02 M, NaCl 0,2M, pH 7,6, Tween 20 0,1% [v/v]). El bloqueo de los sitios inespecíficos de unión en la membrana se realizó mediante incubación en una solución de leche descremada al 5% [p/v] en TBST durante 1 hora. Luego del bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBST durante toda la noche y con agitación suave a 4°C. El anticuerpo primario utilizados fue anti ALDH2 (1:1000) y anti-beta actina (1:5000). Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 4 veces con TBST durante 15 minutos cada lavado. Luego la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti cabra-anti-rata diluido en TBST (1:10000) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Luego se realizaron 5 lavados con TBST de 15 minutos cada uno con agitación leve y posteriormente la reacción inmunológica se reveló mediante un sustrato quimioluminiscente. La señal luminiscente se detectó y registró en un equipo de fotodocumentación (Araya-Martínez, 2017).

5.6. Animales

Se usaron ratas macho de la línea UChB, las que han sido derivadas de la cepa Wistar y cruzadas selectivamente de acuerdo a su elevado consumo voluntario de alcohol (Quintanilla et al., 2006). El peso de estos animales varió entre 200 a 300 gramos. Los animales fueron alojadas de forma individual en cajas de policarbonato en una habitación con temperatura y humedad controlada bajo un ciclo normal de luz-oscuridad de 12 horas (apagado de luces a las 19:00 horas) con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos *in vivo* se realizaron de acuerdo con las directrices ARRIVE (Kilkenny et al., 2010) y aprobado por la Comité Institucional de Ética en Experimentación Animal (CBA-1125-FMUCH).

5.7. Administración de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno a ratas UChB y determinación de su efecto sobre el consumo voluntario de etanol.

En la Figura 3, se muestra un esquema gráfico de los estudios farmacológicos realizados en ratas UChB.

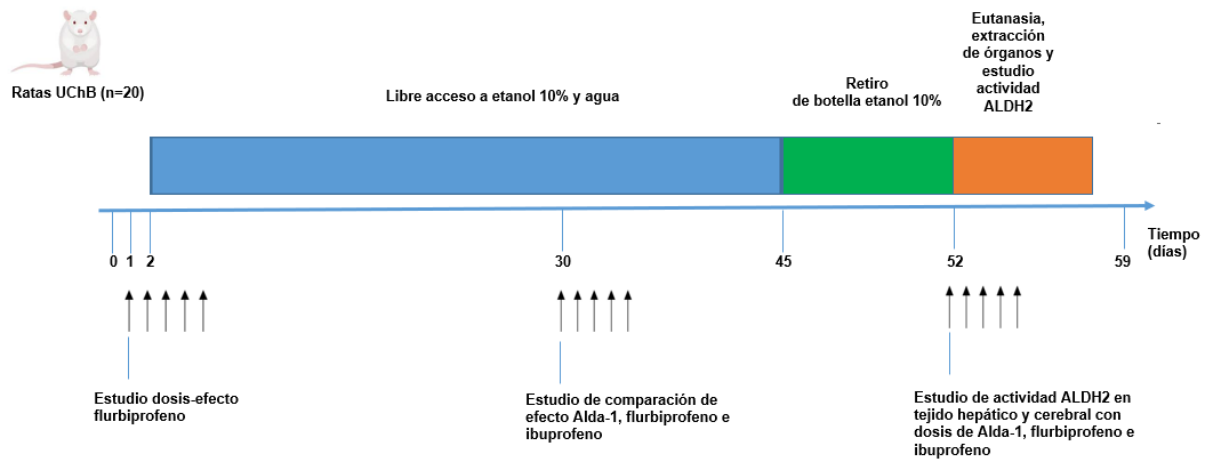


Figura 3. Esquema experimental de los estudios farmacológicos realizado en ratas UChB. En azul se indica el tiempo de estudio en que los animales estuvieron expuestos al libre consumo entre agua y etanol 10%. En verde, se indica el período en que los animales solo tuvieron acceso a la botella de agua. En naranja se indica el tiempo que se dedicó a la eutanasia, la extracción de órganos y el estudio de la actividad ALDH2 en tejido hepático y cerebral de ratas UChB. Las flechas indican los días en los que se administraron los diferentes tratamientos farmacológicos.

En una primera etapa se estudió la relación dosis-efecto de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de etanol en ratas UChB. Para ello, se eligieron 20 ratas UChB, las que se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos, los que fueron administrados durante 5 días con una dosis (v.o.) de flurbiprofeno 2.5 mg/kg (n=5), 5 mg/kg (n=5) y 10 mg/kg (n=5) (suspendido en goma arábica 2%) o el mismo volumen de vehículo (n=5) (goma arábica 2%). La administración oral del fármaco se realizó mediante una sonda metálica intragástrica erogando aproximadamente 1,5 mL por cada administración de una suspensión de flurbiprofeno de 0,5 mg/mL para la dosis de 2.5 mg/kg, 1 mg/mL para la dosis de 5 mg/kg y 2 mg/mL para la dosis de 10 mg/kg. A partir del segundo día de tratamiento, a los animales se les dio libre acceso a dos botellas, una conteniendo etanol al 10% (v/v) o agua. El consumo de etanol se determinó diariamente y se expresó en g de etanol/kg de peso corporal/día y el

consumo de agua se expresó en g agua/kg peso corporal/día. El peso de los animales se registró cada 7 días. Para el estudio del consumo crónico de etanol, en el día 30 de acceso a alcohol 10% y agua, a los animales se les administró por vía oral una dosis diaria de Alda-1 5 mg/kg (n=5), flurbiprofeno 5 mg/kg (n=5), ibuprofeno 5 mg/kg (n=5) o vehículo (n=5) (goma arábica 2%) durante 5 días consecutivos. Los fármacos se prepararon para su administración en suspensiones de 1 mg/mL.

En el día 45 del experimento, se retiró la botella de alcohol 10% manteniéndose la botella con agua. A partir del día 52 los animales fueron nuevamente administrados con una dosis diaria de Alda-1 5 mg/kg (n=5), flurbiprofeno 5 mg/kg (n=5), ibuprofeno 5 mg/kg (n=5) o vehículo (n=5) (goma arábica 2%) durante 5 días consecutivos. Los fármacos se prepararon para tener una concentración de activo de 1 mg/mL. Una hora después de la última dosis de fármaco, los animales fueron eutanizados mediante decapitación y se extrajo el cerebro e hígado de los animales para la posterior medición de la actividad ALDH2 en ellos.

5.8. Medición de actividad de ALDH2 en tejido de rata hepático y cerebral

Se pesaron muestras de tejido (~0,5 g) de cerebro e hígado tratados con Alda-1, flurbiprofeno o ibuprofeno (n=4) o tratados con vehículo (n=4) fueron pesados, luego cortados en trozos pequeños y lavados con solución fosfato salina a 0°C. El tejido hepático fue homogeneizado en cinco volúmenes de Tritón X-100 al 1% y ditioneitol (DTT) 2 mM y el tejido cerebral fue homogeneizado en 4 volúmenes de Tritón X-100 al 1% y ditioneitol (DTT) 2 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 20800 g a 4 °C durante 20 min y se recuperaron los sobrenadantes. La actividad de ALDH2 se determinó en duplicado midiendo la generación de NADH a 340 nm a 35 °C, mezclando 20 µL de sobrenadante de cada tejido con una solución de Na₂HPO₄ 34 mM (pH 8,5) que contiene pirazol 10 mM, 5 mM MgCl₂, DTT 4 mM, NAD⁺ 0,8 mM, NADH 10 µM y propionaldehído 21 µM. Las concentraciones de proteína en los sobrenadantes se determinaron usando el Bio- Kit de ensayo de proteína Rad. La actividad de ALDH2 expresó como nmol NADH/min/mg proteína.

5.9. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 8 (Software GraphPad, Inc.). Los datos se expresaron como la media \pm SEM y fueron analizados por ANOVA de una o dos vías complementado con una prueba multicomparativa de Tukey. La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Optimización de la medición de la actividad de la ALDH2 en células PC12, incluyendo la determinación del rango lineal de la relación actividad enzimática versus proteínas totales.

6.1.1 Optimización del ensayo enzimático de actividad de la ALDH2

En consideración que era la primera vez que se medía actividad ALDH2 en células de feocromocitoma de rata (PC12), se decidió iniciar las mediciones usando cultivos de células PC12 en las placas de cultivo de mayor tamaño que estaban disponibles en el laboratorio y que correspondían a placas de 100 mm de diámetro. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 100% fueron lisadas con 1 mL de tampón de lisis como se describe en Métodos 5.3. Para establecer si existía una correlación lineal entre la cantidad de lisado y la actividad enzimática, en esta experiencia se ensayaron 80, 160 y 320 μL de lisado celular por triplicado. Los resultados mostraron que en todas las pruebas se detectó actividad enzimática con un coeficiente de correlación lineal entre la actividad ALDH2 y el volumen de lisado de $R = 0.8883$ (Figura 4). Además, se observó que al pasar de 80 a 160 μL de lisado se duplicó la actividad enzimática lo que era congruente con una relación lineal entre ambas variables. Sin embargo, al duplicar el volumen de lisado de 160 a 320 μL de lisado se observó sólo un aumento aproximado de 10% en la actividad enzimática, lo que sugería una desviación del comportamiento lineal.

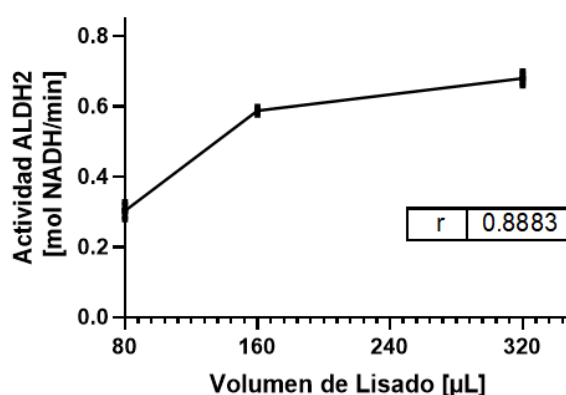


Figura 4. Actividad ALDH2 a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 cultivadas en placa de 100 mm. Cada punto representa la medición de actividad ALDH2 por triplicado \pm SEM a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 ($n=3$). La relación entre los datos se expresó en función del coeficiente de correlación lineal R .

