

MODULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA ENZIMA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA 2 POR PLOMO Y ETANOL: EFECTOS NEUROTÓXICOS Y NEUROCOMPORTAMENTALES

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Bioq. Romina Deza Ponzio

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Farmacología

IFEC CONICET

Córdoba, Argentina

2021





DIRECTOR DE TESIS

Dra. Miriam B. VIRGOLINI

COMISION EVALUADORA DE TESIS

Dra. Liliana M. CANCELA

Dr. Germán A. GIL

Dra. Graciela PANZETTA

EVALUADOR EXTERNO

Dra. H. Alicia Brusco



El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC) perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas. Durante la ejecución de este trabajo, la autora fue beneficiada con una Beca Interna Doctoral de CONICET durante el periodo 2015-2020, cumplimentó con los cursos requeridos y se desempeñó como profesor asistente (dedicación simple) en el Departamento de Farmacología hasta la fecha. Para su realización contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET, la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (FONCyT).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar por agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas y sus autoridades. Al Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba -IFEC por brindar el espacio para la realización de este trabajo de tesis.

A CONICET, por brindar el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Miriam Virgolini, mi directora de tesis, por su compromiso y dedicación a la ciencia. Por abrirme las puertas de un laboratorio de investigación, por confiar desde el principio y darme la oportunidad de realizar el doctorado. Por luchar codo a codo en cada circunstancia difícil. Por compartir los logros y los momentos felices y por ayudarme a superar las etapas que fueron desmotivantes. Gracias Miri por tu paciencia y ayuda.

A mi comisión evaluadora de tesis: Dra. Alicia Brusco, por dedicar el tiempo de leer esta tesis como evaluadora externa.

Dra. Liliana Cancela, Dra. Graciela Panzetta y Dr. Germán Gil. Gracias por participar activamente durante cada reunión de avance, por interesarse y discutir desde su experiencia. Por cada aporte valioso y la ayuda ofrecida, por su compromiso a lo largo de todas las etapas. Sin dudas, su aporte contribuyó en gran manera a mi formación científica.

Al Dr. Fernando Irazoqui. Pocas personas abren de esa manera las puertas de su laboratorio y dan tanta libertad de trabajar y aprender, gracias Chari por tu disposición y tu aporte fundamental a este trabajo de tesis y a mi formación. Por supuesto, gracias miles a Romi Cejas y Yoha Garay. ¡Desde abrirme la puerta cuando no tenía llave de acceso hasta discutir conmigo resultados... gracias por enseñarme sobre microscopía, cultivo y Western blot!. Hago extensivo el agradecimiento a todo el CIQUIBIC-Departamento de Química Biológica de la FCQ, UNC, por permitir la colaboración interdepartamental e institucional.

Gracias a todo el Depto de Farmacología-IFEC. Desde los jefes, los técnicos y hasta las nuevas generaciones, gracias porque en mayor o menor medida fueron parte de este proceso. Gracias por crear un hermoso ambiente de trabajo y de desarrollo profesional.

A las Virgolini's Team: Mara, por enseñarme desde el principio; Pauli Albrecht, fuimos atravesando las mismas etapas, gracias por las catarsis y el apoyo. A Lu y Vero, por continuar la tarea y ser grandes compañeras.

A mis amadas *mitocondrias*, Maca y Vicky. Qué decirles que no sepan? Se los resumo así nomás: las adoro. Gracias por ser aguante constante y por su amistad que llena el corazón.

A "*las Bolitas*". Sin dudas, de lo mejor que me deja el doctorado. Mac, Vic, Pablito, Ceci, Martin, Emi, Nati, Leo y Ota. Con ustedes se disfruta hasta el trabajo más duro y cansador. Con mates, charlas, costillares y picadas la vida es más bonita.

Gracias Gaby Schachner por tu aporte a los experimentos de cultivo. Por responder a cada duda y dar una mano enorme! Gracias Susana Deza, mi tía adorada. Quién diría que íbamos a trabajar juntas?? Creo que no dimensionas cuánto me has ayudado, desde niña hasta ahora. Un eterno gracias.

A la Dra. Alexandra Latini. Por haberme recibido en su laboratorio y facilitado las herramientas para realizar los estudios de funcionalidad mitocondrial. Por su valioso aporte en la discusión de resultados y conocimiento científico. Gracias Joana, Tuany, Jenny, Rodrigo y Ana por el trabajo compartido. A Rita, "*o ariana do dia 7*", gracias por enseñarme a ser bien *mané*, por las hermosas charlas que siempre quedarán en mi memoria y mi corazón.

Al Dr. Mario Rivera-Meza, por haber trabajado incansablemente hasta conseguir el objetivo que habíamos propuesto durante mi estadía en su laboratorio. Por su compromiso y dedicación al desarrollo científico y su gran aporte a este trabajo brindando generosamente el reactivo Alda-1. Gracias a Catalina y Camila, *hogars* y apoyo chileno dónde quiera que estemos.

A *my teacher*, MeryJo y todos mis compañeros del *Shupaiteer English Team*. Gracias por el disfrute en cada clase, por las catarsis y por hacer de la gramática algo divertido y que dan ganas de aprender. *Not in this life time!*

A mis hermanos, Clementina y Julián. Gracias por bancarme desde que era niña y hablaba de "ser científica", hasta la facultad y todo lo que iba aprendiendo y quería contar. Por entender cuando no podía estar presente, por acompañarme siempre en cada paso, por estar ahí desde siempre y hasta siempre, por ser mis *adultos responsables*. SOMOS TRES. Un enorme gracias a mis cuñados/hermanos Marina y Elder (pariente) y a mis chiquitos hermosos de la tía: Camila, Santiago, Sofía, Victoria e Isabel, por alegrar mis días y enseñarme a ver las cosas importantes de la vida. Los amo incondicionalmente!



Gracias a “mi familia Deza” y “mi familia Ponzio”, que a pesar de las distancias siempre están presentes. Gracias a mis *tronchis* de Cabrera, a mi amiga Caro y su familia, a mis amigas de la facultad. Gracias por ser parte de mi vida en cada etapa.

Gracias a mis suegros, Marcelo y Estela; a mi cuñada Camila y mi *con-cu* Andrés, por su apoyo y oraciones constantes. A mi gran familia de la Iglesia de la Recta Martinoli, gracias por cada palabra de aliento y por las oraciones. A los Ados, gracias por su amor y sus ocurrencias!

A Santiago, mi compañero de camino, mi amor para siempre. Gracias por ser todo lo que me hace bien. Gracias por entenderme, por acompañarme siempre y amarme como soy. Gracias por decir que *sí* y aventurarte a compartir tu vida conmigo.

Gracias a Dios, que con amor eterno me amó, con su Palabra guía mi camino y con sus promesas me sostiene.



A MIS PADRES
Graciela y Horacio

Que se fueron temprano, pero permanecen para siempre.



ÍNDICE TEMÁTICO

Índice de abreviaturas	14
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	19
Plomo como contaminante ambiental. Aspectos generales	19
Plomo: Mecanismo de toxicidad. Toxicocinética y toxicodinamia.....	22
Plomo como neurotóxico del desarrollo.....	23
Interacción entre plomo y etanol.....	25
Etanol	27
Familia de enzimas aldehído-deshidrogenasas: Aspectos generales.....	32
ALDH2: Una “superenzima”	39
Plomo, etanol y ALDH2.....	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	45
Objetivo General	45
Objetivos específicos.....	45
Capítulo 1	46
Expresión de ALDH2 en cerebro y el consumo voluntario de EtOH en respuesta a cianamida en un modelo de ratas Wistar expuestas perinatalmente a Pb	47
Consumo de etanol	47
Rol dual de ACD como primer metabolito del EtOH	50
Cianamida.....	54
Materiales y métodos	57
Esquema de Exposición perinatal a bajas dosis de Plomo	57
Consumo voluntario de etanol.....	59
Administración intracerebroventricular (i.c.v.) de cianamida	61
Cirugía estereotáxica.....	61
Obtención de muestras para inmunohistoquímica: perfusión transcardíaca.	62
Inmunohistoquímica para ALDH2	63
Cuantificación de células positivas para ALDH2.....	64
Análisis estadístico:	65
Resultados	67
Efecto de la inhibición ALDH2 en el consumo voluntario de EtOH de ratas expuestas o no perinatalmente a Pb.....	67

Inmunohistoquímica para ALDH2	68
Efecto de la administración de CIAN en la expresión de ALDH2.....	70
Discusión y conclusiones parciales.....	74
Consumo de etanol	74
Expresión de ALDH2 en áreas cerebrales del circuito de recompensa.....	76
Capítulo 2	78
Interacción Pb-EtOH en la línea celular SH-SY5Y: determinación de la actividad y expresión proteica de ALDH2 <i>in vitro</i>.....	79
Interacción entre plomo y etanol en modelos <i>in vitro</i>	79
Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Características principales.	80
Materiales y métodos	82
Condiciones de cultivo y mantenimiento de células SH-SY5Y	82
Exposición a Pb y etanol.....	82
Curva dosis respuesta para Pb y Etanol	83
Ensayo de viabilidad celular: MTT.....	84
Determinación de la concentración de Lactato	85
Determinación de la actividad enzimática de ALDH2	85
Inmunofluorescencia.....	86
Western blot	87
Determinación de la concentración proteica.....	88
Resultados	89
Curvas dosis respuesta de actividad enzimática de ALDH2	89
Determinación de la concentración de L-lactato.	95
Suplementación con NAD ⁺	96
Efectos del tratamiento con NAD ⁺ sobre la actividad de ALDH2	98
Expresión de ALDH2 mediante Inmunofluorescencia.....	99
Expresión de ALDH2 mediante western blot	100
Discusión y conclusiones parciales.....	102
Capítulo 3	106
Funcionalidad mitocondrial en células SH-SY5Y respuesta a Pb y etanol	107
Mitocondria: Organización y funciones	107
Cadena de Transferencia Electrónica.....	109
Teoría quimiosmótica y fuerza protomotriz	111

Toxicidad de plomo en la mitocondria.....	114
Toxicidad de etanol en la mitocondria.....	115
Materiales y métodos	118
Estimación de la masa mitocondrial	118
Determinación de la respiración celular y mitocondrial	118
Determinación del consumo de oxígeno mediante oximetría.....	121
Determinación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	122
Resultados	123
Estimación de la masa mitocondrial	123
Evaluación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	124
Consumo de oxígeno mitocondrial	126
Discusión y conclusiones parciales.....	132
Capítulo 4	135
Evaluación del estado redox de células SH-SY5Y expuestas a Pb y etanol.....	136
Balance oxidativo celular	136
Señalización mediante EROs	140
Peroxidación lipídica	141
Pb, Etanol y estrés oxidativo	142
ALDH2 y estrés oxidativo.....	146
Materiales y métodos	148
Determinación de los niveles de EROs.....	148
Determinación de la actividad enzimática de catalasa	149
Determinación de la expresión de catalasa	150
Determinación de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	150
Resultados	151
Cuantificación de EROs.....	151
Estimación del daño por peroxidación lipídica	152
Actividad enzimática de catalasa	153
Expresión de catalasa.....	154
Discusión y conclusiones parciales.....	156
Capítulo 5	158
Efecto de la administración de Alda-1 en células SH-SY5Y expuestas a Pb y etanol	159
Activadores de ALDHs (Aldas)	159

Materiales y métodos	164
Obtención de Alda-1	164
Tratamiento con Alda-1	164
Resultados	165
Efectos del tratamiento con Alda-1 sobre la actividad y expresión de ALDH2.....	165
Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre la masa mitocondrial	169
Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	171
Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre los niveles de EROs	172
Discusión y conclusiones parciales.....	174
CONCLUSIONES FINALES	176
BIBLIOGRAFÍA.....	182
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	199

Índice de abreviaturas

4-HNE: 4-hidroxi 2- nonenal	GPx: glutatión peroxidasa, enzima
ACD: acetaldehído	GR: Glutatión reductasa, enzima
ADH: alcohol deshidrogenasa, enzima	GSH: glutatión
ADP: Adenosin difosfato	H ⁺ : protón
ALDH2: aldehído deshidrogenasa 2, enzima	H ₂ O ₂ : peróxido de hidrógeno
ATP: Adenosin trifosfato	MDA: malondialdehído
ATV: Área tegmental ventral	MEM: matriz mitocondrial externa
BHE: barrera hematoencefálica	MIM: matriz mitocondrial interna
Ca ²⁺ : ión calcio	MM: matriz mitocondrial
CAT: catalasa, enzima	Na ⁺ : catión sodio
CIAN: cianamida	NAC: núcleo accumbens
CDC: Centros de control de enfermedades de Estados Unidos	NAD ⁺ : nicotin adenin dinucleótido oxidado
CPF: corteza pre-frontal	NADH: nicotin adenin dinucleótido
Cu ²⁺ : ión cúprico	NADP: nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidado
CYP2E1: enzimas del sistema microsomal citocromo P450	NADPH: nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
DA: Dopamina	OH ⁻ : hidroxilo
DCF: diclorofluoresceína	Pb: plomo
DCFDA-H ₂ : diclorofluoresceína diacetato	Reducido
DIS: disulfiram	SNC: Sistema nervioso central
DOPAL: 2,3-dihidroxifenilaldehído	SOD: superóxido dismutasa, enzima
DOPAC: ácido	XO: xantina oxidasa, enzima
EIM: espacio intermembrana	ΔΨ: potencial de membrana mitocondrial
EROs: especies reactivas de oxígeno	δ-ALA: ácido delta-aminolevulínico
EtOH: etanol	δ-ALAd: delta-ala dehidratasa, enzima
Fe ²⁺ : ión ferroso	

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se evaluó la interacción entre plomo (Pb), un contaminante ambiental conocido por su neurotoxicidad principalmente durante el desarrollo, y etanol (alcohol, EtOH), una droga de abuso ampliamente consumida a nivel mundial.