Una vez determinada la factibilidad de medir la actividad ALDH2 en células PC12, se decidió reducir el tamaño de los cultivos con el objetivo de reducir los costos y tiempos de trabajo. Para ello los cultivos se realizaron en placas de cultivo de 35 mm y una vez alcanzada la confluencia, las células se lisaron en 300 μL de tampón de lisis. Al igual que en el punto anterior, se estudió la correlación entre la actividad ALDH2 observada y el volumen de lisado ensayado, en este caso 25, 50, 75 y 100 μL de lisado. Los resultados mostraron una mejor correlación lineal entre actividad ALDH2 y volumen de lisado al usar placas de 35 mm ($R= 0,9983$) en comparación a los ensayos realizados en placas de 100 mm (Figura 5). En base a estos resultados se decidió seleccionar para los ensayos futuros el cultivo de las células PC12 en placas de 35 mm y la utilización de 100 μL de lisado para los ensayos enzimáticos.

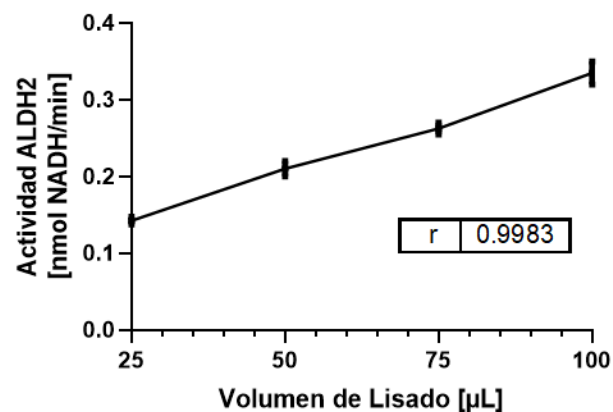


Figura 5. Actividad ALDH2 a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 cultivadas en placa de 35 mm. Cada punto representa la medición de actividad ALDH2 por triplicado \pm SEM a diferentes volúmenes de lisado de células PC12 provenientes de un cultivo realizado en placas de 35 mm ($n=3$). La relación entre los datos se expresó en función del coeficiente de correlación lineal R .

6.2. Efecto de concentraciones crecientes de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad, niveles proteicos y expresión de la ALDH2 en células PC12.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de medición de la actividad ALDH2 en células PC12 se procedió a evaluar el efecto de concentraciones crecientes de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 de células PC12 en cultivo.

En relación al experimento realizado con Alda-1, cultivos de células PC12 fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con una concentración en el medio de cultivo de Alda-1 de 10, 20 y 40 μM disuelto en DMSO. Como control se estableció un cultivo tratado con 10 μL de DMSO.

Los resultados mostraron la actividad ALDH2 aumentó a medida que se usaban mayores concentraciones de Alda-1 siguiendo una correlación lineal de $R=0,9509$ (Figura 6). Sin embargo, se observó un menor incremento de la actividad al usar concentraciones mayores a 20 μM de Alda-1 y con una tendencia a alcanzar una meseta en los valores de actividad. Los valores de actividad ALDH2 fluctuaron en un rango entre 8,75 nmol NADH/min/mg proteína para el control vehículo y de 22,37 nmol NADH/min/mg proteína al usar Alda-1 a una concentración de 40 μM . Esto representó un aumento de 2,55 veces en la actividad ALDH2.

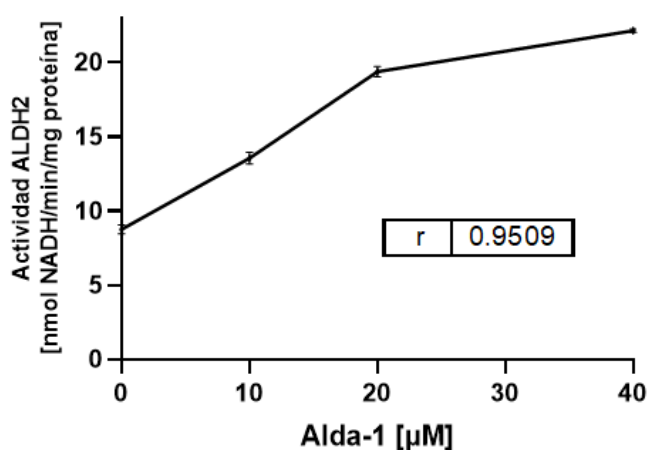


Figura 6. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de Alda-1. La actividad fue registrada en términos de nmol NADH/min/mg proteína. Cada punto representa el promedio de la actividad de tres mediciones independientes y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones ($n=3$).

En relación al experimento realizado con flurbiprofeno, cultivos de células PC12 fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con una concentración en el medio de cultivo de flurbiprofeno de 10, 20, 40, 50 y 100 μM disuelto en DMSO. Como control se estableció un cultivo tratado con 10 μL de DMSO.

Los resultados mostraron la actividad ALDH2 aumentó a medida que se usaban mayores concentraciones de flurbiprofeno siguiendo una correlación lineal con $R=0,9740$ (Figura 7). No se observó un aplanamiento de la curva en las concentraciones más elevadas de flurbiprofeno. Los valores de actividad ALDH2 fluctuaron en un rango entre 8,75 nmol NADH/min/mg proteína para el control vehículo y de 42,3 nmol NADH/min/mg proteína al usar flurbiprofeno a una concentración de 100 μM . Esto representó un aumento de 4,8 veces en la actividad ALDH2.

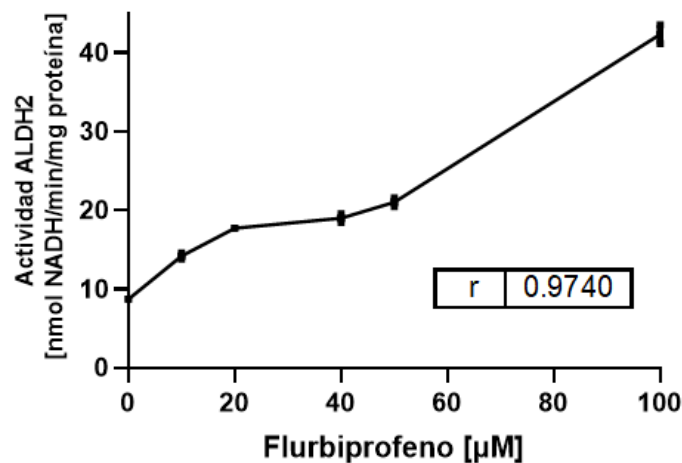


Figura 7. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de flurbiprofeno. La actividad fue registrada en términos de nmol NADH/min/mg proteína. Cada punto representa el promedio de la actividad de tres mediciones independientes y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones ($n=3$).

En relación al experimento realizado con ibuprofeno, cultivos de células PC12 fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con una concentración en el medio de cultivo de ibuprofeno de 50 y 100 μM disuelto en DMSO. Como control se estableció un cultivo tratado con 10 μL de DMSO.

Los resultados mostraron la actividad ALDH2 no mostró cambios frente a la incubación con concentraciones crecientes de ibuprofeno con un $R= -0,1555$ (Figura 8). Los valores de actividad ALDH2 fluctuaron en un rango entre 8,75 nmol NADH/min/mg proteína para el control vehículo y de 8,77 nmol NADH/min/mg proteína al usar ibuprofeno a una concentración de 100 μM . Esto representó un aumento de 0,02 veces en la actividad ALDH2.

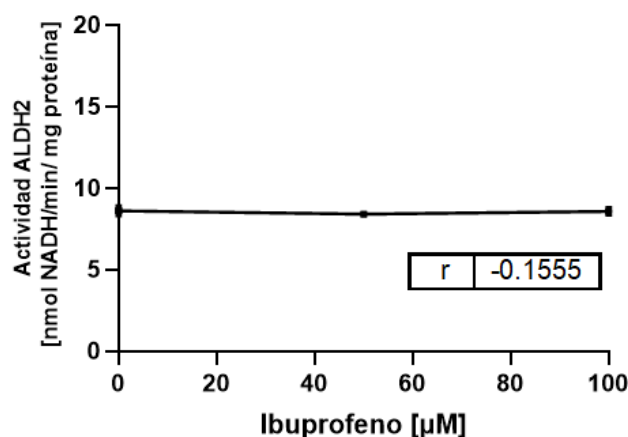


Figura 8. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de ibuprofeno. La actividad fue registrada en términos de nmol NADH/min/mg proteína. Cada punto representa el promedio de la actividad de tres mediciones independientes y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones ($n=3$).

Una vez determinado el efecto de las diferentes concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 de células PC12 en cultivo, se procedió a estudiar el efecto de las mismas concentraciones de estos fármacos en los niveles proteicos de ALDH2 medidas por Western blot.

En la Figura 9 se muestran los resultados del análisis de Western blot para la enzima ALDH2 de cultivos de células PC12 sin tratar, tratadas con vehículo (DMSO 0,5%), Alda-1 (10, 20 y 40 μM), flurbiprofeno (10, 20, 40, 50 y 100 μM) e ibuprofeno (50 y 100 μM). Como control de la carga de proteínas se estimaron los niveles de beta-actina en las mismas condiciones experimentales. Cada carril de gel de poliacrilamida fue cargado con 30 μg de proteínas totales cuantificadas con kit BCA. Los resultados muestran que no hay cambios apreciables en la expresión de ALDH2 ni una variación apreciable en el control de carga (beta actina).

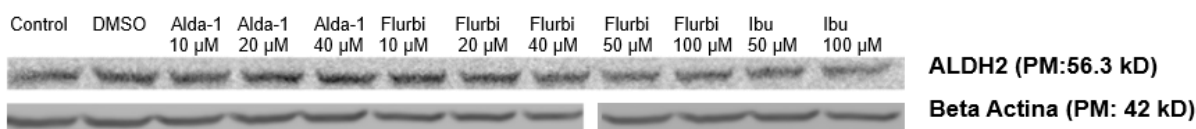


Figura 9. Análisis de Western blot de los niveles proteicos de ALDH2 y beta actina en células PC12 expuestas a distintas concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno. Cultivos de células PC12 fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con Alda-1 (10, 20 y 40 μM), flurbiprofeno (Flurbi) (10, 20, 40, 50 y 100 μM) e ibuprofeno (Ibu) (50 y 100 μM). Como controles se usaron cultivos de células PC12 sin tratamiento alguno (Control) o incubadas con 0.5% de DMSO.

6.3. Determinación del efecto de distintas proporciones Alda-1/flurbiprofeno en la expresión, actividad y niveles proteicos de la ALDH2 en células PC12.

En este experimento se estudió el efecto en la actividad ALDH2 de células PC12 al incubarlas de forma combinada con Alda-1 y flurbiprofeno en distintas concentraciones. Para ello, se realizaron las posibles combinatorias posibles al considerar las siguientes concentraciones de cada fármaco: 0 (vehículo), 10, 20, y 40 μM. En la Tabla 2, se muestran las 16 combinatorias de Alda-1 y flurbiprofeno estudiadas.

Fármaco	Flurbiprofeno 0 μM	Flurbiprofeno 10 μM	Flurbiprofeno 20 μM	Flurbiprofeno 40 μM
Alda-1 0 μM	1	2	3	4
Alda-1 10 μM	5	6	7	8
Alda-1 20 μM	9	10	11	12
Alda-1 40 μM	13	14	15	16

Tabla 2. Combinatorias de distintas concentraciones de Alda-1 y flurbiprofeno estudiadas en células PC12. Cultivos de células PC12 fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con las distintas combinatorias de Alda-1 y flurbiprofeno. Luego fueron lisadas y homogenizadas para la determinación de la actividad ALDH2. En el caso de las concentraciones 0 μM de cada fármaco, se adicionó al medio de cultivo el vehículo de disolución DMSO.

En la figura 10, se observan los resultados de la actividad ALDH2 en las células PC12 incubadas con las diferentes combinaciones de concentraciones de Alda-1 y flurbiprofeno. Los resultados muestran en general que el aumento de la actividad de la ALDH2 por Alda-1 se ve potenciado por la presencia de flurbiprofeno. La curva azul corresponde a la actividad ALDH2 de células PC12 con distintas concentraciones de Alda-1 en ausencia de flurbiprofeno; en ella se observa un aumento de la actividad ALDH2 a medida que se incrementa la concentración de Alda-1, alcanzado un máximo de 22,4 nmol NADH/min/mg proteína. La curva roja corresponde a la actividad ALDH2 de células PC12 con distintas concentraciones de Alda-1 en presencia de flurbiprofeno 10 μ M, alcanzado un máximo de actividad de 36 nmol NADH/min/mg proteína a 10 μ M de Alda-1. La curva verde corresponde a la actividad ALDH2 de células PC12 con distintas concentraciones de Alda-1 en presencia de flurbiprofeno 20 μ M, alcanzado un máximo de 57,7 nmol NADH/min/mg proteína a 20 μ M de Alda-1. La curva púrpura corresponde a la actividad ALDH2 de células PC12 con distintas concentraciones de Alda-1 en presencia de flurbiprofeno 40 μ M, alcanzado un máximo de actividad de 94 nmol NADH/min/mg proteína a 20-40 μ M de Alda-1. Un análisis de ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo de flurbiprofeno sobre la actividad ALDH2 inducida por Alda-1 ($F(3,32) = 3573$; $p < 0.0001$). Asimismo, se puede observar que la inducción de la actividad de la ALDH2 inducida por flurbiprofeno también se ve potenciada por Alda-1. Un análisis de ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo de flurbiprofeno sobre la actividad ALDH2 inducida por Alda-1 ($F(3,32) = 1904$; $p < 0.0001$).

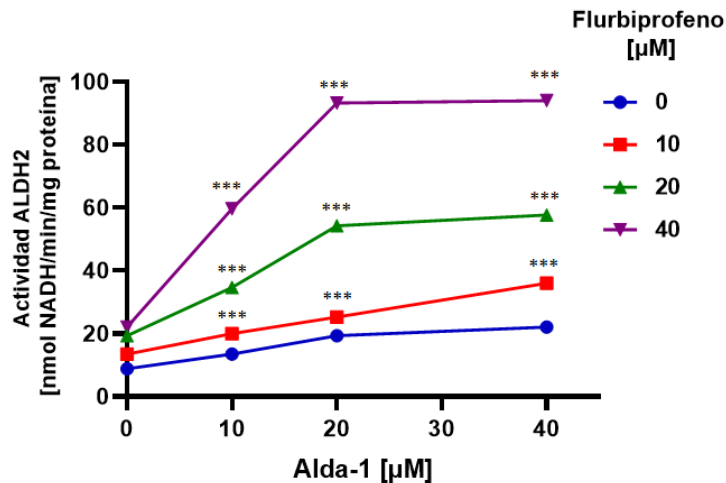


Figura 10. Actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de concentraciones crecientes y combinadas de flurbiprofeno y Alda-1. La actividad fue registrada en nmol NADH/minuto/mg proteína. Cada punto representa el promedio de la actividad de tres mediciones independientes ($n=3$) y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones. Un análisis de ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo de flurbiprofeno sobre la actividad inducida por Alda-1 [$F(3,32)=3573$; $p<0,0001$]. *** $p<0,001$, test multicomparativo de Tukey.

6.4. Estudio del efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol en ratas bebedoras UChB.

Los efectos inductores de flurbiprofeno en la actividad de la ALDH2 mostrados en las secciones 6.2 y 6.3 indican que su efecto farmacológico es muy similar a Alda-1. Considerando que estudios previos han mostrado que Alda-1 es capaz de reducir el consumo de alcohol en un modelo animal de alcoholismo (Rivera-Meza y cols., 2019) es que en este objetivo adicional de la Memoria se decidió estudiar el efecto de flurbiprofeno en el consumo de alcohol en ratas.

Para ello se utilizaron ratas de la línea UChB, las cuales son reconocidas en la literatura como un modelo animal de consumo excesivo de alcohol (Quintanilla y cols., 2006). En este experimento se estudió específicamente el efecto de distintas dosis de flurbiprofeno (2,5; 5 y 10 mg/kg/día) en la adquisición del consumo voluntario de alcohol en ratas UChB.

Los resultados mostraron que la administración de flurbiprofeno resultó en una inhibición de la adquisición del consumo de alcohol en ratas UChB (Figura 11). Al término del día 5 de administración del fármaco, las ratas tratadas con flurbiprofeno

presentaron un consumo de alcohol cercano a los 3 g/kg/día, mientras que los animales que recibieron vehículo consumían aproximadamente 9 g/kg/día. Este efecto representó aproximadamente un 70% de reducción en el consumo de alcohol, el que fue similar para las 3 dosis de flurbiprofeno usadas. Una vez suspendida la administración de flurbiprofeno, los animales aumentaron rápidamente su consumo de alcohol, alcanzando los niveles del grupo vehículo en aproximadamente 5 días después de la retirada del fármaco. En los siguientes 13 días de experimentación, los animales de los distintos grupos no presentaron diferencias significativas en su consumo de alcohol, esto en base a un análisis ANOVA de 2 vías de este período ($p > 0,05$).

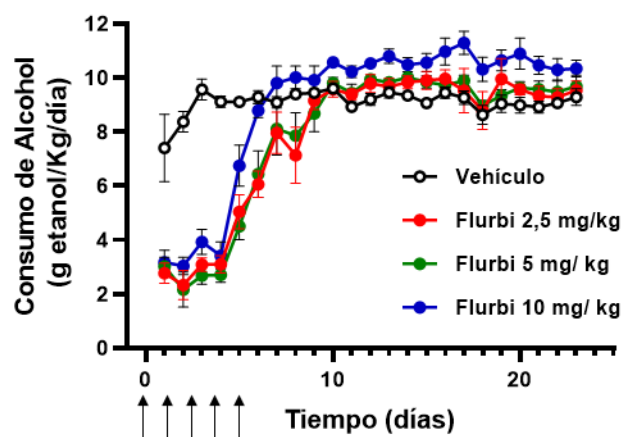


Figura 11. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol de ratas UChB. *Ratas UChB no expuestas previamente al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con flurbiprofeno (flechas negras) 2,5; 5 o 10 mg/kg durante 5 días (n=5). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El día 1 los animales fueron expuestos a un paradigma de libre elección entre agua y etanol 10%. Cada punto representa el consumo de alcohol por día de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.*

Para determinar si la reducción en el consumo de alcohol fue específica para la solución que contenía etanol, se estudió cómo el tratamiento con flurbiprofeno pudo afectar el consumo total de fluidos de los animales. Los resultados de la Figura 12 muestran que los animales presentaron un consumo de fluidos totales que fue similar para todos los grupos tanto tratados con las distintas dosis de flurbiprofeno como con vehículo. Sin embargo, un análisis de ANOVA de dos vías mostró que sólo se detectó una diferencia significativa en el consumo de fluido total para el grupo tratado con

flurbiprofeno 10 mg/kg respecto del grupo tratado con vehículo (ANOVA de 2 vías $p < 0,05$; test de comparación múltiple de Tukey $p < 0,0001$).