En el marco de la hipótesis en la cual el metabolismo oxidativo de EtOH se verá alterado frente a la exposición a ambos neurotóxicos, propusimos evaluar el rol de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2), oxidorreductasa de localización mitocondrial, en los mecanismos de toxicidad de Pb y EtOH en dos modelos experimentales diferentes, utilizando ratas Wistar y cultivo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

En el primer capítulo de este trabajo pudimos reproducir el modelo experimental en ratas Wistar antes reportado por nuestro laboratorio, en donde ratas expuestas perinatalmente a 220ppm de Pb evidencian un consumo voluntario de EtOH mayor que sus contrapartes controles. A su vez, utilizando cianamida, un inhibidor farmacológico de ALDH2, pudimos poner de manifiesto el rol del acetaldehído (ACD), el primer metabolito del EtOH y principal sustrato de ALDH2. Al acumularse en sistema nervioso central (SNC) por efecto de la inyección *in situ* de cianamida, ACD ejerce propiedades reforzantes y los animales (tanto controles como Pb) manifestaron un aumento del consumo voluntario de la droga, evidenciando el rol clave de ALDH2 en los efectos neurocomportamentales de la interacción entre Pb y EtOH. A este respecto, en áreas cerebrales involucradas en el circuito de recompensa se demostró que la expresión proteica de ALDH2 se encuentra disminuida en Corteza pre-frontal, Núcleo Accumbens y Estriado dorsal de animales expuestos perinatalmente a Pb; efecto que se evidenció potenciado por la administración de cianamida.

Para la investigación de mecanismos moleculares de esta interacción, empleamos un modelo *in vitro*, de exposición de células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y a 10 μ M de Pb, 200mM de EtOH o su combinación. Dichas dosis de exposición fueron determinadas mediante ensayos de dosis-respuesta. En primera instancia, evaluamos la actividad enzimática de ALDH2, evidenciando una potenciación del efecto

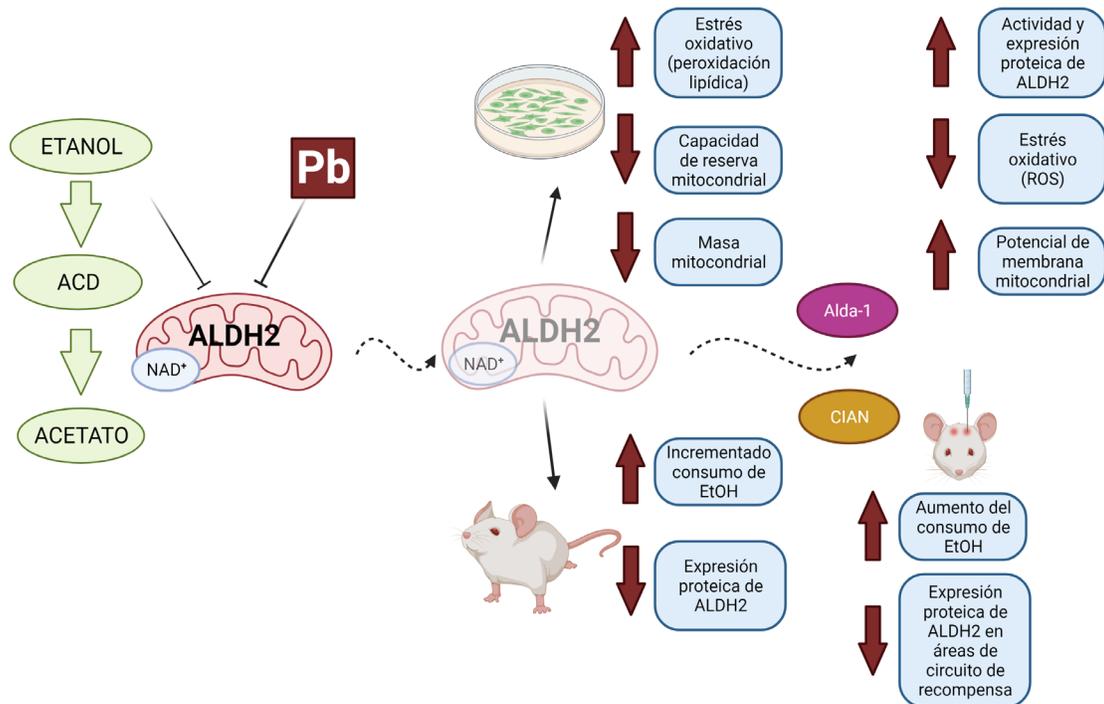
inhibitorio en el grupo expuesto a Pb y EtOH, respecto a ambos tóxicos por separado; observándose también una disminución en la expresión proteica de ALDH2 (determinada por *Western blot*). En un segundo objetivo, evaluamos parámetros de la funcionalidad mitocondrial, donde pudimos determinar en células expuestas a Pb y EtOH, una reducida masa mitocondrial, con disminución de la capacidad respiratoria máxima y la capacidad de reserva mitocondrial, y un aumento en el consumo de oxígeno extra mitocondrial. A su vez, evidenciamos una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).

A partir de estos resultados evaluamos el perfil oxidativo en esas células, demostrando el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) coincidente con lo obtenido en los ensayos de consumo de oxígeno. Asimismo, la exposición combinada a Pb y EtOH produjo daño por peroxidación lipídica (evaluado mediante la cuantificación de T-BARS) y un aumento en la actividad y expresión proteica de la enzima antioxidante catalasa (CAT), posiblemente como mecanismo compensatorio frente al aumento de EROs.

Interesantemente, utilizando un activador de ALDH2, Alda-1, pudimos revertir el aumento de EROs y la disminución del $\Delta\Psi$. Alda-1 fue capaz de activar a ALDH2 hasta 20 veces en el grupo expuesto a Pb y EtOH respecto al grupo control, lo que pone de manifiesto: 1) el rol antioxidante y neuroprotector de esta enzima, que metaboliza aldehídos tóxicos evitando los daños que provoca su acumulación; y 2) el potencial terapéutico de activadores como Alda-1 frente a diversas patologías.

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias sobre los mecanismos de interacción entre Pb y EtOH, siendo la inhibición de la actividad y expresión proteica de ALDH2, el daño mitocondrial y el estrés oxidativo una consecuencia común a nivel bioquímico y, a nivel neuroconductual, el estado de vulnerabilidad que desencadena una respuesta diferencial frente al consumo de alcohol debido a la exposición a Pb.

RESUMEN GRÁFICO



En el esquema se ilustran los aportes realizados por este trabajo de tesis al conocimiento de los efectos de Pb y EtOH sobre la funcionalidad de la enzima ALDH2. Se esquematiza el efecto inhibitorio de Pb y EtOH (flechas romas) sobre ALDH2 y el daño a la funcionalidad mitocondrial luego de la exposición a ambos neurotóxicos (mitocondria translúcida). Hacia arriba se esquematizan los resultados obtenidos en el modelo *in vitro*, empleando células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Hacia abajo, se resumen los hallazgos en el modelo *in vivo*, utilizando ratas Wistar expuestas perinatalmente a Pb. Por último, a la derecha, las evidencias obtenidas luego de las manipulaciones sobre la enzima ALDH2: activación (utilizando Alda-1 en células SH-SY5Y) o inhibición (empleando cianamida en el modelo *in vivo*).

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Plomo como contaminante ambiental. Aspectos generales

El Plomo (Pb) es un metal pesado que se encuentra presente en los ecosistemas debido a su utilización en múltiples aplicaciones industriales, adjudicándole diferentes usos en la elaboración y fabricación de una gran variedad de productos de consumo, principalmente debido a sus propiedades químicas, como baja temperatura de fusión, maleabilidad, ductilidad, baja conductividad, resistencia a la corrosión y se puede combinar fácilmente con otros metales para formar aleaciones. Se ha utilizado antiguamente en pipas, utensilios de cocina y vajilla, pigmentos cerámicos, cosméticos y, por su sabor dulce, como aditivo y edulcorante en la producción del vino. Más recientemente, se utilizó como tinte para objetos de vidrio y en la impresión de libros (Hernberg, 2000). Uno de sus principales usos en el pasado fue como antidetonante en las naftas, descontinuándose a partir del año 1996 en Argentina. Entre otros usos comunes se encuentra su empleo como componente de colorantes en pinturas (reglamentado a partir del año 2004 a valores menores al 0,06%), en plástico de juguetes y como material principal de cañerías de la red de aguas domiciliarias.

En la actualidad, la gran mayoría de los procesos que requerían de la utilización de Pb han sido restringidos en favor de disminuir su liberación al medio ambiente y la exposición a los seres vivos. Sin embargo, este metal se utiliza aún en la fabricación de baterías, municiones, electrodos para electrólisis, blindaje contra radiación y refrigerante de reactores, así como en la producción de semiconductores y plásticos de cloruro de polivinilo (PVC) (Caito & Aschner, 2017).

Las consecuencias de la toxicidad ejercida por Pb en los organismos vivos representan un problema de salud pública de dimensiones globales ya que este metal no se biotransforma y permanece acumulado en agua, suelos, aire y seres vivos. A raíz de los avances en el conocimiento de los efectos tóxicos de Pb se ha concluido que no existen niveles seguros de Pb en sangre en humanos. Cabe destacar que este metal no tiene ninguna función biológica en los organismos y que, por el contrario, se lo asocia con un perfil de competencia con cationes divalentes, como el calcio (Ca^{2+}), con

funciones asociadas a canales iónicos, segundo mensajero, entre otras, el magnesio (Mg^{2+}), cofactor de enzimas y el hierro (Fe^{2+}) como componente de la hemoglobina, interfiriendo así con numerosos procesos fisiológicos y alterando la bioquímica celular.

En los últimos años, se llegó a un consenso sobre la ausencia de un umbral para sus efectos nocivos sobre la salud y la naturaleza permanente e irreversible de consecuencias asociadas con la exposición a Pb (Mathec y cols, 2021). Los Centros de Control de Enfermedades, (CDC, EE.UU.), realizan el seguimiento epidemiológico de la exposición a este metal de la población de EE.UU. y han establecido en su última revisión en el año 2012 que $5 \mu\text{g}/\text{dl}$ de Pb en sangre en la población pediátrica es considerado un nivel aceptable o de referencia (**Figura 1**), aunque no “seguro”, ya que numerosas evidencias clínicas demuestran que niveles inferiores de Pb en sangre provocan alteraciones en el desarrollo y conductuales. Por ello se lo considera un neurotóxico ambiental que provoca una multitud de efectos adversos, especialmente para el cerebro en desarrollo (Gąssowska y cols, 2016; Neal & Guilarte, 2010).

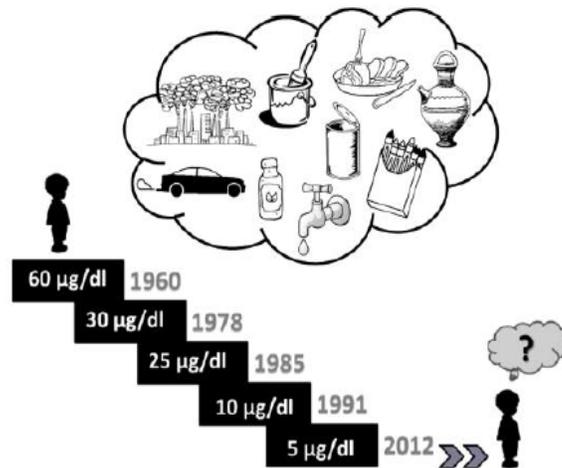


Figura 1. Curva temporal de los niveles de Pb en sangre considerados seguros en niños por los CDC. En la parte superior del gráfico se han ilustrado las principales fuentes de exposición al metal. Extraído de Mattalloni y cols, 2014.

En relación a los estudios realizados en nuestro país, la mayoría de los reportes locales se focalizan en niños que viven cerca de áreas industriales y mineras y, por consiguiente, están expuestos a altos niveles de Pb. Al respecto existen en Argentina

protocolos que intentan reducir la exposición a Pb y monitorear las exposiciones en niños (Ministerio de Salud, República Argentina, 2013). Abordajes más recientes están siendo realizados desde el año 2009 por la Autoridad de la Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR) a fin de implementar un plan de saneamiento ambiental integral en este sector de intensa actividad industrial de la Provincia de Buenos Aires, donde viven aproximadamente 5.800.000 millones de personas, que representan el 15% de la población del país. Dentro de la agenda, se encuentra la prevención de la exposición a Pb (y otros contaminantes) y el monitoreo de sus concentraciones en la población, así como también la cuantificación de la acumulación del metal en aguas y suelos. Al respecto, en un informe realizado en el año 2020, reportan que la población (sin especificar edad ni sexo) que presentó niveles de Pb en sangre por encima de los niveles de referencia actuales ($5 \mu\text{g}/\text{dl}$) monitoreada desde 2017, presenta un descenso de la plumbemia de un 13,8% en el año 2020. Los altos niveles de Pb en sangre en esta población se han asociado con pobreza e indigencia, necesidades básicas insatisfechas y familias con actividades laborales asociadas a reciclado y recolección de basura y cartón.

Muy pocos estudios (Disalvo y cols, 2009; Martins y cols, 2016); han explorado los efectos de este metal en las poblaciones de Argentina que viven en áreas que carecen de una fuente industrial cercana de Pb y que están asociados con la exposición a bajos niveles del metal. En un estudio realizado en 2015, se determinó que sólo el 3% de esa población presentaba niveles superiores a $5 \mu\text{g}/\text{dl}$ (*resultados en prensa*). En particular en la Ciudad de Córdoba, en la población infantil se determinaron concentraciones de Pb en sangre que arrojaron un promedio de $7,70 \mu\text{g}/\text{dl}$ (Hansen y cols, 1999). Posteriormente, Martínez y cols en 2013, determinaron en un grupo representativo de la población pediátrica, que el 16,77% presentó plumbemias superiores a $5 \mu\text{g}/\text{dl}$, con una media poblacional de $2,3 \mu\text{g}/\text{dl}$ (Martinez y cols, 2013).

Estos datos reflejan un descenso de los niveles de Pb en sangre en las poblaciones estudiadas, efecto que puede atribuirse a las medidas regulatorias orientadas a disminuir la utilización del metal en diferentes procesos industriales (particularmente en las naftas y pinturas), así como las actividades de prevención y

concientización social (Bellinger & Bellinger, 2006). A continuación, se describirán los principales mecanismos de toxicidad atribuidos a la exposición a Pb.

Plomo: Mecanismo de toxicidad. Toxicocinética y toxicodinamia

La principal vía de ingreso del Pb al organismo en la población general es por vía oral, aunque también puede ingresar por vía respiratoria, siendo las principales fuentes de exposición el suelo, agua, aire y alimentos contaminados. Las formas químicas tóxicas más comunes son las sales de acetato, carbonato y cromato de Pb, así como óxidos y sulfuro de Pb (Gupta, 2016).

En relación a su disposición en el organismo, este metal posee una alta afinidad por los eritrocitos y es rápidamente incorporado y transportado por los mismos, inhibiendo enzimas involucradas en la síntesis del grupo HEMO y compitiendo con los cationes Ca^{2+} y Fe^{2+} (Virgolini & Aschner, 2021; Costa y cols, 2021). Así en el período de aproximadamente 30 días puede ser detectado en sangre permitiendo el diagnóstico de una exposición reciente o continua. En esta etapa, el Pb puede provocar anemia microcítica e hipocrómica interfiriendo con la síntesis del grupo HEMO inhibiendo enzimas, particularmente la delta-ALAdeshidratasa (δ -ALAd). Posteriormente, es redistribuido a órganos y tejidos blandos, generando alteraciones en el sistema nervioso, hematopoyético, cardiovascular, reproductivo y renal, para finalmente, depositarse en tejidos duros como huesos, uñas y dientes, los cuales constituyen las matrices biológicas de elección para detectar una exposición en el pasado. Este depósito óseo es dinámico puesto que el Pb compite con el Ca^{2+} , representando una amenaza para el organismo frente a algún desafío fisiológico, como puede ser por ejemplo el embarazo, osteoporosis o cáncer de hueso. En estos casos, el Pb depositado puede ser nuevamente transportado por los glóbulos rojos para ejercer su toxicidad en tejidos blandos. Un pequeño porcentaje es excretado, eliminándose por sudor y heces, así como por leche materna (Ufelle y cols, 2019).

Es importante resaltar sus efectos neurotóxicos y teratogénicos, resultado de su capacidad de atravesar las barreras hematoencefálica (BHE) y placentaria. Se ha reportado evidencia que la exposición materna al Pb durante el embarazo ocasiona

exposición fetal al metal y puede afectar negativamente la salud de la madre y el niño dependiendo del nivel y tiempo de exposición materno (Patrick, 2006). En relación a los mecanismos celulares y moleculares de toxicidad, se ha descrito que el Pb particularmente en el cerebro interfiere con la liberación de neurotransmisores, mimetiza los efectos de otros cationes divalentes, compitiendo por sus sitios, produce disfunción mitocondrial, desbalance redox y neuroinflamación, siendo el efecto final la interacción entre todos estos factores, lo que determinaría la confluencia en un mecanismo multifactorial de acción tóxica (Sanders y cols, 2019; Virgolini y Aschner, 2021).

Plomo como neurotóxico del desarrollo

Debido a que en la actualidad los episodios de intoxicación aguda son poco frecuentes, los efectos tóxicos más conocidos y estudiados del Pb están relacionados con la exposición crónica a bajos niveles, lo que trae como consecuencia alteraciones sutiles, particularmente en el cerebro de organismos en formación, por lo que es considerado un neurotóxico del desarrollo (Rossi, 2008; White y cols, 2007).

El cerebro en la etapa prenatal y postnatal temprana experimenta fases críticas y esenciales que involucran principalmente la proliferación y diferenciación de sus diversos tipos celulares, así como también se establecen las primeras conexiones que darán origen a las sinapsis. A grandes rasgos, puede decirse que el desarrollo del cerebro es un proceso con ciclos de división celular, migración, sinaptogénesis, poda celular y mielinización. Estas etapas ocurren a ritmos variables y cambian también de acuerdo a la región cerebral, persistiendo hasta la niñez. Por esta razón, se ha demostrado que el Pb interrumpe la correcta formación de las sinapsis, la migración de neuronas y la formación de interacciones neurona-glia, lo cual puede provocar que no se establezcan las conexiones adecuadas entre las estructuras conduciendo a déficits funcionales (Caito & Aschner, 2017). Durante estos eventos de desarrollo, el cerebro se encuentra en un importante estado de vulnerabilidad frente a tóxicos ambientales, especialmente metales pesados como el Pb (Kim y cols, 2011).

La población pediátrica es especialmente vulnerable a los efectos tóxicos de Pb, ya que absorbe un 30% más que los adultos y retiene un 29% más frente a una misma dosis, teniendo como consecuencia un aumento de los niveles de almacenamiento en los huesos durante la edad adulta (Cassarett, 2019).

La exposición a Pb en la etapa fetal y pos-natal temprana está asociada con un desarrollo neuroconductual deteriorado, un coeficiente intelectual más bajo y una velocidad de conducción nerviosa disminuida (CDC, 1991). Es importante destacar que los efectos adversos, como la reducción del coeficiente intelectual y la disminución en el rendimiento académico, se producen incluso a niveles inferiores a 10 µg/dl (Jusko y cols, 2008). A este respecto se ha demostrado que las sinapsis representan un sitio blanco de la toxicidad ejercida por Pb. Uno de los efectos más destacados de la exposición en los niños, incluso en dosis bajas (con concentraciones de Pb en sangre por debajo de 10 µg/dl), es la disminución de la capacidad de aprendizaje y memoria con un efecto adverso sobre el desarrollo cognitivo e intelectual (Kazi y cols, 2013; Surkan y cols, 2007). Se ha descrito también que la exposición a este metal afecta la liberación de neurotransmisores pre-sinápticos tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, principalmente mediante un mecanismo competitivo con Ca²⁺ (White y cols, 2007; Xiao y cols, 2006). Además, su efecto sobre las alteraciones de las proteínas sinápticas ha sido informado en una variedad de modelos de toxicidad aguda y crónica (Neal y cols, 2012). A pesar de estas evidencias, el mecanismo preciso por el cual Pb interrumpe la transmisión sináptica no está completamente esclarecido.

Se puede concluir entonces que ningún nivel de exposición al Pb parece ser "seguro" e incluso los niveles de exposición considerados "bajos" en los niños, actualmente, están asociados con déficits en el desarrollo neurológico. Los cambios neuroquímicos y neuroconductuales persisten incluso luego de que la exposición al metal ha cesado, dejando una huella biológica que predispone al organismo expuesto a un estado de vulnerabilidad a posteriores eventos desafiantes en el futuro, que incluye una alterada respuesta a drogas de abuso.

Interacción entre plomo y etanol

Desde la perspectiva clínica se ha descrito, una relación entre la exposición a Pb y el consumo de alcohol (etanol, EtOH), que es dependiente tanto de la dosis o concentración, como del tiempo total y etapa del desarrollo donde ocurre la exposición a ambos tóxicos.

Se han informado niveles más altos de Pb en sangre en trabajadores alcohólicos expuestos a Pb en comparación con los no alcohólicos, con valores de 1,93 $\mu\text{mol/l}$ contra 0,14 $\mu\text{mol/l}$ respectivamente, con un valor medio poblacional de 1,93 $\mu\text{mol/l}$; lo que indica que estos trabajadores podrían ser más propensos a los efectos tóxicos del metal que los no alcohólicos (Cezard y cols, 1992). Se ha documentado también, en la interacción entre ambos neurotóxicos, que al ser el EtOH un compuesto volátil que puede atravesar la BHE, podría facilitar también la entrada de Pb al cerebro aumentando así su neurotoxicidad, ya que compite con el Ca^{2+} intracelular (Flora & Tandon, 1987). En concordancia con lo anterior, un estudio posterior del mismo grupo de investigación determinó que las concentraciones de Pb en sangre, hígado, riñón y cerebro fueron significativamente mayores en ratas expuestas simultáneamente durante 8 semanas a Pb (10 mg/kg) y EtOH (10% v/v en el agua de bebida) en comparación con el grupo expuesto sólo a Pb, alcanzando niveles (expresados en μg de Pb por g de tejido o por ml de sangre) de 66,2 vs 116,72 en sangre; 7,79 vs 12,16 en hígado; 11,31 vs 12,93 en riñón y 2,58 vs 4,13 en cerebro (Flora y cols, 1999).

Ahamed y cols, en 2005, demostraron en un modelo experimental de ratas con exposición combinada a Pb (50 mg/kg de peso/día) y EtOH (3 g/kg/día) durante 8 semanas, que la administración intragástrica de ambos tóxicos resultó en un detrimento del metabolismo energético, ya que las mitocondrias aisladas de cerebro demostraron una menor capacidad de generar adenosin trifosfato (ATP), menor capacidad de consumo de oxígeno y alteraciones en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, con la consecuente generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y radicales libres. Estos efectos se manifestaron (y en algunos casos se vieron potenciados) con respecto a los grupos sólo tratados con Pb o EtOH (Ahamed y cols, 2005). Flora y cols, (2012) también exploraron los efectos dosis-dependientes de

la ingestión de EtOH durante la co-exposición con Pb en ratas. En este caso, el Pb se administró por vía oral, una vez al día a una dosis de 10 mg/kg, mientras que el EtOH se administró en el agua de bebida a 3 dosis diferentes: 1%, 2% y 5% v/v. La exposición continuó durante 3 meses, después de los cuales se realizaron diversos ensayos bioquímicos. Los resultados muestran un mayor estrés oxidativo en animales co-expuestos al Pb y al EtOH en comparación con cada tóxico por separado. También se reportaron disminuciones en la actividad enzimática de δ ALA-d, las reservas de glutatión (GSH) y en la actividad de la enzima antioxidante **catalasa (CAT)**, aunque un aumento significativo de EROs, GSH oxidado, peroxidación lipídica y del Ca^{2+} intracelular. Estas determinaciones fueron realizadas en sangre, hígado y riñón de ratas (Flora y cols, 2012). Además, demostraron que la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) disminuyó significativamente en animales expuestos a Pb o a EtOH, pero se observó un efecto más pronunciado en las ratas expuestas a la combinación de ambos tóxicos. Estos resultados podrían sugerir una alteración en el metabolismo de EtOH, principalmente a nivel de hígado, viéndose disminuida su capacidad para degradarlo.

En relación a estudios conductuales en animales, se ha reportado que ratas expuestas crónicamente a niveles altos de Pb durante la edad adulta, mostraron mayor número de palanqueos por EtOH en una prueba de autoadministración, lo cual está asociado a una mayor ingesta de EtOH en comparación con sus controles y a una mayor búsqueda de la droga (Nation y cols, 1986). En un estudio realizado en 1999 por Flora y cols, se reportó un incremento en la actividad locomotora y comportamiento agresivo en animales expuestos a Pb y EtOH en comparación a la exposición a ambos tóxicos por separado (Flora y cols, 1999).

En consonancia con estos datos, en resultados previos de nuestro grupo de investigación se demostró que la exposición perinatal a niveles bajos de Pb aumenta la ingesta de EtOH en una sesión diaria de 2 h en un protocolo de 28 días de libre elección entre EtOH y agua. Además, producto de este mayor consumo de EtOH se evidenció también un aumento en la actividad locomotora de estos animales inmediatamente después de la última sesión de consumo (Mattalloni y cols, 2013;2017). Conjuntamente, los animales expuestos al Pb también mostraron mayores tasas de respuesta en un

esquema de autoadministración, utilizando una escala de comportamiento de razón fija progresiva evidenciando un punto de quiebre (*breaking point*) a tasas más altas de palanqueo en comparación con los controles, demostrando una mayor motivación para autoadministrarse EtOH (Mattalloni y cols, 2013). Estos resultados señalan la mayor vulnerabilidad al consumo de EtOH que presentan ratas adolescentes expuestas durante toda la gestación y lactancia a dosis bajas de Pb (Virgolini y cols, 1999; Mattalloni y cols, 2013, 2017). A este respecto, se demostró también que la exposición a Pb y EtOH afecta las enzimas involucradas en el metabolismo de EtOH. Particularmente se evidenció un aumento en la expresión proteica (determinada mediante inmunohistoquímica y *Western blot*) y en la actividad de la enzima CAT, (principal enzima metabólica de EtOH) en áreas del circuito mesocórtico-límbico cerebral, favoreciendo así la acumulación de los metabolitos producto de la oxidación de EtOH y sus efectos neurotóxicos. Esta temática será abordada y desarrollada con profundidad en el Capítulo 1 de este trabajo de tesis.

Sin embargo, los mecanismos de interacción entre EtOH y Pb hasta ahora no están completamente dilucidados y continúan siendo objeto de estudio. Las evidencias *in vitro* de los efectos resultantes de la exposición combinada a Pb y EtOH serán presentadas y discutidas en el Capítulo 2 y subsiguientes.