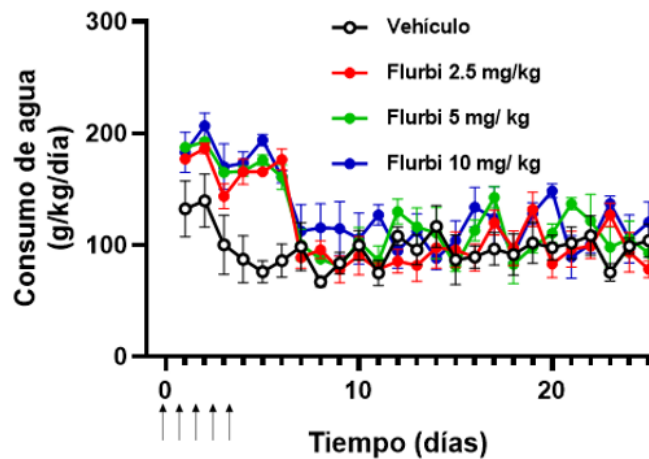


Figura 12. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en el consumo total de fluidos por ratas UChB expuestas a un paradigma de adquisición del consumo de etanol. *Ratas UChB no expuestas previamente al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con flurbiprofeno (flechas negras) 2,5; 5 o 10 mg/kg durante 5 días (n=5). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El día 1 los animales fueron expuestos a un paradigma de libre elección entre agua y etanol 10%. Cada punto representa el consumo total de fluidos por día de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.*

También se analizó el consumo de agua de los distintos grupos de animales utilizados en este experimento. Los resultados de la Figura 13 muestran que la administración de flurbiprofeno resultó en un aumento en el consumo de agua de los animales en comparación al grupo tratado con vehículo, observándose un efecto muy similar para las 3 dosis de flurbiprofeno estudiadas. Una vez discontinuado el tratamiento con flurbiprofeno, los animales redujeron su consumo de agua paulatinamente para alcanzar el nivel de consumo del grupo vehículo a partir del día 7-8 del experimento. En el resto del experimento todos los grupos presentaron un consumo de agua similar del orden de 100 mL de agua/kg/día (ANOVA de 2 vías $p > 0,05$).

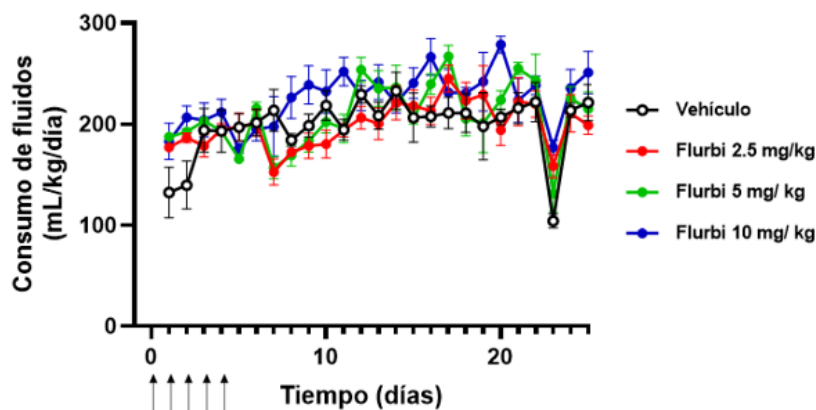


Figura 13. Efecto de distintas dosis de flurbiprofeno en el consumo de agua por ratas UChB expuestas a un paradigma de adquisición del consumo de etanol. Ratras UChB no expuestas previamente al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con flurbiprofeno (flechas negras) 2,5; 5 o 10 mg/kg durante 5 días ($n=5$). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El día 1 los animales fueron expuestos a un paradigma de libre elección entre agua y etanol 10%. Cada punto representa el consumo de agua por día de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.

6.5. Estudio del efecto de una misma dosis de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en el consumo crónico de alcohol en ratas UChB.

Una vez estudiado el efecto del flurbiprofeno en la *adquisición* del consumo de alcohol en ratas UChB, los animales continuaron bajo el paradigma de libre elección entre agua y etanol 10%. A partir del día 30 del experimento, se estudió el efecto de flurbiprofeno en la *mantención* del consumo de alcohol y se comparó además con el efecto ejercido por Alda-1 e ibuprofeno. Para ello, se seleccionó la dosis de 5 mg/kg/día de flurbiprofeno en base al experimento anterior (Figura 11), en donde se observó el mayor efecto reductor de la adquisición del consumo de alcohol para esta dosis. Con el objetivo de comparar la potencia de flurbiprofeno versus Alda-1 e ibuprofeno en la reducción del consumo crónico de alcohol, es que para estos 2 últimos fármacos también se usó una dosis de 5 mg/kg/día.

En la figura 14, se observa que los 3 fármacos estudiados son capaces de disminuir el consumo de alcohol respecto al vehículo. Sin embargo, este efecto es mucho más pronunciado para Alda-1 y flurbiprofeno. Para Alda-1 y flurbiprofeno el consumo promedio de alcohol durante el período de tratamiento fue de 3,82 y 3,87 gramos, respectivamente. Esto representa una disminución de aproximadamente 66% en el consumo de alcohol respecto del grupo vehículo. El

consumo promedio de alcohol durante los 5 días de tratamiento para el grupo tratado con ibuprofeno fue de 6,8 gramos, lo que representa una reducción de 21% en el consumo de alcohol. Una vez terminada la administración de los fármacos, los animales retomaron paulatinamente su consumo de alcohol alcanzando los niveles del grupo vehículo al cabo de 7 días. Un análisis de ANOVA de 2 vías de los últimos 4 días de consumo (42-45) no revela diferencias significativas entre los grupos ($p>0,05$).

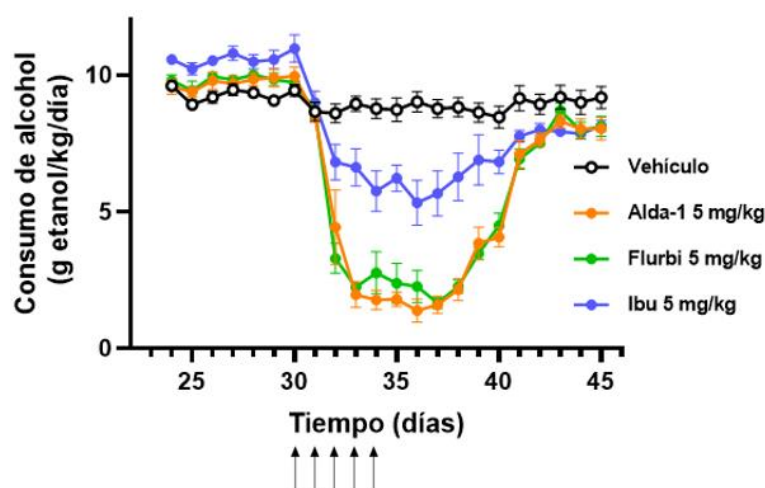


Figura 14. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en la mantención del consumo crónico de alcohol en ratas UChB. Ratas UChB expuestas por 30 días al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con Alda-1 5 mg/kg, flurbiprofeno 5 mg/kg e ibuprofeno 5 mg/kg (flechas negras) durante 5 días ($n=5$). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El gráfico muestra el consumo de alcohol a partir del día 24. Cada punto representa el consumo de alcohol por día de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.

Se estudió también el efecto de la administración de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en el consumo total de fluidos. En la Figura 15, se puede observar que el consumo de fluidos fue similar en todos los grupos a lo largo de este experimento. Un análisis ANOVA de 2 vías para el consumo de fluidos entre los días 24 y 45 del experimento no mostró diferencias estadísticamente significativas por acción del tratamiento ($p>0,05$).

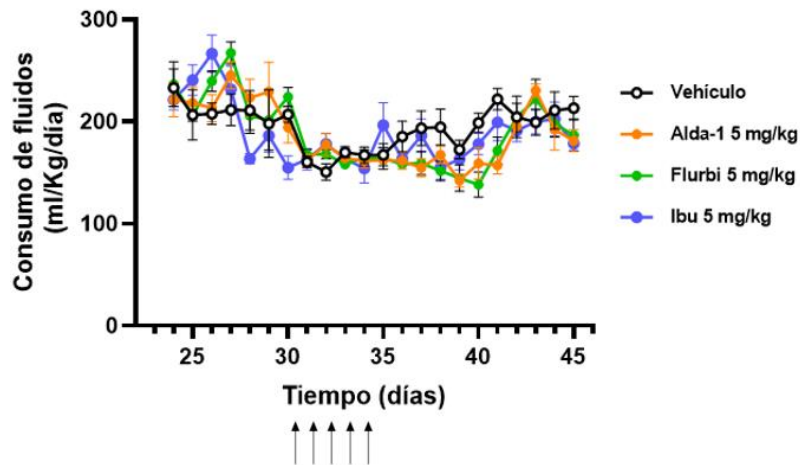


Figura 15. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en el consumo total de fluidos de ratas UChB expuestas al consumo crónico de etanol. *Ratas UChB expuestas por 30 días al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con Alda-1 5 mg/kg, flurbiprofeno 5 mg/kg e ibuprofeno 5 mg/kg (flechas negras) durante 5 días (n=5). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El gráfico muestra el consumo de fluidos a partir del día 24. Cada punto representa el promedio del consumo total de fluidos (agua y solución de alcohol 10%) diario de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.*

En la figura 16 se muestra también el consumo de agua en los grupos tratados con vehículo, Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno entre los días 24 y 45 del experimento. Los resultados muestran que la administración de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno resultó en un aumento del consumo de agua por parte de los animales, el que luego del término de la administración de los fármacos disminuyó al nivel de consumo de los animales tratados con vehículo.

En el caso de ibuprofeno, el promedio del consumo de agua durante su administración fue de $101,4 \pm 29,7$ g/kg/día, lo que fue 1,5 veces mayor que el consumo de los animales tratados con vehículo ($68,2 \pm 23,7$). Un análisis ANOVA de 2 vías determinó una diferencia significativa del consumo de agua entre los grupos vehículo e ibuprofeno ($p < 0,05$; test de comparación múltiple de Tukey $p < 0,0001$). Por otro lado, Alda-1 y flurbiprofeno promedian un consumo de $118 \pm 8,83$ y $115 \pm 2,6$ gramos de agua durante los 5 días de tratamiento, lo que representa un aumento de 1,69 y 1,7 veces respecto del grupo tratado con vehículo. Luego de terminar la administración de fármacos, los animales

presentaron un consumo promedio de agua que oscilaba los 100 gramos por día (107 ± 28 para vehículo; 92 ± 20 para Alda-1; 109 ± 13 para flurbiprofeno y 99 ± 10 para ibuprofeno). En este período final no se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados según un análisis ANOVA de 2 vías ($p > 0,05$).