A continuación, se abordarán conceptos referidos al metabolismo de EtOH, lo cual podría ser responsable, en parte, de sus características de droga de abuso.

Etanol

El alcohol (etanol, EtOH) es una droga presente en las bebidas alcohólicas cuya ingesta se ve promovida por la aceptación social, el fácil acceso proporcionado por un bajo costo relativo y la publicidad asociada a las bebidas alcohólicas. Es una droga sedante e hipnótica que posee un efecto estimulante motor a dosis bajas y moderadas, mientras que a dosis mayores produce ataxia y sedación, respondiendo a un mecanismo de acción bifásico. Sus efectos farmacológicos dependen de su concentración en sangre y en cerebro, las que están determinadas por su toxicocinética. Considerando su amplia distribución en el organismo y sobre todo en el sistema nervioso central (SNC)

posterior a su consumo, el EtOH interactúa con numerosas proteínas, neurotransmisores y otros blancos moleculares en neuronas y sinapsis dentro del cerebro por lo que se lo identifica como una droga con mecanismo de acción no específico, multifactorial.

Una característica común de las sustancias adictivas, incluido el EtOH, es su capacidad para activar el sistema mesocórtico-límbico cerebral. Este sistema está conformado por cuerpos celulares dopaminérgicos que se encuentran en el área tegmental ventral (ATV), proyectando sus axones hacia el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF). Estas proyecciones dopaminérgicas también están involucradas en los efectos reforzantes de las recompensas naturales, como la comida y la actividad sexual. Imperato y Di Chiara en 1986 demostraron que la administración de EtOH activa el sistema mesolímbico de ratas, aumentando la liberación de dopamina (DA) en el NAc. A su vez, el metabolismo de EtOH tiene un rol crucial en sus efectos en el SNC. Varios estudios han demostrado que el primer metabolito producto de su oxidación, el acetaldehído (ACD), a pesar de los efectos de aversión que se producen por su acumulación periférica, cuando es generado en el cerebro tiene acciones reforzantes positivas en el SNC (Imperato y Di Chiara, 1986; Israel y cols, 2015). Al respecto, se ha demostrado que las ratas se autoadministran ACD en el ATV en concentraciones micro molares, confirmando sus efectos reforzantes positivos y sugiriendo que está involucrado en las acciones motivacionales de EtOH, probablemente aumentando la liberación de DA de las proyecciones hacia NAc (Rodd y cols, 2005). A continuación, se desarrollarán aspectos involucrados en el metabolismo oxidativo de EtOH.

Metabolismo oxidativo del Etanol

Una vez ingerido, el EtOH se distribuye y equilibra rápidamente en el organismo. El hígado es el sitio principal de su metabolismo en tejidos periféricos, realizando su oxidación a ACD por la **enzima alcohol deshidrogenasa de clase 1 (ADH1)** principalmente) y en menor medida por las enzimas del sistema microsomal citocromo P450 (CYP2E1, inducible por altas concentraciones de EtOH) y CAT, cuyo rol es

considerable durante el metabolismo en periodos de ayuno (Handler & Thurman, 1990). El primer metabolito, ACD, clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinógeno de clase I, ha demostrado ser altamente hepatotóxico y ha sido descrito que retrasa o deteriora la replicación de los hepatocitos tanto *in vivo* como en cultivos celulares (Scheer y cols, 2016). Debido a esto, el consumo crónico de EtOH no solo causa daño y muerte celular, sino que también deteriora la capacidad del hígado para reemplazar las células dañadas y responder adecuadamente a las lesiones y al metabolismo de otras sustancias.

En cerebro, se encuentran altos niveles de expresión de **ADH de clase 3** (ADH3), que no es capaz de oxidar a EtOH (Galter y cols, 2003) y ha sido reportada una baja actividad enzimática y expresión de ADH1 (Estonius y cols, 1993), por lo que el EtOH que difunde libremente hacia el SNC es metabolizado a ACD principalmente por la enzima **CAT** cerebral (Svanas & Weiner, 1985; Peana y cols, 2016).

La BHE limita la difusión de ACD al cerebro, de modo que sus concentraciones son consistentemente más bajas en el líquido cefalorraquídeo y los tejidos cerebrales que en la sangre periférica (Jamal y cols, 2003; Quertemont y cols, 2004). Sin embargo, la difusión de ACD a través de la BHE es favorecida por sus propiedades fisicoquímicas, como su alta lipofilidad y pequeño tamaño molecular, lo que debiera permitir que penetre muy fácilmente en el SNC. No obstante, la difusión de ACD es limitada por la presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) en la microvasculatura del cerebro, creando una barrera metabólica eficaz (Eriksson & Sippel, 1977; Zimatkin, 1990, 1991).

La presencia de ACD en el SNC se origina *in situ* y proviene de la vía mediada por CAT en un 60% (Zakhari & Li, 2007; Tambour y cols, 2007), que a su vez está limitada en su actividad por la disponibilidad de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), formando ambos una unidad catalítica que se conoce como compuesto I (Aragon y cols, 1991; Zimatkin & Buben, 2007). Por otra parte, el 20% del EtOH que llega a cerebro se metaboliza mediante la enzima CYP2E1 (Heit y cols, 2013; Zimatkin y cols, 2006). Se ha determinado que CYP2E1 se expresa en cerebro, principalmente en la corteza frontal, bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo y que es inducible por el consumo de EtOH (Kawalek y cols, 2003).

Independientemente de su origen (central o periférico), el ACD es rápidamente convertido a **acetato** por la enzima **ALDH2** de localización mitocondrial. Esta enzima es considerada una oxidorreductasa porque cataliza la transferencia de electrones desde un donante, el ACD, a un aceptor: el cofactor nicotin adenin dinucleótido oxidado (NAD^+). La disponibilidad de NAD^+ resulta ser el paso limitante de la reacción de oxidación mediada por ALDH2. Interesantemente es en la mitocondria donde el nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH) es re-oxidado a NAD^+ por el complejo I (CI) de la cadena respiratoria mediante la enzima NADH ubiquinona oxidorreductasa.

El Mg^{2+} es otro cofactor requerido en la reacción, cuya función es estabilizar el fosfato de NAD para aumentar la velocidad de reacción total. Así, la capacidad de metabolizar ACD *in vivo* depende no sólo de las propiedades cinéticas de ALDH2 sino de la capacidad del CI de re-oxidar el NADH a NAD^+ . La **Figura 2** ilustra el metabolismo oxidativo del EtOH.

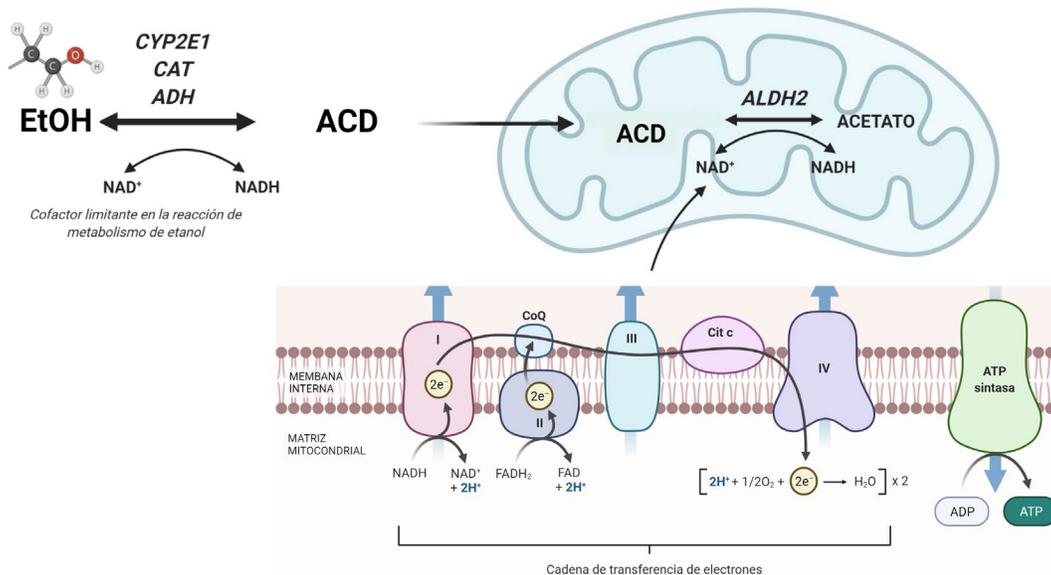


Figura 2. Metabolismo oxidativo del EtOH. EtOH es metabolizado a ACD por la enzima ADH (mayormente en el hígado), por CAT (principalmente en SNC) y en menor medida por la enzima inducible CYP2E1. Este ACD difunde a la mitocondria para ser oxidado a acetato mediante la enzima ALDH2, cuyo cofactor NAD^+ se genera en el CI de la Cadena de transferencia electrónica (CTE) mitocondrial.

Además, es conocido que la acumulación de ACD en la periferia produce un patrón de efectos comúnmente definido por el término "sensibilidad al alcohol" (o

flushing en inglés), porque estos síntomas se observan con mayor frecuencia cuando las personas con actividad deficiente de ALDH2 (portadores de ALDH2*2 u otras mutaciones) beben alcohol (Eriksson, 2001). Estos efectos fisiológicos típicos incluyen vasodilatación, lo que da como resultado un aumento de la temperatura de la piel y enrojecimiento facial, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, palpitaciones cardíacas, presión arterial baja, bronco constricción, náuseas, dolor de cabeza, mareo y malestar general, entre otros (Lai y cols, 2013). De manera opuesta, reportes indican que la fracción de ACD generado en el cerebro a partir de la acción de CAT es en realidad reforzante puesto que modula algunos de los efectos neurofarmacológicos de EtOH.

En ratas se evidenció la adquisición de la conducta de autoadministración de ACD y se demostró que el ACD es un reforzador 1.000 veces más potente que el EtOH cuando se entrena a ratas para autoadministrarse ACD en VTA. Estos estudios mostraron que ratas criadas como bebedoras de alcohol (Cepa P) se autoadministran ACD en concentraciones (6 a 20×10^{-6} M) que son 3 órdenes de magnitud más bajas que aquellas para la autoadministración de EtOH (17×10^{-3} M) en ATV (Rodd-Henricks y cols, 2002). Se ha señalado, además, que la administración intracerebral de dosis bajas de ACD induce efectos comportamentales, psicoestimulantes y reforzantes similares a los generados por consumo de EtOH y que son característicos de drogas con capacidad adictiva (Quertemont, 2007; Peana y cols, 2017).

En este contexto, las enzimas involucradas en el metabolismo del EtOH han sido claves para la comprensión de los efectos de esta droga y sus metabolitos (tanto en la periferia como a nivel central), así como también el desarrollo de fármacos para el tratamiento de los trastornos por el consumo de alcohol (en inglés: *Alcohol use disorders*, AUDs), que se focalizan en políticas de reducción del daño, ayudando al paciente a lograr la abstinencia o minimizar la frecuencia y cantidad de ingesta de alcohol. El tratamiento farmacológico actual para los AUDs se basa en el uso de tres medicamentos aprobados por Food and Drug Administración (FDA, EE.UU.): acamprosato, naltrexona y disulfiram (DIS), los dos primeros relacionados con las bases neurales de sus efectos, más precisamente con los neurotransmisores que encuentran alterados por las acciones de esta droga y el último relacionado con el metabolismo oxidativo de EtOH.

Es así que algunos abordajes terapéuticos emplean inhibidores de la enzima ALDH2, como lo son DIS y cianamida (CIAN). En estos casos, la administración de EtOH a animales o humanos luego del tratamiento con inhibidores de ALDH2 conduce a la típica reacción de sensibilidad al EtOH, que actúa como disuasivo del consumo, pero a su vez, conlleva numerosas consecuencias deletéreas para el organismo si se consume EtOH durante los tratamientos (Yoshimura y cols, 2014). En consecuencia, la mayoría de los estudios en animales que utilizan inhibidores de ALDH2 de manera experimental se han centrado en medir el consumo posterior de EtOH, con el fin de establecer un modelo para predecir la eficacia de los inhibidores de ALDH2 como fármacos disuasivos del consumo en el tratamiento de los AUDs.

De esta manera, se reconoce que el ACD tendría un rol dual en los efectos motivacionales de EtOH, dado que su acumulación periférica sería responsable de los efectos adversos y, por lo tanto, disuasivos de su consumo en contraposición con los efectos reforzantes producto de la acumulación de ACD a nivel cerebral. Más detalles acerca del rol de ACD se profundizarán en el Capítulo 1.

En base a estos antecedentes puede concluirse que variaciones en la funcionalidad de las enzimas encargadas de metabolizar al EtOH y al ACD, es decir ADH, CAT, CYP2E1 y ALDH2, determinan en gran parte la concentración de dichas sustancias en sangre y tejidos y a su vez también influyen en la manifestación de sus efectos motivacionales o aversivos, por lo que están implicados en el desarrollo de dependencia al EtOH y a la susceptibilidad a los efectos citotóxicos de esta droga y sus metabolitos (Zakhari & Li, 2007).

En particular, en la sección siguiente de este trabajo de tesis describiremos las principales características de la enzima ALDH2, en la cual se ha focalizado gran parte de este estudio.

Familia de enzimas aldehído-deshidrogenasas: Aspectos generales

A diferencia de muchos otros sistemas, la investigación del grupo de enzimas denominadas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) se originó en modelos humanos, en lugar de los bacterianos, y el principal interés surge de su vínculo central con las

condiciones patológicas. La superfamilia está constituida por 9 familias con 19 genes que codifican para las diferentes isoenzimas conocidas en humanos y caracterizadas por desempeñar funciones cruciales en varios procesos biológicos durante el desarrollo y la senescencia, así como también formando parte de las vías de desintoxicación en el organismo. Se expresan en varios compartimentos subcelulares que incluyen mitocondrias, retículo endoplásmico (RE), núcleo y citosol de diferentes tejidos, como mucosa gástrica, corazón y vasculatura, pulmones, hígado, retina y cerebro (Alnouti & Klaassen, 2008).