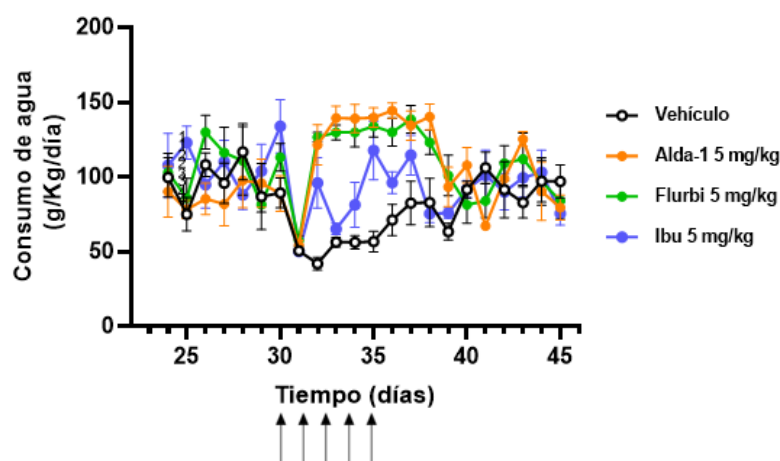


Figura 16. Efecto de flurbiprofeno, Alda-1 e ibuprofeno en el consumo de agua de ratas UChB expuestas al consumo crónico de etanol. *Ratas UChB expuestas por 30 días al consumo de alcohol fueron administradas diariamente con Alda-1 5 mg/kg, flurbiprofeno 5 mg/kg e ibuprofeno 5 mg/kg (flechas negras) durante 5 días (n=5). El grupo vehículo recibió un volumen similar del medio de suspensión (goma arábica 2% en agua). El gráfico muestra el consumo de agua a partir del día 24. Cada punto representa el consumo de alcohol por día de cada grupo de animales y las barras representan el error (\pm SEM) de las mediciones.*

6.6. Efecto de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 en tejido cerebral y hepático de ratas UChB.

Una vez determinado el efecto de los fármacos estudiados en el consumo de alcohol en ratas UChB, se estudió el efecto de estos fármacos en la actividad de la ALDH2 a nivel cerebral y hepático. Para ello, después del día 45 de experimento se suprimió el acceso a la botella de alcohol, manteniendo sólo el acceso a agua durante 1 semana. Luego, los animales fueron tratados nuevamente durante 5 días con una dosis diaria de Alda-1 5 mg/kg, flurbiprofeno 5 mg/kg, ibuprofeno 5 mg/kg o un volumen similar de vehículo (goma arábica 2%). Una hora después de la última dosis, los animales fueron eutanizados y se extrajo el cerebro e hígado

de forma rápida. Los tejidos fueron procesados para la medición de la actividad ALDH2 según se indica en Métodos 5.8.

En la figura 17, se observan los resultados del estudio de actividad ALDH2 en tejido hepático y cerebral de los animales tratados con vehículo, Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno. Los resultados muestran que en ambos tejidos la administración de Alda-1 y flurbiprofeno resultó en un aumento significativo de la actividad ALDH2 respecto del grupo vehículo. Mientras que los animales tratados con ibuprofeno sólo presentaron un leve aumento de la actividad ALDH2 en tejido cerebral. En el caso del hígado, la administración de Alda-1 5 mg/kg y flurbiprofeno 5 mg/kg resultó en un aumento de 2,7 e 3 veces en la actividad de la ALDH2 respecto del grupo vehículo (ANOVA de 1 vía $p < 0,05$; test de comparación múltiple de Tukey $p < 0,0001$). La actividad ALDH2 inducida por Alda-1 y flurbiprofeno no presentaron diferencias significativas entre sí a nivel hepático ($p > 0,05$). En el grupo tratado con ibuprofeno 5 mg/kg la actividad aumentó sólo 1,08 veces, el que no fue significativo respecto al grupo vehículo ($p > 0,05$).

Respecto al tejido cerebral, la administración de Alda-1 5 mg/kg y flurbiprofeno 5 mg/kg resultó en ambos casos en un aumento de aproximadamente 4 veces en la actividad de la ALDH2 respecto del grupo vehículo (ANOVA de 1 vía $p < 0,05$; test de comparación múltiple de Tukey $p < 0,0001$).

La actividad ALDH2 inducida por Alda-1 y flurbiprofeno no presentó diferencias significativas entre sí a nivel cerebral ($p > 0,05$). En el grupo tratado con ibuprofeno 5 mg/kg la actividad aumentó sólo 1,6, el que fue significativo respecto al grupo vehículo ($p < 0,05$).

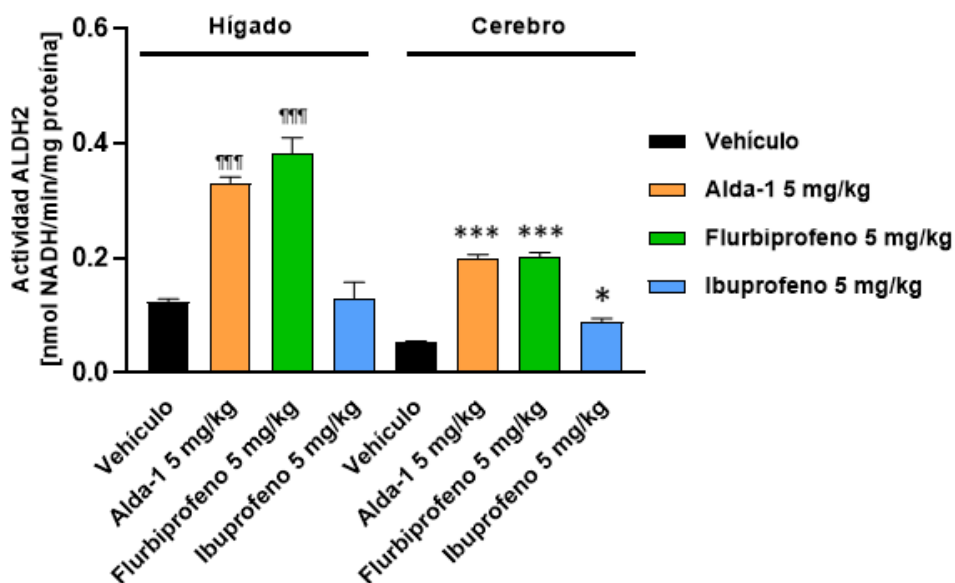


Figura 17. Actividad ALDH2 en tejido cerebral y hepático de ratas UChB tratadas con vehículo, Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno. Los animales fueron tratados durante 5 días con vehículo (goma arábica 2%), Alda-1 5 mg/kg, flurbiprofeno 5 mg/kg e ibuprofeno 5 mg/kg (n=5). La actividad ALDH2 se expresó en términos de nmol NADH/minuto/mg proteína. Cada barra representa el promedio de la actividad de dos mediciones \pm SEM. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía de forma independiente para cada tejido (Hígado: ANOVA de 1 vía $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. vehículo. Cerebro: ANOVA de 1 vía $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. vehículo).

Lo planteado por este estudio y en el realizado por Rivera-Meza y cols. (2019) es que a mayor actividad cerebral de la ALDH2 debería encontrarse un menor consumo de alcohol. Esto se observa en la Figura 18, que muestra el consumo de alcohol de las ratas UChB durante la administración de los distintos fármacos (fase crónica) en función de la actividad ALDH2 en tejido cerebral. Los resultados muestran una relación inversamente proporcional ($r: -0,9259$) entre ambos factores, reafirmando la idea de que la activación de la ALDH2 cerebral podría constituir un blanco farmacológico para la terapéutica del alcoholismo.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que tanto Alda-1 como flurbiprofeno son capaces de aumentar la actividad ALDH2 en células PC12, teniendo ambos una potencia similar a concentraciones iguales. El otro AINE estudiado, ibuprofeno, no mostró capacidad para aumentar la actividad ALDH2 en células PC12. Por otro lado, ninguno de los fármacos seleccionados generó cambios en los niveles proteicos de la ALDH2, lo que da entender que la acción farmacológica de Alda-1 y flurbiprofeno está mediada por una interacción directa con la enzima ALDH2 y no por un mecanismo relacionado con la inducción enzimática. Cuando se estudió el efecto combinado de Alda-1 y flurbiprofeno en cultivo de células PC12, se observó un efecto de potenciación entre ellos, lo que sugiere un mecanismo de activación de ALDH2 diferente entre ambos fármacos. Los resultados obtenidos *in vivo* en ratas UChB muestran congruencia con lo estudiado en células PC12, ya que Alda-1 5 mg/kg y flurbiprofeno 5 mg/kg aumentaron de forma similar la actividad ALDH2 tanto en cerebro (~4 veces) como en tejido hepático (~3 veces), mientras que ibuprofeno mostró solo un aumento leve (1,6 veces) de la actividad ALDH2 en cerebro. Estos efectos se tradujeron en una disminución del consumo de alcohol tanto en la fase adquisición como en la fase de consumo crónico en los animales tratados con Alda-1 y flurbiprofeno, respecto a los animales tratados con vehículo. Algo sorprendente, fue el hecho de que ibuprofeno 5 mg/kg haya sido capaz de disminuir (aunque levemente) el consumo de alcohol en la fase de adquisición y de consumo crónico, considerando que en los ensayos *in vitro* no logró registrar un aumento significativo en la actividad de ALDH2 en células PC12.

El hecho de que flurbiprofeno sea capaz de aumentar la actividad ALDH2 en líneas celulares no es novedoso, ya que Hosoi y cols. (2014) estudiaron la actividad ALDH2 en células HEK293-Ob-Rb (Ob-Rb es un receptor humano de leptina), encontrando un aumento significativo de aproximadamente 5 en la actividad ALDH2 cuando se incubaban con flurbiprofeno 100 μ M luego de 4 horas. Este resultado es concordante con lo encontrado en la presente investigación, ya que con flurbiprofeno 100 μ M la actividad ALDH2 en células PC12 aumentó 4,6 veces en relación a las células no tratadas. Sin embargo, es necesario destacar

ciertas diferencias con la metodología usada en este estudio y el realizado por Hosoi y cols. (2014). Por ejemplo, en el estudio de Hosoi se usó un kit de ensayo colorimétrico para medir la actividad de la ALDH2, en el cual mediante el uso de un anticuerpo específico para la ALDH2 se logra la especificidad de la medición. En dicho kit, el sustrato utilizado es acetaldehído a una concentración de 25 mM. En esta investigación se midió la actividad ALDH2 en un lisado celular que contiene un gran número de proteínas incluyendo otras ALDH. La selectividad de la medición se logró mediante la concentración de sustrato utilizada, en este caso propionaldehído 21 μM , para el cual la enzima ALDH2 tiene una K_m de 0,2 μM (Yanfeng y cols., 2018).