Hasta la fecha 10 de los 19 genes humanos de ALDH tienen una estructura proteica resuelta y se agrupan de acuerdo con la secuencia, identidad, filogenia y características estructurales combinadas (**Figura 3**). La clasificación inicial de las ALDH comenzó a fines de la década de 1980 cuando solo unas pocas secuencias estaban disponibles y que llevaron a su clasificación primaria en 3 clases distintas: ALDH 1, 2 y 3 (Hempel & Lindahl, 1989), principalmente diferenciándolas por su porcentaje de homología, expresión tisular, su ubicación intracelular y afinidad por sus sustratos. La mayoría de las ALDH tienen múltiples funciones, por ejemplo, ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A1 y ALDH4A1 humana pueden llevar a cabo actividad esterasa (Sládek, 2003) y ALDH2 también posee actividad nitrato reductasa (Sydow y cols, 2004), sugiriendo más de una función catalítica para la familia ALDH.

Con un número creciente de secuencias conocidas, una nueva clasificación fue adoptada posteriormente para establecer reglas para la nomenclatura de las ALDHs. Así, las proteínas con una identidad de secuencia superior al 40% fueron consideradas pertenecientes a la misma clase, mientras que las proteínas con más del 60% de identidad de secuencia se han asignado a la misma subclase (Vasiliou y cols, 1999). Actualmente, la nomenclatura de las ALDHs abarca desde ALDH1 a ALDH24 en diferentes organismos, incluyendo plantas (Brocker y cols, 2013); en tanto que investigaciones emergentes demuestran que existirían aún más clases de ALDHs. Un estudio reciente realizado en bacterias del género *Pseudomonas* identificó 42 clases diferentes de ALDH, lo que demuestra el gran alcance de la diversidad de esta enzima, pero siempre conservando una estructura común entre las diferentes isoenzimas (Riveros-Rosas y cols, 2013; Shortall y cols, 2021). Debido a su importante función,

mutaciones en las diferentes isoenzimas se manifiestan con fenotipos patológicos particulares, como se puede observar en forma resumida en la **Figura 3**.

Entre sus funciones principales, puede mencionarse que catalizan la oxidación irreversible, y dependiente de NAD^+ o de nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADP), de aldehídos de diferentes orígenes biológicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, siendo algunos de ellos productos esenciales para numerosos procesos celulares (Vasiliou y cols, 2004). Estos aldehídos provienen de una amplia variedad de precursores endógenos y exógenos durante numerosos procesos fisiológicos, incluida la biotransformación de macromoléculas tales como aminoácidos, neurotransmisores, carbohidratos y lípidos. Mientras algunos de ellos son esenciales en los procesos fisiológicos, como por ejemplo el retinal en la visión, muchos son carcinogénicos y altamente tóxicos (Marchitti y cols, 2010). Es así que más de 200 diferentes compuestos aldehídos surgen de la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular, incluidos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malonaldehído (MDA) como principales productos del proceso de peroxidación lipídica (Esterbauer y cols, 1991).

Xenobióticos y drogas, como por ejemplo el EtOH, generan ACD, el cual debido a sus propiedades reactivas y a que presenta una alta volatilidad es capaz de formar diferentes aductos con proteínas, lípidos de membrana y ADN, alterando diversos procesos biológicos y aumentando la producción de radicales libres y EROs (Brooks & Theruvathu, 2005).



Figura 3. Relación evolutiva y fenotipos mutacionales de los 19 genes ALDH humanos. El dendograma de clusters ilustra la relación evolutiva de las 19 ALDH humanas y la ubicación cromosómica. También se indican fenotipos demostrados en animales, pero aún no descriptos en humanos. Extraída de Marchitti y cols, 2008.

Estructuralmente, las ALDHs de mamíferos son enzimas compuestas por homotetrámeros u homodímeros conformados por monómeros que, en general, están constituidos por 500-600 aminoácidos cada uno. Los tetrámeros poseen un sitio catalítico en cada monómero y las enzimas pueden mostrar reactividad completa, dependiendo del pH y la presencia de cationes divalentes, como Mg^{2+} . Estudios cristalográficos han demostrado que en los monómeros de todas las clases de ALDHs se encuentran conservados el dominio de unión al cofactor (NAD^+ o $NADP$), el dominio catalítico y dominio de oligomerización (**Figura 4**).

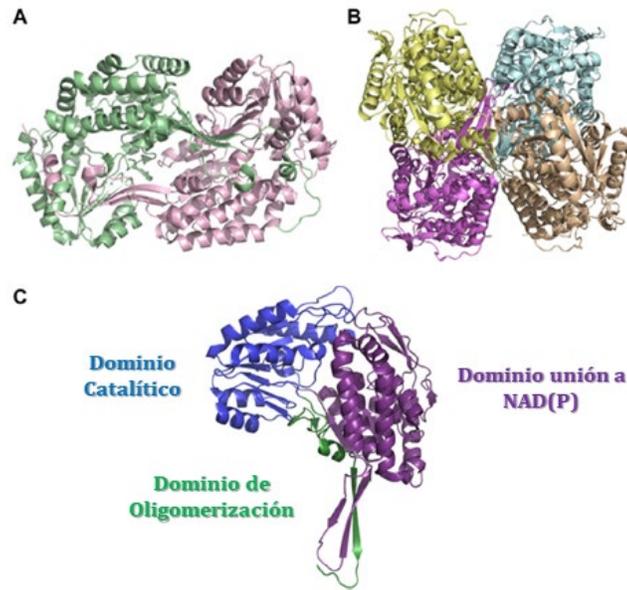


Figura 4. Representación de los diferentes dominios conservados en la familia de enzimas ALDH.

A. Estructura homodimérica de la ALDH31A. **B.** Estructura homotetramérica de la ALDH2 mitocondrial humana. **C.** Se representan los dominios conservados del monómero de ALDH: dominio catalítico (271-470, azul), el de unión a NAD(P) (8-135, 159-270, violeta) y el de oligomerización (verde). Extraído de Shortall y cols, 2021.

En cuanto al mecanismo de catálisis, puede resumirse en 5 pasos como se ilustra en la **Figura 5**. En primer lugar, se produce la activación del sitio catalítico, cuyo aminoácido principal es una cisteína en la posición 302 (Cys302) a través de una abstracción de protones (H^+) mediada por una molécula de agua proporcionada por un ácido glutámico en posición 268 (Glu268). Luego se lleva a cabo el ataque nucleofílico consecuente sobre el carbonilo del sustrato aldehído, mediado por el grupo tiolato de la Cys302. Posteriormente, se forma un intermedio tio-hemiacetal tetraédrico mediante desacilación, con transferencia concomitante de hidruro al anillo piridínico del cofactor NAD(P). Se produce luego la hidrólisis del intermediario tioéster resultante, y finalmente la disociación del cofactor reducido y posterior regeneración de la enzima.

La Cys catalítica se conserva en todas las estructuras que poseen actividad catalítica, siendo la ALDH16 una excepción y un ejemplo de un miembro no catalítico, ya que carece de este residuo y ha sido propuesta como proteína de unión (Liu & Tanner, 2019). Además, el Glu268 cumple una función crucial al activar Cys302 a través

de la desprotonación (Sheikh y cols, 1997). El sitio activo está ubicado en la base del túnel hidrofóbico, cerca de la interfaz tetramérica y frente al sitio de unión del cofactor. Se cree que los residuos que recubren este túnel confieren la especificidad de sustrato de cada isoenzima (Koppaka y cols, 2012). El cofactor NAD⁺ se mantiene unido a la enzima a través de 10 enlaces de hidrógeno, cuatro de los cuales involucran dos residuos, un aminoácido lisina en la posición 192 (Lys192) y Glu399, que están altamente conservadas en todas las isoenzimas ALDH (Sheikh y cols, 1997).

Estudios de mutagénesis sitio-dirigida de estos residuos en la enzima ALDH2 evidenciaron que se modifica el paso limitante de la velocidad de la reacción de la etapa de desacilación a la de transferencia hidruro al anillo de piridina de NAD(P). Los mutantes en Lys192 alteran la especificidad del sustrato de aldehídos alifáticos (como ACD) a aromáticos en ALDH2 (Sheikh y cols, 1997). Las clases ALDH1, ALDH2 y ALDH3 difieren sustancialmente en el paso limitante de la velocidad dependiendo del efecto de la unión del cofactor, presencia de iones divalentes y pH de la reacción (Perez-Miller & Hurley, 2003). La liberación del cofactor reducido es el paso limitante de la velocidad para ALDH1A1, mientras que para ALDH3A1, es la transferencia de hidruro.

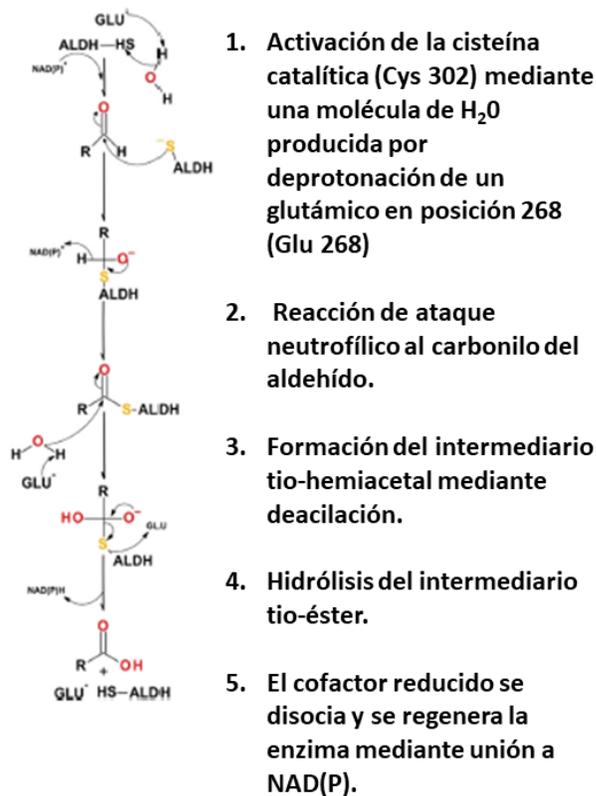


Figura 5. Mecanismo de catálisis de las enzimas de la superfamilia de ALDH. Modificado de Koppaka y cols, 2012.

Asimismo, las ALDHs ejercen funciones no enzimáticas, actuando como proteínas de unión para varios compuestos como hormonas y colesterol. Además, pueden tener importantes funciones antioxidantes en la producción de NAD(P)H, la absorción de la luz ultravioleta y la eliminación de radicales de tipo hidroxilo (OH⁻) (Marchitti y cols, 2008). En cuanto a la función esterasa, el mecanismo propuesto comparte algunas propiedades con la actividad deshidrogenasa. Por ejemplo, requiere el residuo Cys302 activado con participación de Glu268, pero no requiere específicamente de la presencia de NAD(P). Sin embargo, el impacto que tiene la presencia del cofactor en la reacción es variable para cada isoenzima, ya que para la mayoría de las ALDH1 y para ALDH2, la adición de cofactor inicia y favorece la reacción de esterasa (Koppaka y cols, 2012).

A continuación, se focalizarán los aspectos generales más relevantes de la enzima ALDH2.

ALDH2: Una “superenzima”

La enzima ALDH2 es conocida por su rol en el metabolismo de aldehídos tóxicos, brindando a los organismos vivos un escudo protector frente a noxas endógenas y exógenas, como el ACD, las EROs y los productos derivados de la peroxidación lipídica, siendo uno de los principales el 4-HNE (Vasiliou & Nebert, 2005). Además de la función deshidrogenasa, ALDH2 también exhibe actividad de tipo esterasa y nitrato reductasa relevante para la bioactivación de nitrato, incluida la formación de nitroglicerina (Marchitti y cols, 2008; Vasiliou y cols, 2013).

De localización mitocondrial, se expresa en gran medida en varios tejidos, incluidos el corazón, el hígado y el cerebro (Alnouti y cols, 2008; Summary of ALDH2 tissue expression). Se evidencia por inmunohistoquímica marcación positiva para ALDH2 en todas las áreas cerebrales, incluido el endotelio vascular y células gliales (Zimatkin y cols, 1989, 1992). Tanto ALDH2 como ALDH1A1 participan en el metabolismo de catecolaminas, como la DA, la noradrenalina y la epinefrina, debido a su expresión en regiones cerebrales dopaminérgicas. Es importante destacar que la enzima citosólica ALDH1A1 se expresa fuertemente en las neuronas dopaminérgicas del ATV y la *sustancia nigra* (SN), y que desempeñan, junto con ALDH2, un rol principal en el mantenimiento de la integridad del sistema dopaminérgico (Anderson y cols, 2011; Grünblatt & Riederer, 2016). Por lo tanto, se ha señalado que ALDH1A1 y ALDH2 pueden metabolizar aldehídos derivados de DA, como el 3,4 dihidroxifenilaldehído (DOPAL) (K_m_{DOPAL} : 4,2 μ M), aunque no se puede descartar la participación menor de otras isoenzimas (Marchitti y cols, 2007).

Sobre estas bases, se ha descrito el rol de ALDH2 en enfermedades neurodegenerativas donde sus polimorfismos genéticos y modificaciones tanto en expresión como en actividad enzimática, contribuyen a la patogénesis y desarrollo de desórdenes como Alzheimer y Parkinson (revisado en Deza-Ponzio y cols, 2018; Chen y cols, 2016) y también con una participación fundamental en los mecanismos de toxicidad drogas, incluyendo el EtOH (**Figura 6**).

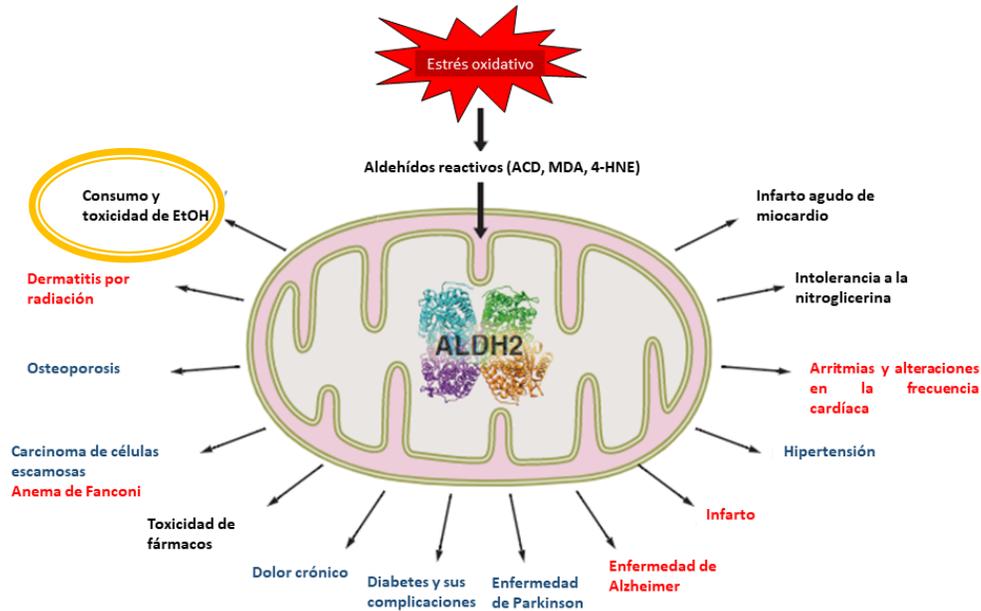


Figura 6. Enfermedades en las que los activadores de ALDH2 pueden resultar beneficiosos. En rojo se destaca las enfermedades en las que la evidencia del papel de ALDH2 provino de estudios preclínicos. Destacan en azul las enfermedades en las que el papel de ALDH2 fue respaldado por observaciones clínicas. En negro, se destaca las enfermedades en las que la evidencia de estudios preclínicos y de estudios epidemiológicos o histopatológicos en humanos respalda el papel de ALDH2. Se ha destacado el rol de esta enzima en los efectos de EtOH. Extraída y modificada de Chen y cols, 2016.

Como se ha mencionado, ALDH2 es la principal enzima involucrada en la oxidación de ACD durante el metabolismo del EtOH, tanto a nivel periférico como central. Presenta una gran afinidad por su cofactor NAD^+ y por ACD ($K_m_{\text{ACD}} < 1 \mu\text{M}$) siendo la enzima con mayor afinidad por ese sustrato, lo que hace el proceso de oxidación muy eficiente. Otras ALDH, incluidas ALDH1A1 y ALDH1B1, también contribuyen a la oxidación del ACD principalmente en hígado, aunque con menor afinidad que la isoenzima ALDH2 (Stagos y cols, 2010).

Ubicado en el cromosoma 12q24, el gen ALDH2 codifica para un polipéptido de 517 aminoácidos. A través de una secuencia de 17 aminoácidos en el segmento N-terminal, ALDH2 ingresa a la matriz mitocondrial y después de que se escinde la secuencia de direccionamiento mitocondrial, la proteína madura de 500 aminoácidos forma un homotetrámero activo (Braun y cols, 1987). En este contexto, mutaciones y

polimorfismos de ALDH2 que conducen a una alteración en la funcionalidad de la enzima son parte de numerosas condiciones patológicas debido a la acumulación de aldehídos tóxicos como acroleína, ACD, 4-HNE y DOPAL.

La mutación puntual ALDH2*2 que ocurre en el nucleótido 1459, donde una adenina se sustituye por una guanina (rs671), produciéndose la sustitución de un ácido glutámico por una lisina en la posición 487 de la cadena de aminoácidos de ALDH2 (Glu487 por Lys487) dando como resultado la isoforma ALDH2*2, es la mutación puntual más frecuente y mejor estudiada en humanos. Dicha mutación es portada por casi el 50% de la población asiática, afectando a unos 560 millones de personas, alrededor del 8% de la población mundial (Gump y cols, 2008; Zhang y cols, 2015). El cambio resultante modifica el aminoácido 487 de la proteína madura, alterando una estructura de hélice alfa, lo que provoca una modificación alostérica de los sitios catalíticos y de unión a coenzimas. La inestabilidad estructural generalizada del mutante ALDH2*2 da como resultado una actividad reducida de ALDH2. Cuando forma un complejo tetramérico con la enzima ALDH2*1 de tipo salvaje (*wild type* en inglés), ALDH2*2 inhibe de forma dominante la catálisis y aumenta el recambio (*turnover* en inglés) de la enzima ALDH2. Dependiendo del número de monómeros ALDH2*2 presentes en un tetramero, la actividad disminuye al 48% o tan solo al 4% de la actividad del tetramero de enzima ALDH2*1 de tipo salvaje (Gross y cols, 2015; **Figura 7**). En el caso de individuos ALDH2*1/*2, las posibles combinaciones reducen la actividad enzimática general de ALDH2 entre un 60% y un 80% en comparación con los de los individuos ALDH2 homocigotos de tipo salvaje 1*/1.

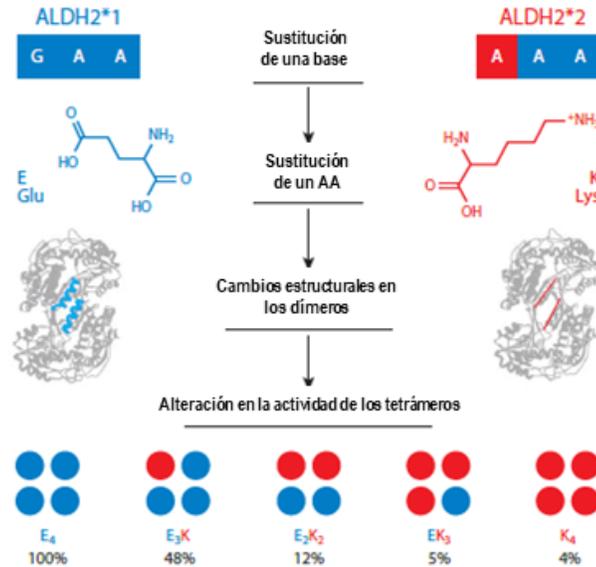


Figura 7. La mutación ALDH2*2 guanina (G) a adenina (A), ocurre en la primera base del codón 487, lo que resulta en un cambio de un aminoácido ácido glutámico (Glu, E) por lisina (Lys, K). A pH fisiológico, el ácido glutámico está predominantemente cargado negativamente, mientras que la lisina está en gran parte cargada positivamente. La mutación inhibe la formación normal de una hélice-alfa integral cerca de la interfase dímero-dímero de cada monómero. La actividad enzimática disminuye sustancialmente a medida que la proporción de monómeros K aumentan, cayendo al 4% en tetrámeros compuestos completamente de monómeros K. Extraída de Gross y cols, 2015.

Esta mutación puntual también da como resultado un sitio de unión a NAD⁺ deficiente, ya que la lisina 478 no puede formar puentes hidrógeno en esa posición, incidiendo directamente en las propiedades cinéticas de la enzima (Larson y cols, 2007). Esto trae como consecuencia un incremento de 200 veces en la Km para NAD⁺ y una reducción en la constante de catálisis de 10 veces en comparación con la enzima de tipo salvaje (Perez-Miller y cols, 2010). Este genotipo ha sido asociado con numerosas y diversas enfermedades, tales como hipertensión, hipercolesterolemia, osteoporosis, diabetes, riesgo aumentado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas e infarto agudo de miocardio y se relacionan con una acumulación de EROs y 4-HNE (Mi y cols, 2006).

Por consiguiente y, en el contexto de este trabajo de tesis, puede afirmarse que la menor actividad de ALDH2 ocasiona un marcado incremento y acumulación en los niveles de ACD en sangre y frente al consumo de EtOH, aún en bajas cantidades, los

individuos experimentan una exacerbación en las reacciones adversas descritas anteriormente como síndrome de *flushing*. Debido a estos efectos, se asocia al alelo ALDH2*2 con un genotipo “protector” frente al consumo excesivo de EtOH resultando en una baja tasa de AUDs en la población asiática (Luczak y cols, 2002). Basándose en estas observaciones y en el conocimiento del rol integral de ALDH2 en la oxidación de ACD derivado del EtOH, se ha impulsado la identificación y desarrollo de moléculas que inhiben selectivamente esta isoenzima con el objetivo de formular fármacos para el tratamiento del alcoholismo, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, debido a las características tóxicas del ACD, se ha observado mediante estudios epidemiológicos que el consumo de EtOH entre los portadores de la ALDH2*2, se asocia con el aumento en la prevalencia para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, especialmente los relacionados al tracto gastrointestinal, como lo son el cáncer oral, de esófago y colon (Yokohama y cols, 2010).

Dado que aproximadamente el 80% de la población mundial tiene acceso y consume o ha consumido EtOH, y puesto que la acumulación de ACD contribuye a una gran variedad de efectos citotóxicos, la identificación de variantes inactivas adicionales de ALDH2 en diferentes poblaciones puede ayudar a desarrollar nuevos tratamientos para los portadores de isoenzimas con baja actividad catalítica (Chen y cols, 2020).

Plomo, etanol y ALDH2

Como fue descrito anteriormente, existen algunas evidencias relacionadas con la interacción entre Pb y EtOH que demuestran un efecto sinérgico entre ambos neurotóxicos. Entre los mecanismos de toxicidad propuestos puede mencionarse a la disfunción mitocondrial y la pérdida del balance oxidativo.

Por su parte, el rol clave de ALDH2 ha sido ensayado en diferentes modelos experimentales, demostrando su eficacia en la protección celular frente a agresiones tóxicas en modelos de enfermedades humanas como la isquemia-reperfusión cardíaca y el accidente cerebrovascular isquémico caracterizados por un incremento en la producción de EROs, y dando lugar a daños producidos por estrés oxidativo (Wang y cols, 2008).

Las escasas evidencias que abordaron el estudio de una interacción entre Pb, EtOH y ALDH2 han demostrado que la exposición de ratas a Pb (administración oral diaria a una dosis de 10 mg/kg de Acetato de Pb y a 10% de EtOH en el agua de bebida, durante 8 semanas) redujo la actividad enzimática de la ALDH2 hepática (Flora & Tandon, 1987). A este respecto, como ya se mencionó anteriormente, en trabajos realizados por nuestro laboratorio, se demostró que ratas expuestas perinatalmente a bajas dosis de Pb presentan un elevado consumo de EtOH con respecto a sus controles. En ese modelo, se evidenció un aumento en la actividad enzimática y expresión de CAT en áreas cerebrales implicadas en el circuito de recompensa mesocórtico-límbico, como NAc, Estriado, ATV, CPF e hipocampo (Mattalloni y cols, 2013) y una disminuida actividad enzimática de ALDH2 en cerebro entero de estos animales (Mattalloni y cols, 2017). De esta manera, la exposición perinatal a Pb y el consumo de EtOH promoverían una mayor tasa de metabolismo de EtOH a nivel cerebral por acción de una aumentada funcionalidad de CAT, pero a la vez, se produciría una acumulación de ACD debido a la inhibición de su degradación por ALDH2, lo que en parte podría explicar los efectos motivacionales que presentan estos animales frente a EtOH.

Sin embargo, son escasos los trabajos que abordan el estudio de los efectos de la exposición combinada a Pb y EtOH sobre la enzima ALDH2. **Sobre la base de estos antecedentes, el presente trabajo de tesis propone estudiar los mecanismos que subyacen a la interacción entre Pb, EtOH y la enzima ALDH2 en dos modelos experimentales diferentes: ratas y cultivo de células SH-SY5Y.**

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Se postula que la interacción entre plomo y etanol alterará la funcionalidad de la enzima aldehído deshidrogenasa 2, lo cual será un factor determinante en la neurotoxicidad ejercida por ambos tóxicos.

Objetivo General

El presente trabajo de tesis propone:

Abordar el estudio de las consecuencias de la exposición a plomo y etanol sobre la funcionalidad de la enzima ALDH2 con el propósito de demostrar su participación en los mecanismos de neurotoxicidad inducidos por la interacción de ambos tóxicos.