La selección de las células PC12 para medir la actividad ALDH2 no fue al azar, ya que obedeció al origen de estas células, que corresponde a células de feocromocitoma de rata, las que comparten características similares con las células neuronales como lo es la biosíntesis de neurotransmisores catecolaminérgicos (Wiatrak y cols. 2020). Esto también se correlaciona de mejor forma con la naturaleza cerebral de la adicción al alcohol, en la que se ha propuesto que a nivel SNC el acetaldehído (sustrato de la ALDH2) sería capaz de generar efectos placenteros y reforzantes (Rodd y cols., 2005), proponiéndose a este metabolito del alcohol como el responsable de la adicción de esta sustancia (Israel y cols., 2015). Otro punto importante de las células PC12 es su origen murino (rata), lo que permitió una mejor correlación entre los hallazgos in vitro y los resultados obtenidos en el modelo animal de alcoholismo constituido por las ratas de la línea UChB.

En cuanto a la medición in vitro de la actividad ALDH2 en las células PC12 se pudo observar que al usar lisados celulares provenientes de placas de 35 mm se obtuvo una mejor correlación entre la actividad ALDH2 y el volumen de lisado utilizado (Figura 5), mientras que al usar lisados de placas de 100 mm se observaron desviaciones de la linealidad a volúmenes de lisado superiores a 80 μL (Figura 4). Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que las mediciones en las placas de 100 mm se realizaron en un rango de volúmenes de lisado mucho mayores (80 – 320 μL) que a los estudiados en placas de 35 mm (25 – 100 μL). El uso de grandes cantidades de lisado podría incluir el aumento

de interferentes (enzimas, metabolitos, etc.) que podrían afectar el desempeño de la medición de la actividad ALDH2, resultando en las desviaciones al comportamiento lineal observadas a altos niveles de lisado. De esta forma, se encontró que el uso de células PC12 provenientes de cultivos en placas de 35 mm, permitía una medición de la actividad ALDH2 que era sensible en un amplio rango a diferencias en los niveles de enzima, lo que fue útil en los experimentos destinados a comparar la potencia en la activación de la ALDH2 por parte de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno.

Una vez establecido el rango de lineal de actividad ALDH2 vs lisado para las células PC12, el siguiente desafío fue estudiar el efecto de concentraciones crecientes de los fármacos seleccionados en la actividad ALDH2 de esta línea celular. Afortunadamente, Alda-1 ya había sido estudiado en relación al efecto de diferentes concentraciones en la actividad ALDH2 en diversos tipos celulares. Así, Perez-Miller y cols (2010) utilizando la enzima ALDH2 purificada estudiaron el efecto de Alda-1 en un rango de concentraciones entre 0 y 30 μM , observando que la actividad ALDH2 alcanzaba un máximo aumento de la actividad cuando se evaluó 30 μM de Alda-1. En la presente investigación se consideró usar un rango de concentraciones de Alda-1 de 0, 10, 20 y 40 μM , ya que en ensayos preliminares se observó que concentraciones superiores a 40 μM de Alda-1 no resultaban en mayores aumentos de la actividad ALDH2 en células PC12.

A pesar de que tanto en el presente estudio como en el de Perez-Miller y cols. (2010) se observa un aumento de la actividad ALDH2 a medida de que aumenta la concentración de Alda-1, la forma de llevar a cabo los experimentos fue distinta: en el presente trabajo se experimentó con una concentración fija de NAD^+ (0,8 mM) y estudiando la actividad en función de las concentraciones de Alda-1 seleccionadas en un rango de 0-40 μM , mientras que en el citado trabajo (Perez-Miller y cols. 2010) se estudió la actividad ALDH2 en función de concentraciones variables de NAD^+ , usando un rango de concentraciones de 0-30 μM de Alda-1. La mayor actividad ALDH2 en esta investigación se encontró con 40 μM de Alda-1, aumentando aproximadamente 2,5 veces la actividad ALDH2 respecto vehículo; mientras que en el estudio de Perez-Miller y cols. (2010) la máxima actividad registrada se obtuvo con 30 μM de Alda-1, aumentando la actividad

ALDH2 2,8 veces respecto al vehículo. Además, Alda-1 presenta una baja solubilidad en medios acuosos (como el medio de cultivo), lo que limita también el uso de concentraciones más elevadas. En relación a flurbiprofeno, en el estudio realizado por Hosoi y cols. (2014) se usó una concentración de flurbiprofeno de 100 μM , lo que resultó en un aumento de 4,5 veces en la actividad ALDH2 de células HEK293-Rb-Ob. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en esta Memoria, ya que al incubar células PC12 con flurbiprofeno 100 μM se observó un aumento de 4,6 veces en la actividad ALDH2 respecto al control sin tratar. En el estudio de Hosoi y cols., (2014) también se estudiaron otros AINEs como ibuprofeno, aspirina y meloxicam los que no modificaron la actividad ALDH2. De la misma forma, en la presente Memoria la incubación de células PC12 con ibuprofeno 50 y 100 μM tampoco generó cambios en la actividad ALDH2. En relación a la relevancia de las concentraciones de los fármacos usadas en los experimentos *in vitro* respecto de sus niveles efectivos *in vivo*, se puede indicar que para Alda-1 al ser un compuesto experimental, no hay datos de cuáles son sus concentraciones plasmáticas efectivas. Sin embargo, Taneja y cols. (2015) estudiaron las concentraciones plasmáticas luego de una administración oral de 40 mg/kg en ratas, observando una C_{max} de 69.88 ng/mL ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) a una T_{max} de 0,63 horas. Estas concentraciones plasmáticas son mucho menores al rango de concentraciones estudiadas en esta Memoria *in vitro*, sin embargo, es difícil establecer correlaciones ya que en el estudio de Taneja y cols., (2015) no estudiaron si la administración de Alda-1 aumentaba la actividad ALDH2. Estos mismos autores indicaron que la biodisponibilidad oral de Alda-1 era de aproximadamente 4%.

Respecto al flurbiprofeno, este es un fármaco aprobado por el ISP y la FDA para uso en humanos. Entre los parámetros farmacocinéticos más relevantes se pueden mencionar su elevada unión a proteínas plasmáticas de 99% y un T_{max} de 2 horas después de su administración oral. Un estudio en humanos realizado por Yilmaz y cols. (2014) se encontró que luego de una dosis oral de 100 mg de flurbiprofeno, se logró una C_{max} 35 $\mu\text{g/mL}$ equivalente a 143 μM . Estos resultados se correlacionan y le entregan una significancia clínica a los resultados obtenidos en esta Memoria al usar una concentración de 100 μM , la que resultó en un marcado aumento de la actividad ALDH2.

Una vez determinado el efecto de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 en células PC12 se procedió a evaluar si la mayor actividad se debía a un aumento en los niveles proteicos de ALDH2. El análisis de Western blot (Figura 8), mostró que ninguno de los fármacos estudiados alteraba los niveles proteicos de ALDH2 a ninguna de las concentraciones estudiadas. Esto se correlaciona con los hallazgos de Hosoi y cols (2014) que encontraron que flurbiprofeno e ibuprofeno a una concentración de 100 μ M no modificaban los niveles proteicos de ALDH2 en células HEK293-Rb-Ob. Considerando estos resultados, se puede concluir que la activación de la ALDH2 por parte de estos fármacos está determinada por un mecanismo farmacológico de unión a la enzima y no por una inducción enzimática de la ALDH2. Un objetivo que no se alcanzó a realizar fue la determinación del efecto de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en los niveles de expresión de la ALDH2 mediante estudios de RT-qPCR. A través de estos ensayos se pretendía determinar el efecto de los fármacos en los niveles de mRNA de la enzima ALDH2, es decir su expresión génica. Sin embargo, los resultados de Western blot no mostraron cambios en los niveles de proteína de la ALDH2 en los distintos tratamientos aplicados a las células PC12, lo que sugeriría que la expresión génica tampoco debería haber cambiado significativamente por acción de los fármacos Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno. Sin embargo, es necesario resaltar que se hizo Western Blot sólo una vez, lo que puede no dar una idea completa de lo que ocurre con los niveles proteicos de ALDH2 cuando células PC12 son expuestas a distintas concentraciones de Alda-1, flurbiprofeno o ibuprofeno.

Hasta el punto anteriormente explicado surgió la pregunta de si flurbiprofeno activaba la ALDH2 por un mecanismo similar a Alda-1. Para responder esta pregunta, se realizó un experimento en el que se evaluó el efecto de combinar distintas concentraciones conjuntas de Alda-1 y flurbiprofeno en la activación de la ALDH2. Los resultados muestran que al combinar flurbiprofeno y Alda-1 no se observa una suma en los efectos activadores, sino más bien una potenciación entre ellos (Figura 10). Esto último da indicios de que el mecanismo de acción de Alda-1 y flurbiprofeno no sería el mismo, ya que si este fuera el caso no se vería potenciación del efecto en la actividad ALDH2, sino que se observaría una adición de los efectos en la actividad ALDH2. En este sentido se observa que las

estructuras moleculares de Alda-1 y flurbiprofeno comparten algunas similitudes estructurales, como lo es la presencia de un anillo aromático con sustituciones halogenadas (Ver Figura 19). Un estudio de estructura-actividad para compuestos de la familia de Alda-1 realizado por Cheng y cols. (2020) concluyó que la capacidad de activar la ALDH2 se correlacionaba con la presencia de un anillo aromático unido a otro anillo aromático con sustituciones halogenadas (cloro o bromo en posición 2 o 6), unidos ambos mediante una estructura de enlace dadora de puentes de hidrógeno (Figura 19A). En ese sentido flurbiprofeno cumple con poseer ambas estructuras aromáticas y en una de ellas la presencia de una sustitución flúor (Figura 19B).