Objetivos específicos

- En ratas Wistar:

1. Determinar la expresión de ALDH2 en cerebro y el consumo de etanol en ratas expuestas perinatalmente a plomo:

a) En condiciones basales

b) En respuesta a cianamida, inhibidor selectivo de esta enzima

- En la línea celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, en respuesta a la exposición a plomo y etanol:

2. Determinar la actividad y expresión proteica de ALDH2

3. Evaluar la funcionalidad mitocondrial

4. Estudiar el balance oxidativo

5. Determinar el efecto de la activación de ALDH2 utilizando un activador farmacológico, Alda-1

Capítulo 1

Expresión de ALDH2 en cerebro y el consumo voluntario de EtOH en respuesta a cianamida en un modelo de ratas Wistar expuestas perinatalmente a Pb

Expresión de ALDH2 en cerebro y el consumo voluntario de EtOH en respuesta a cianamida en un modelo de ratas Wistar expuestas perinatalmente a Pb

Consumo de etanol

Evidencias provenientes de estudios epidemiológicos indican que la edad en que se inicia el consumo de EtOH es un poderoso predictor de una futura dependencia a esta droga (Grant y cols, 2001; Pautassi y cols, 2020). Además, se ha demostrado que el inicio temprano del consumo está estrechamente relacionado con el desarrollo de AUDs y dependencia (Hingson y cols, 2006). Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019 evidencia que, el 43% de la población mundial de 15 años de edad o más consumen alcohol regularmente. En estudios epidemiológicos realizados por SEDRONAR en una población de estudiantes de nivel secundario (con un total de 1588 personas encuestadas) se les consultó acerca de los hábitos de consumo de alcohol, utilizando como indicador de consumo en exceso la ingesta en una misma ocasión de 2 litros de cerveza o más, 750 ml de vino o más, y/o cuatro medidas o más de bebidas fuertes/tragos combinados (todos ellos equivalentes a 5 medidas estándares de EtOH). Así, se preguntó a los estudiantes que consumieron esta droga cuántas veces en los últimos 15 días consumieron 5 tragos o más en una misma salida, a lo que el 52% contestó afirmativamente (Observatorio Argentino de Drogas. Sedronar, 2018). Resultados obtenidos por la Administración de Servicios para la Salud Mental y el Abuso de Sustancias (SAMSHA, por sus siglas en inglés) arrojan que ese patrón de consumo es utilizado por el 57% de los niños y adolescentes de 12 a 21 años en EE.UU. (SAMSHA, 2009). Esta práctica, denominada en inglés “*binge drinking*”, está definida como el consumo de un mínimo de 5 bebidas por ocasión en aproximadamente 2 horas (Instituto Nacional por el Abuso de Alcohol y Alcoholismo, NIAAA EE.UU., 2004).

El desarrollo de los AUDs en humanos es un proceso que progresa desde el primer contacto con la bebida (refuerzo inicial) hasta la etapa crónica o compulsiva de ingesta (Spanagel, 2009). En modelos animales, estas etapas se pueden asociar

respectivamente con la fase de adquisición de la ingesta de EtOH y con una segunda fase posterior de mantenimiento del consumo crónico de la droga (Bell y cols, 2017).

Durante la etapa inicial de experimentación, el individuo percibe los efectos gratificantes, eufóricos y de refuerzo positivo del consumo excesivo de EtOH y los aumentos agudos de la motricidad, como el comportamiento social desinhibido, y respuestas del sistema nervioso autónomo, como la frecuencia cardíaca. El alto nivel de consumo de bebidas alcohólicas observado en los adolescentes se ha relacionado, en parte, con su sensibilidad particular hacia los efectos gratificantes y aversivos del EtOH promoviendo así la ingesta excesiva (Alaux-Cantin y cols, 2013). Al respecto, estudios en animales y en humanos han informado que los adolescentes son más sensibles a los efectos reforzantes positivos del EtOH, como los efectos subjetivos apetitivos, reforzantes del consumo y a la facilitación social inducida por la droga, y muestran una menor sensibilidad a sus efectos negativos tales como incoordinación motora, sedación e inducción del sueño o resaca (Varlinskaya & Spear, 2009).

A este respecto, cabe destacar que la adolescencia es una etapa crítica de la maduración neural, en la que el cerebro sufre una extensa remodelación sináptica (Giedd, 2008), lo que podría explicar en parte la sensibilidad diferencial de los adolescentes a los efectos aversivos y gratificantes del alcohol. El sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico, (esquemático en la **Figura 8**) experimenta un importante refinamiento sináptico durante adolescencia (Guerra & Pascual, 2010). Este sistema se ha postulado como una de las principales redes neuronales que median los efectos gratificantes o reforzantes de las drogas de abuso (Koob, 2014), y muestra una sensibilidad diferencial a las neuroadaptaciones inducidas por EtOH en adolescentes en comparación con adultos. Otra contribución importante a la sensibilidad al EtOH típicas de los adolescentes está indudablemente relacionada con los cambios de desarrollo que ocurren en aquellos sustratos neurales subyacentes a los efectos del EtOH. Hay evidencias que los sistemas glutamatérgico, gamma-amino-butírico (GABA), dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico y opioide, que experimentan un amplio y marcado desarrollo durante la adolescencia se encuentran alterados (Spear, 2014). Es posible que ciertas manifestaciones típicas de sensibilidad a los efectos gratificantes y aversivos del EtOH, en adolescentes, puedan reflejar el desarrollo de

neuroadaptaciones en las proyecciones de DA a áreas como el NAc, CPF y amígdala, que influyen en la respuesta a una amplia variedad de drogas y recompensas naturales (Robinson y cols, 2011).

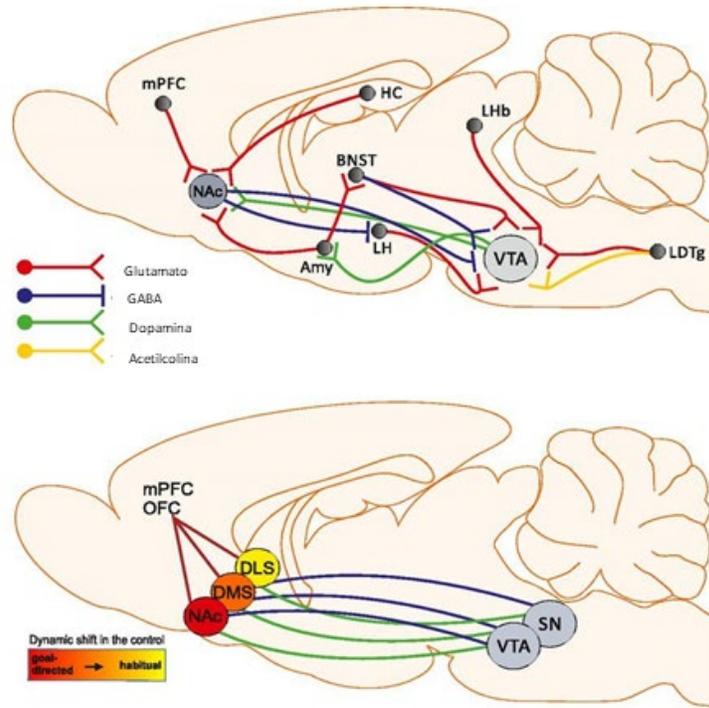


Figura 8. Áreas cerebrales involucradas en el circuito de recompensa y sus conexiones y proyecciones. En colores se indican los diferentes neurotransmisores involucrados y sus proyecciones. Regiones del cerebro de mayor importancia para los efectos adictivos de las drogas de abuso. El dibujo superior muestra los circuitos que participan en el comportamiento gratificante de búsqueda de drogas. El dibujo inferior ilustra el papel del mesencéfalo-estriado y bucles corticales en el consumo de drogas. Amy, amígdala; CeA, núcleo central de la amígdala; DLS, cuerpo estriado dorsolateral; DMS, estriado dorsomedial; HC, hipocampo; LC, locus ceruleus; LDTg, núcleo tegmental laterodorsal; LH, hipotálamo lateral; LHb, habénula lateral; mPFC, corteza prefrontal medial; NAc, núcleo accumbens; OFC, corteza orbitofrontal; rmTg, núcleo tegmental rostromedular; SN, sustancia negra; ATV, área tegmental ventral. Modificada de Korpi y cols, 2015.

Rol dual de ACD como primer metabolito del EtOH

El ACD es un metabolito activo que induce una variedad de efectos tóxicos, farmacológicos y comportamentales. Sin embargo, el rol de ACD en los efectos del EtOH, especialmente sus efectos centrales, ha sido controvertido durante más de dos décadas (Deitrich, 2004; Quertemont & Tambour, 2004). Algunos investigadores sostienen que ACD es un mediador clave y, según la versión más radical de esta teoría, el EtOH sería un mero pro-fármaco cuyos efectos están totalmente mediados por su primer metabolito. Incluso se ha sugerido que en lugar de “alcoholismo”, el término “acetaldehidismo” sería más apropiado para describir el abuso y la adicción al alcohol (Raskin, 1975). Por el contrario, otros científicos niegan cualquier papel significativo del ACD en los efectos farmacológicos de la droga. Estos investigadores generalmente sostienen que luego de una ingesta estándar de EtOH, las concentraciones de ACD en la sangre y el cerebro son demasiado bajas para inducir efectos farmacológicos o conductuales significativos. También sugieren que, tanto ACD como sus aductos, poseen una vida media demasiado corta y que serían necesarias dosis extremadamente altas de EtOH para generar concentraciones de ACD farmacológicamente relevantes en cerebro. De hecho, ACD se encuentra en el cerebro sólo si es administrado de forma exógena y alcanzando concentraciones en sangre mayores a 100 μM (Tabakoff y cols, 1976).

A pesar de estas teorías polarizadas, una perspectiva intermedia es tomada por muchos autores, que sostienen que tanto EtOH como ACD tienen un rol en los efectos evidenciados a nivel comportamental y neurobiológicos, y que ambos podrían actuar de manera sinérgica, estableciendo que las propiedades farmacológicas del ACD modulan (en lugar de mediar) algunos, pero no todos, los efectos del EtOH. (Quertemont y cols, 2006, **Figura 9**).

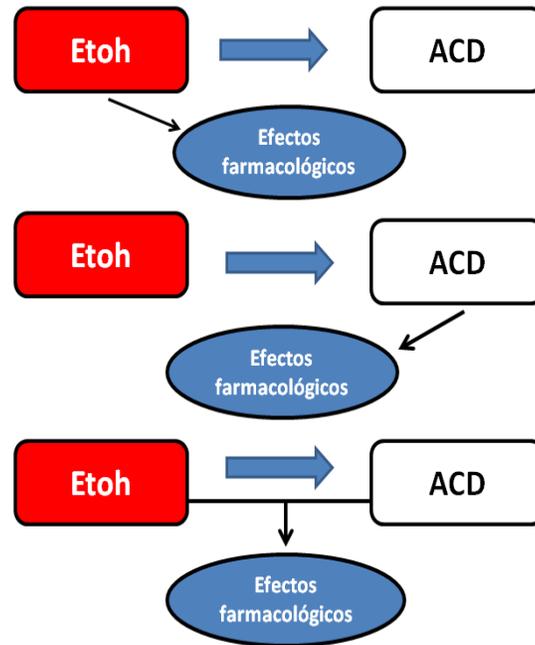


Figura 9. Rol de ACD en los efectos farmacológicos de EtOH. Las flechas azules indican el sentido de la reacción de oxidación de EtOH a ACD. Las flechas y conectores negros indican la participación de EtOH, ACD o ambos en los efectos farmacológicos observados luego de la ingesta de EtOH. Adaptado de Quertemont, 2006.

Al respecto, Isse y cols (2005), mediante la generación de ratones transgénicos para ALDH2 lograron obtener como resultado de la manipulación, animales que carecen de ALDH2 activa en el hígado y, por lo tanto, eliminan el ACD a una velocidad muy baja. Al igual que los humanos portadores del alelo ALDH2*2 deficiente, estos ratones mostraron concentraciones de ACD en sangre más altas que sus controles después de la administración de EtOH. También mostraron los síntomas típicos de la reacción de sensibilidad al EtOH, como enrojecimiento de la piel. Además, los ratones ALDH2 -/- evitaron el consumo voluntario de EtOH, lo que confirma que los niveles altos de ACD en sangre inducen efectos adversos que previenen el consumo de EtOH. Estos hallazgos sugieren que el ACD puede contribuir a los efectos aversivos de las dosis altas de EtOH (Isse y cols, 2005).

En base a estas consideraciones se abordó el estudio del rol controversial del ACD mediante la manipulación farmacológica de las enzimas que forman parte del

metabolismo del EtOH. Como se ha mencionado anteriormente, CAT tiene un rol principal en la producción de ACD en el cerebro, y hay evidencia que sugiere que el metabolismo cerebral del EtOH por la acción de CAT, es importante para la manifestación de las primeras etapas de refuerzo positivo del consumo de EtOH (Israel y cols, 2017). Al respecto, en un estudio realizado en ratas de la cepa UChB, caracterizadas por su alta preferencia de EtOH, se administró en ATV un vector lentiviral que codifica un ARNhc anti-catalasa (precursor de ARNi), y estos animales mostraron una marcada reducción de la ingesta de EtOH y se evidenció una inhibición en el aumento de la liberación de DA inducida por EtOH en NAc (Karahanian y cols, 2011). Se puede concluir entonces que los niveles de ACD en cerebro están directamente relacionados con las propiedades reforzantes de EtOH y estos dependen de su generación a partir de CAT, pero también de su degradación mediante la ALDH2 (Zimatkin y cols, 2006).

Dado que la Km para ACD es del orden de 1,0 μM (Hassinen y cols, 1974), concentraciones muy bajas de ACD podrían inhibir el metabolismo ejercido por ALDH2 sobre los aldehídos biogénicos, como 5-hidroxiindoleacetaldehído (producto aldehídico resultante del metabolismo de serotonina), DOPAL, 4-HNE y MDA. Se ha sugerido entonces, que la ALDH2 cerebral puede funcionar como una barrera metabólica para prevenir la acumulación de ACD, manteniendo sus concentraciones a niveles bajos, evitando así la formación de aductos con proteínas, el daño al ADN, la generación de productos de condensación y la mencionada inhibición del metabolismo de aldehídos biogénicos producto de la toxicidad de ACD.

Sobre esta base, una segunda estrategia experimental que se ha utilizado ampliamente para evidenciar la contribución del ACD a los efectos del EtOH se fundamenta en manipulaciones de la enzima ALDH2.