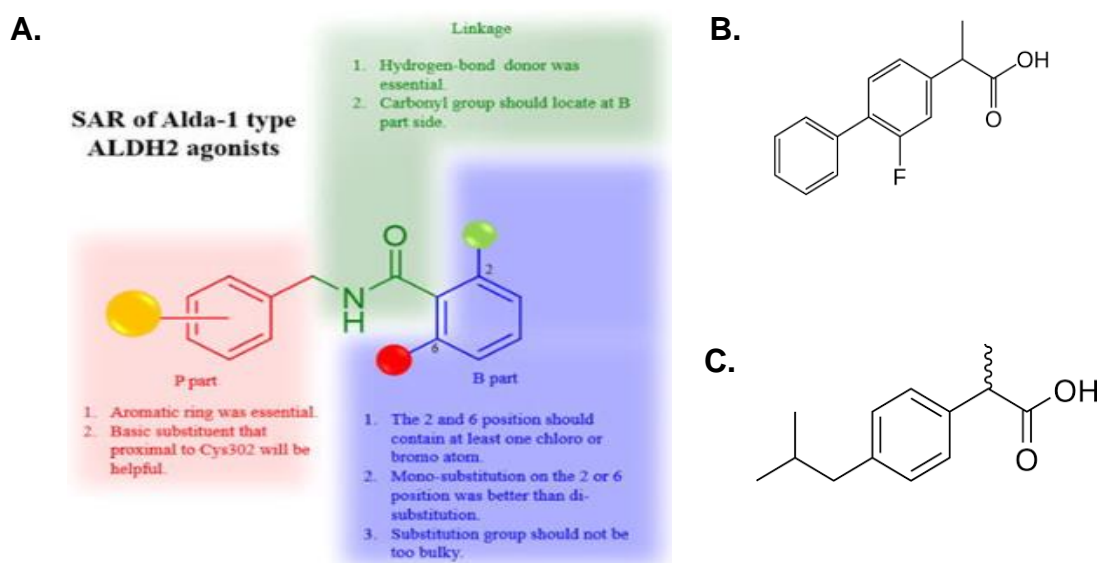


Figura 19. Relación estructura actividad de compuestos tipo Alda-1 como activadores de la ALDH2. (A) En color rojo, se muestra los requerimientos estructurales para el anillo aromático lateral (“p part”); en verde, los requerimientos estructurales para el centro de la molécula (“linkage”) y en azul, los requerimientos estructurales para la zona aromática halogenada (“b part”). Extraída de Cheng y cols., (2020). Se muestran también las estructuras químicas de (B) flurbiprofeno e (C) ibuprofeno.

Debido a que la medición de actividad ALDH2 en células PC12 en presencia de ibuprofeno no presentó cambios, una explicación a esta falta de efecto activador se podría encontrar en el análisis estructura-actividad anterior. En ese sentido, ibuprofeno no cuenta con un anillo aromático halogenado y tampoco de la segunda estructura aromática vecina. Es claro que la estructura de los

compuestos tipo Alda-1 presenta similitudes y también diferencias importantes a la del flurbiprofeno. En ese sentido, es plausible plantear la hipótesis de que flurbiprofeno podría estar activando la ALDH2 por un mecanismo diferente al de Alda-1, lo que también se vería apoyado por la potenciación en el efecto que se observó cuando se usaron ambos fármacos en conjunto (Figura 10). Nuevas herramientas de análisis de interacción entre fármacos y proteínas, como lo son las técnicas de Docking y Dinámica Molecular que simulan la interacción entre los grupos funcionales de los fármacos y el sitio activo de una enzima (como en este caso) podrían ser útiles para encontrar nuevas explicaciones a los efectos observados con estos compuestos.

El hecho de que flurbiprofeno logre activar la ALDH2 al igual que Alda-1 es un hallazgo muy interesante, fundamentalmente porque Alda-1 ya había sido estudiado en modelos animales por Rivera-Meza y cols. (2019), demostrando que este fármaco era capaz de inhibir la adquisición del consumo de alcohol y reducir el consumo de alcohol en animales expuestos a consumo crónico. Los autores de estos experimentos proponen que el aumento de la actividad de la ALDH2 por Alda-1 reduciría el consumo de alcohol a través de una mayor eliminación del acetaldehído a nivel cerebral y también a una mejor detoxificación de otros aldehídos asociados a neuroinflamación y estrés oxidativo como el 4-HNE y MDA (Rivera-Meza y cols., 2019). Es por ello que en este trabajo se exploró el efecto de flurbiprofeno en el consumo de alcohol en el modelo de ratas bebedoras UChB. Lo primero que se estudió fue la dosis necesaria de ibuprofeno para observar un efecto en el consumo de alcohol por los animales. Para ello se estudiaron distintas dosis de flurbiprofeno (2,5; 5 y 10 mg/kg/día) en la adquisición del consumo de etanol en ratas UChB, encontrándose un efecto similar para las 3 dosis estudiadas de 70% de reducción en el consumo de alcohol (Figura 11). En base a estos resultados, se pudo concluir que flurbiprofeno, al igual que Alda-1 es capaz de reducir la adquisición del hábito de consumo de alcohol en animales y que este efecto es reversible una vez finalizada la administración del compuesto. El consumo total de líquidos no sufrió modificaciones por la administración de flurbiprofeno, lo que indicó que el compuesto no alteró el balance hídrico de los animales, sino más bien cambió su preferencia por las soluciones ofrecidas, disminuyendo el consumo de alcohol y aumentando su consumo de agua.

También se decidió continuar usando una dosis intermedia (5 mg/kg/día) de flurbiprofeno en los siguientes experimentos.

Al resultar exitoso el tratamiento de flurbiprofeno en la adquisición del consumo de alcohol, se procedió con el siguiente paso: evaluar si era capaz de reducir o inhibir el consumo de alcohol en los mismos animales (ratas UChB) expuestos a un consumo crónico de alcohol de 30 días en los que los animales presentaban un consumo de aproximadamente 9 g/kg/día. Se usaron otros 2 fármacos adicionales, Alda-1 e ibuprofeno. El primero, para comparar la potencia de flurbiprofeno en la disminución del consumo de alcohol, mientras que ibuprofeno se incluyó para investigar un posible efecto familia estructural (AINE). La dosis estudiada para flurbiprofeno fue de 5 mg/kg, ya que fue la más potente en el estudio anterior, la que para efectos de comparabilidad se usó también en los otros fármacos (Alda-1 e ibuprofeno). Los resultados (Figura 14) muestran que Alda-1 y flurbiprofeno inhiben el consumo de alcohol y tienen prácticamente la misma potencia, mientras que ibuprofeno presenta un efecto modesto en la disminución del consumo de alcohol. Esto último es sorprendente considerando los resultados de actividad ALDH2 en células PC12 de ibuprofeno, ya que no generó un aumento de la actividad ALDH2 y, por ende, no debería disminuir el consumo de alcohol. Si bien ibuprofeno no parece tener efecto sobre la actividad ALDH2, sí es capaz de inhibir la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX2) y con ello bloquear la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Ngo y cols., 2021), por lo que sería necesario investigar si existe una relación entre los derivados prostanoides y la adicción al alcohol. En este sentido, estudios recientes realizados en ratas UChB han mostrado que la administración de aspirina, un inhibidor no selectivo de la COX-1 y COX2, redujo el consumo voluntario de alcohol en un rango de 30-50% (Quintanilla y cols., 2020; Israel y cols., 2021). Esto último también deja como pregunta si Alda-1 sería capaz de inhibir a las ciclooxigenasas, sin embargo, aún no hay estudios al respecto.

También es destacable señalar la potencia similar observada en la inhibición del consumo de alcohol (70% de reducción) entre Alda-1 y flurbiprofeno cuando se administraron en una dosis de 5 mg/kg, la que es 5 veces menor a la dosis de Alda-1 reportada en Rivera-Meza y cols., (2019), lo que da entender que este

fármaco podría tener efectos similares en el consumo de alcohol aún en dosis más bajas.

Es necesario explicar la relación entre la activación ALDH2 y la inhibición del consumo de alcohol. Para ello es necesario recordar que uno de los metabolitos derivados del etanol es el acetaldehído, el cual ha sido señalado como un compuesto capaz de reforzar comportamientos que inducen placer (Rodd y cols., 2005) y, por ende, se cree que el acetaldehído sería el principal mediador en el proceso de adicción al etanol (Israel y cols., 2015). Es necesario mencionar también que el acetaldehído es capaz de condensar espontáneamente con la dopamina para formar un compuesto llamado salsolinol, el que muestra efectos reforzantes aún más potente que el etanol e, incluso, más que el mismo acetaldehído (Berríos y cols. 2013). Los hallazgos de esta Memoria en conjunto con lo planteado por Rivera-Meza y cols. (2019) sugerirían que la activación de ALDH2 por parte de fármacos como Alda-1 y flurbiprofeno a nivel central llevaría en un aumento en la tasa eliminación del acetaldehído (o salsolinol), lo que inhibiría los efectos reforzantes de estos metabolitos del etanol. Es decir, la eliminación del acetaldehído a nivel central es lo que explica la inhibición del consumo de alcohol en el modelo animal estudiado (ratas UChB). Sería interesante plantear estudios de preferencia de lugar inducido por etanol usando Alda-1 o flurbiprofeno, con el fin de establecer si la administración de estos fármacos disminuye los efectos hedonistas-placenteros asociados al consumo de alcohol, los que explicarían la reducción del consumo de etanol por parte de los animales en los experimentos de libre elección de dos botellas.

La última etapa de esta investigación fue estudiar los efectos de Alda-1, flurbiprofeno e ibuprofeno en la actividad ALDH2 a nivel de tejido hepático y cerebral de ratas UChB. La reducción del consumo de alcohol observada en los animales se correlaciona con el aumento de la actividad enzimática de la ALDH2. Respecto al tejido cerebral, los activadores Alda-1 y flurbiprofeno registraron un aumento aproximado de 4 veces la actividad, mientras que ibuprofeno aumentó solamente 1.6 veces la actividad ALDH2, el cual es un aumento significativo respecto al grupo tratado con vehículo. Estos hallazgos establecen que flurbiprofeno es capaz de aumentar la actividad ALDH2 en una potencia similar a

la de Alda-1 a nivel central y corroboran lo visto por Rivera-Meza y cols. (2019), quienes también describieron un aumento en la actividad ALDH2 central luego de administrar Alda-1. Estos antecedentes amplían la evidencia de la hipótesis que plantea a la activación de la ALDH2 cerebral como un blanco farmacológico para reducir tanto la adquisición como el consumo crónico de alcohol.

8. CONCLUSIONES

- Alda-1 y flurbiprofeno son capaces de aumentar la actividad ALDH2 en células PC12 con una potencia similar (3 veces a 40 μ M). A una concentración de 100 μ M flurbiprofeno aumento en casi 5 veces la actividad en células PC12. Ibuprofeno no aumentó la actividad ALDH2 en células PC12.
- El mecanismo de acción de Alda-1 y flurbiprofeno en el aumento de la actividad ALDH2 se relaciona con la activación directa de la enzima, ya que no se observaron cambios en los niveles proteicos de ALDH2 en células PC12.
- La incubación conjunta de distintas concentraciones de Alda-1 y flurbiprofeno en células PC12 mostró un efecto potenciador entre ambos fármacos en la activación de la ALDH2, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente para ambos fármacos.
- La administración por vía oral de flurbiprofeno mostró ser eficaz en reducir de forma dosis dependiente y de forma reversible la adquisición del hábito de consumo de alcohol en ratas UChB.
- La administración oral de Alda-1 y flurbiprofeno mostró ser efectiva y de potencia similar en reducir el consumo crónico de alcohol en ratas UChB. La administración oral de ibuprofeno mostró un nivel menor de eficacia en reducir el consumo crónico de alcohol en los animales.
- El aumento de la actividad ALDH2 a nivel cerebral por acción de los tratamientos farmacológicos se correlacionó de una forma inversamente proporcional al nivel de consumo de alcohol en ratas UChB.
- Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo sugieren que la activación farmacológica de la ALDH2 a nivel central representa un potencial blanco farmacológico para el tratamiento del alcoholismo

9. REFERENCIAS

Araya M. (2017) Transmisión opiácea y alcoholismo: silenciamiento de la expresión del gen del receptor mu opioide mediante RNA de transferencia. Memoria de título Química y Farmacia. Universidad de Chile.

Berríos Cárcamo, P. (2013). Salsolinol e isosalsolinol: productos de la condensación de dopamina y acetaldehído como efectores finales del efecto reforzante del etanol. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/113542>.

Cederbaum A. I. (2012). Alcohol metabolism. Clinics in liver disease, 16(4), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>

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 (New York, N.Y.), 321(5895), 1493–1495. <https://doi.org/10.1126/science.1158554>

Cheng, M. C., Lo, W. C., Chang, Y. W., Lee, S. S., & Chang, C. C. (2020). Design, synthesis and the structure-activity relationship of agonists targeting on the ALDH2 catalytic tunnel. Bioorganic chemistry, 104, 104166. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104166>

Colomer Carretero Marian (2008). Náuseas inducidas por quimioterapia emetógena Prevención y tratamiento. Elsevier, Offarm. [en línea] <[https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-nauseas-inducidas-por-quimioterapia-emetogena--13114935#:~:text=La%20zona%20gatillo%20quimiorreceptora%20\(ZGQ,proem%C3%A9ticas%20de%20la%20circulaci%C3%B3n%20sist%C3%A9mica.>](https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-nauseas-inducidas-por-quimioterapia-emetogena--13114935#:~:text=La%20zona%20gatillo%20quimiorreceptora%20(ZGQ,proem%C3%A9ticas%20de%20la%20circulaci%C3%B3n%20sist%C3%A9mica.>)

Clapp P (2012) Current Progress in Pharmacologic Treatment Strategies for Alcohol Dependence. [en línea] <https://www.medscape.com/viewarticle/770465_1> [consulta: 27 de octubre]

Deehan, G. A., Jr, Engleman, E. A., Ding, Z. M., McBride, W. J., & Rodd, Z. A. (2013). Microinjections of acetaldehyde or salsolinol into the posterior ventral

tegmental area increase dopamine release in the nucleus accumbens shell. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 37(5), 722–729. <https://doi.org/10.1111/acer.12034>

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

Garbutt J. C. (2010). Efficacy and tolerability of naltrexone in the management of alcohol dependence. *Current pharmaceutical design*, 16(19), 2091–2097. <https://doi.org/10.2174/138161210791516459>.

Hosoi T, Yamaguchi R, Noji K, Matsuo S, Baba S, Toyoda K, Suezawa T, Kayano T, Tanaka S, Ozawa K (2014) Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress. *EMBO Mol Med* 6:335-46.

Hurley TD, Edenberg HJ, Li TK. Pharmacogenomics of Alcoholism. In: Licinio J, Wong M, editors. *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies*. 2002. pp. 417–441. [[Google Scholar](#)]

Israel, Y., Quintanilla, M. E., Karahanian, E., Rivera-Meza, M., & Herrera-Marschitz, M. (2015). The "first hit" toward alcohol reinforcement: role of ethanol metabolites. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 39(5), 776–786. <https://doi.org/10.1111/acer.12709>

Israel, Y., Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Morales, P., Santapau, D., Berríos-Cárcamo, P., Ezquer, M., Olivares, B., & Herrera-Marschitz, M. (2021). Aspirin and N-acetylcysteine co-administration markedly inhibit chronic ethanol intake and block relapse binge drinking: Role of neuroinflammation-oxidative stress self-perpetuation. *Addiction biology*, 26(1), e12853. <https://doi.org/10.1111/adb.12853>

Karahanian E, Quintanilla ME, Tampier L, Rivera-Meza M, Bustamante D, Gonzalez-Lira V, Morales P, Herrera-Marschitz M, Israel Y. Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcohol*

Clin Exp Res. 2011 Apr;35(4):606-12. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01439.x. Epub 2011 Feb 17. PMID: 21332529; PMCID: PMC3142559.

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 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addiction biology*, 20(2), 336–344. <https://doi.org/10.1111/adb.12130>

Klyosov, A. A., Rashkovetsky, L. G., Tahir, M. K., & Keung, W. M. (1996). Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*, 35(14), 4445–4456. <https://doi.org/10.1021/bi9521093>

Maldonado A. (2020) Transmisión glicinérgica y alcoholismo: Desarrollo de un vector adenoasociado codificante de una versión mutada (KK385/386AA) de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina. Memoria de Título de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile.

NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism). Alcohol Use Disorder. <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/alcohol-use-disorders> [consulta: 19 de septiembre 2020].

Ngo VTH, Bajaj T. Ibuprofen. [Actualizado 2021 Oct 3]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publicado; 2022 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542299/>

OMS (Organización Mundial de la Salud). El consumo nocivo de alcohol mata a más de 3 millones de personas al año, en su mayoría hombres. [en línea] <https://www.who.int/es/news/item/21-09-2018-harmful-use-of-alcohol-kills-more-than-3-million-people-each-year--most-of-them-men>. [consulta: 21 de septiembre del 2020].

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.
<https://doi.org/10.1007/s00213-015-4049-0>

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD (2010) Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural Molecular Biology* 17:159–164. DOI: 10.1038/nsmb.1737

Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Morales, P., Ezquer, M., Olivares, B., Santapau, D., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2020). N-Acetylcysteine and Acetylsalicylic Acid Inhibit Alcohol Consumption by Different Mechanisms: Combined Protection. *Frontiers in behavioral Neuroscience* 14:122.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00122>

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

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

Sanchez-Catalan M, Kaufling J, Georges F, Veinante P y Barrot M (2014) The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 282:198-216.

Solito R, Corti F, Chen CH, Mochly-Rosen D, Giachetti A, Ziche M, Donnini S (2013) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 activation prevents β -amyloid-induced endothelial cell dysfunction and restores angiogenesis. *J Cell Sci* 126:1952-61.

Taneja, I., Raju, K. S. R., Mittal, M., Dev, K., Khan, M. F., Maurya, R., & Wahajuddin, M. (2015). Bioavailability, plasma protein binding and metabolic stability studies of a ALDH2 activator, alda-1, using a validated LC-ESI-MS/MS method in rat plasma. *RSC Advances*, 5(67), 54395-54402.

Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E (2020) PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* 9:958. DOI: 10.3390/cells9040958

Witkiewitz, K., Saville, K., & Hamreus, K. (2012). Acamprosate for treatment of alcohol dependence: mechanisms, efficacy, and clinical utility. *Therapeutics and clinical risk management*, 8, 45–53. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S23184>

Winslow BT, Onysko M, Hebert M. Medications for Alcohol Use Disorder. *Am Fam Physician*. 2016 15;93(6):457-65. PMID: 26977830.

Yanfeng Wang, Weiyang He (2018), Chapter 21 - Endogenous Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase-2 as an Antioxidant in Liver, *The Liver*, Academic Press, Pages 247-259. DOI: 10.1016/B978-0-12-803951-9.00021-5.

Yilmaz, B., Sahin, H., Akba, V., & Erdem, A. F. (2014). Determination of Flurbiprofen in Human Plasma by Gas Chromatography with Mass Spectrometry and Its Pharmacokinetics. *Journal of AOAC International*, 97(4), 1061–1066. doi:10.5740/jaoacint.12-041

Zhang, S., Chen, C., Ying, J., Wei, C., Wang, L., Yang, Z., & Qi, F. (2020). Alda-1, an Aldehyde Dehydrogenase 2 Agonist, Improves Cutaneous Wound Healing by Activating Epidermal Keratinocytes via Akt/GSK-3 β / β -Catenin Pathway. *Aesthetic Plastic Surgery*. DOI:10.1007/s00266-020-01614-4

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. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00181.x>