Estudios realizados por Karahanian y cols, en 2015 evidenciaron, mediante la administración en ATV de un vector lentiviral que codifica para ALDH2, una reducción de un 85–90% en la adquisición de la conducta de consumo voluntario de EtOH en ratas de la cepa UChB. Esta misma estrategia logró evitar el efecto de recaída en el consumo en ratas que previamente habían consumido EtOH crónicamente durante 81 días y se encontraban deprivadas de la droga. En este caso, al volver a acceder al EtOH, los

animales tratados con el vector de control consumieron cantidades altamente tóxicas de EtOH alcanzando ingestas de 2,7 g de EtOH/kg de peso corporal en 1 h. En cambio, aquellos animales que fueron administrados con el vector codificante de ALDH2 redujeron el consumo excesivo de alcohol en un 75-80% (Karahanian y cols, 2015).

A este respecto, con fines terapéuticos, se utilizan diferentes inhibidores farmacológicos de ALDH2 para causar una acumulación masiva de ACD después del consumo de EtOH, ya que como se ha mencionado anteriormente, el ACD que se genera a partir del metabolismo de EtOH en hígado (periferia) ha demostrado generar efectos contrarios a los que se evidencian con la acumulación que se genera por el metabolismo cerebral. Este efecto disuasorio del consumo es una de las estrategias de las terapéuticas actuales contra los AUDs (Zindel y cols, 2013). Entre los fármacos principales inhibidores de ALDH2 que se utilizan se encuentran DIS y cianamida (CIAN).

DIS (tetraetiltioperoxidicarbónil diamida) comercialmente conocido como Antabuse® y Disulfix® se ha utilizado desde 1948 como agente aversivo al EtOH en el tratamiento de alcoholismo (Bell & Smith, 1949). El consumo de EtOH por pacientes que recibieron dosis terapéuticas de DIS da lugar a la acumulación de ACD con la consecuente expresión del síndrome de sensibilidad al EtOH. Estos síntomas, denominados colectivamente reacción de DIS-EtOH (Pettersson & Tottmar, 1978; Marcato y cols, 2011), son utilizados como estrategia por la cual se desalienta al individuo de consumir EtOH. En cuanto a su mecanismo de acción, DIS inhibe ALDH1A1 de forma más potente que a la ALDH2, lo que llevó a alguna confusión temprana en cuanto a la identidad de la enzima inhibida *in vivo*. Esto se atribuye al hecho de que el túnel hidrofóbico en la arquitectura de la enzima por donde ingresa el sustrato es mayor en ALDH1 y, por lo tanto, capaz de interaccionar de una manera más eficaz con DIS (Moore y cols, 1998). Sin embargo, el mecanismo molecular de la inhibición de ALDH2 está mediado por productos metabólicos del DIS: dietilditiocarbamato (DDTC), un inhibidor de ALDH *in vivo*, pero no *in vitro* (Lipsky y cols, 2001). El DDTC es convertido por tiolmetiltransferasas hepáticas a S-metil-N, N-dietilditiocarbamato (DETC) y S-metil-N, N dietilditiocarbamato (Me-DDTC), ambos potentes inhibidores de ALDH2 mitocondrial *in vivo*. La inhibición inducida por todos estos compuestos sobre

la ALDH2 es de naturaleza irreversible debido a carbamilación del residuo catalítico Cys302; (Shen y cols, 2001). A causa de la mencionada afinidad de Pb por los grupos tioles, la utilización de DIS en combinación con la exposición perinatal a Pb ocasionaría una posible inhibición de la acción de los metabolitos de DIS sobre la actividad de ALDH2, debido a la interacción de los compuestos tiocarbamatos con Pb. Por esta razón, en el presente trabajo de tesis se utilizó CIAN para evidenciar el rol de ALDH2 y la acumulación de ACD en el consumo voluntario de EtOH, en un modelo de ratas expuestas perinatalmente a bajas dosis de Pb.

Cianamida

CIAN, también denominada carbamida cálcica o por sus nombres comerciales conocida como Temposil® y Abstem®, es una droga que se utiliza en el tratamiento del alcoholismo en Europa, Canadá y Japón, sin embargo, es un fármaco de segunda línea en relación con el DIS debido a su mayor capacidad para inducir daño hepático en comparación con DIS (Kondo y cols, 2013; Tamai y cols, 2000). Produce el incremento de las concentraciones de ACD en sangre mediante la inhibición de la enzima ALDH2, emulando el ya mencionado síndrome de *flushing*, lo que disuade al paciente de consumir EtOH (Marchner & Tottmar, 1976). Al igual que con DIS, su administración se asocia a diferentes síntomas como náuseas, vómitos, taquicardia, mareos, sudoración profusa, enrojecimiento facial, visión borrosa, dolor de cabeza, hipotensión ortostática y dificultades respiratorias (Koppaka y cols, 2012).

Los estudios farmacocinéticos sugieren que en un primer momento la inhibición enzimática llevada a cabo por esta droga es rápida, aproximadamente 1 h (Obach y cols, 1986), siendo la vida media del compuesto de alrededor de 2 h (Pruñonosa y cols, 1986) permaneciendo en el plasma al menos durante 8 h, mientras que la duración de su acción es de aproximadamente unas 24 h (Brien y cols, 1978).

Para ejercer su inhibición, este compuesto parece requerir una previa bioactivación, ya que numerosas evidencias indicarían que CIAN por sí misma no ejercería su efecto inhibitor, sino que lo haría a través de sus metabolitos. La N-hidroxicianamida sería uno de los productos intermediarios de la oxidación de CIAN,

que al descomponerse de manera espontánea en cianuro y nitroxil (Shirota y cols, 1987), produce la inhibición de la actividad de ALDH2 a través del derivado nitroxil. La identificación de este compuesto como inhibidor de ALDH2 proporcionó evidencias acerca del potencial terapéutico de esta clase de moléculas como agentes alternativos para el tratamiento del alcoholismo, promoviendo el desarrollo de pro-fármacos de nitroxil, que serían bioactivados por la actividad estearasa de ALDH2 (Fukuto y cols, 1994; Vasiliou y cols, 2018). Al respecto, se ha demostrado que la inhibición causada por este metabolito se puede producir mediante dos mecanismos diferentes, uno derivando en una inhibición irreversible a un pH 7,0 y otro proporcionando una inhibición reversible, que es predominante en los tejidos vivos y se genera a un pH 8,5 (De Master y cols, 1998; Koppaka y cols, 2012).

Aunque algunos autores concluyen que no es necesaria la conversión de CIAN en un metabolito que ejerza un efecto inhibitorio sobre la ALDH2 (Pruñonosa y cols, 1989), la mayoría de los estudios señalan que esta droga ejerce un efecto inhibitorio sobre la ALDH2 hepática y cerebral, que estaría mediado por el sistema enzimático de CAT, el cual posibilitaría la transformación de la CIAN (**Figura 10**) (Hellstrom y Tottmar, 1982; DeMaster y cols, 1982; Shrota y cols, 1982a; Cederbaum y Dicker, 1985).

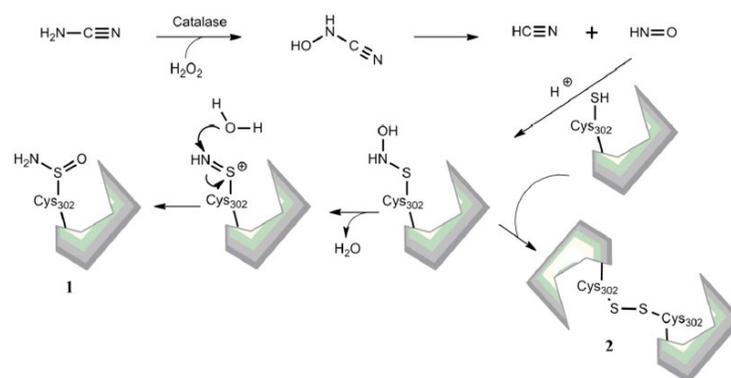


Figura 10. Mecanismo de acción inhibitoria de CIAN sobre ALDH2. Se observa la bioactivación de CIAN para producir el metabolito activo nitroxil, que puede inhibir de manera irreversible (1) o reversible a la enzima (2). Extraída de Koppaka y cols, 2012.

Si bien ninguna dosis es capaz de producir en ambas una inhibición completa, la ALDH2 cerebral es menos sensible a los inhibidores, habiéndose descripto aproximadamente un 60% de inhibición para la ALDH hepática y un 40% de inhibición para la ALDH cerebral (Marchner y Tottmar, 1978). En cerebro, se ha demostrado que CIAN es capaz de inhibir la ALDH de baja Km en la fracción mitocondrial, es decir, ALDH2 (Cederbaum, 1981).

En cuanto a los niveles de ACD, se ha comprobado que CIAN induce un incremento considerable del mismo en sangre (Brien y cols, 1978). Podría inferirse entonces que la inhibición de ALDH2 cerebral mediante la administración de CIAN conducirá a la acumulación de altas concentraciones de ACD, que difieren considerablemente de los niveles producidos endógenamente a partir de CAT en condiciones fisiológicas normales. En base a estos antecedentes y utilizando esta estrategia experimental, se anticipa una acumulación de ACD en cerebro por inhibición de su metabolismo mediante la microinyección *in situ* de CIAN. De esta manera se pondrá en evidencia el rol de ACD en los efectos motivacionales de EtOH en los animales expuestos a Pb.

Desde el punto de vista experimental esto cobra relevancia por lo expuesto anteriormente referido a los polimorfismos enzimáticos de ALDH2, debido a que este estudio podría modelar las condiciones metabólicas de individuos que portan alelos mutados e inactivos de ALDH2.

Sobre la base de estos antecedentes, en este objetivo se evaluó el rol de ALDH2 en el consumo voluntario de EtOH, en ratas expuestas perinatalmente a bajas dosis de Pb. Se postula que ALDH2 podría tener una expresión disminuida en áreas del circuito mesocórtico-límbico (CPF, NAc y Estriado dorsal) de estos animales, lo que podría correlacionarse con los niveles de consumo de EtOH. La manipulación farmacológica utilizando CIAN como inhibidor de ALDH2 evidenciaría el rol crítico de esta enzima como determinante del consumo de EtOH y de la acumulación de ACD en cerebro.

Materiales y métodos

Esquema de Exposición perinatal a bajas dosis de Plomo

A pesar de sus limitaciones, la administración de Pb en forma oral a la madre gestante y/o lactante es el modelo animal más frecuentemente usado para evaluar las consecuencias resultantes de la exposición crónica a bajos niveles de Pb durante el desarrollo. Así, en los modelos experimentales que se inician con exposiciones *in útero* y que finalizan con el destete posterior a la lactancia (como es el modelo utilizado en este trabajo de tesis), se abarca la mayor parte del desarrollo neuronal, desde los procesos subyacentes de neuro y sinaptogénesis hasta la estructuración sináptica final (Virgolini y cols, 1999).

Para llevar a cabo este objetivo fueron utilizadas ratas de la cepa Wistar macho de 35 y 63 días de edad, nacidas y criadas en el bioterio del Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Todos los procedimientos y manipulaciones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas por la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH-National Institute of Health) de Estados Unidos. El protocolo experimental cuenta con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Protocolo HCD FCQ-UNC 564/15) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados.

Brevemente, ratas hembras adultas fueron divididas en un grupo control (grupo C) que recibió agua corriente filtrada como única fuente de líquido y un grupo Pb (grupo Pb), que recibió una solución de 220 ppm de Pb en el agua de bebida (0,4 g/L de Acetato de Pb, Biopack, Argentina). Durante este período de exposición a Pb los animales tuvieron acceso ilimitado tanto a la bebida como a la comida y fueron mantenidos en condiciones de temperatura (22°C) y humedad constante respetando un ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad. Para el proceso de apareamiento, hembras adultas (250-300 g) fueron colocadas en cajas con machos en una relación 2/1 durante 2-3 ciclos estrales (aprox. 10 días). Los machos fueron retirados y las hembras pesadas y observadas

desde el inicio de la preñez hasta determinar el momento del nacimiento de las crías que fue considerado como el día postnatal (DPN1). Dentro de las 48 h de producido el alumbramiento se procedió a limitar a un máximo de 8 animales por camada, manteniendo la mayor cantidad posible de machos y conservando siempre al menos una hembra. El destete se realizó el día postnatal 25 (DPN25), y los machos fueron hospedados en grupos en cajas, siendo la solución de Pb reemplazada por agua corriente filtrada, dando fin a la exposición a Pb. El esquema del protocolo utilizado puede observarse en la **Figura 11**.

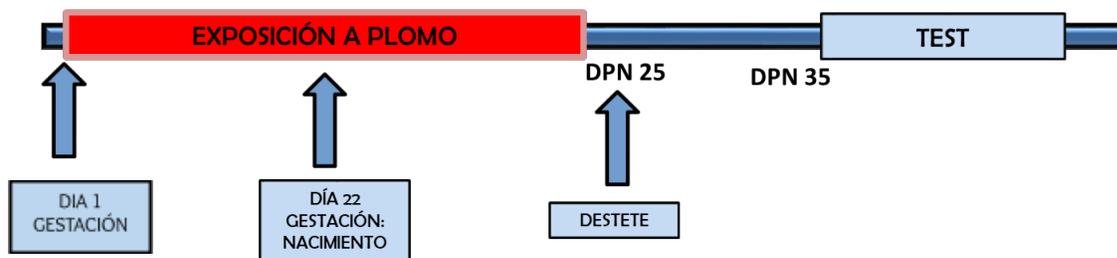


Figura 11. Protocolo de exposición perinatal a 220 ppm de Pb. Se ilustra la línea temporal del período de exposición a Pb, que abarca desde la gestación hasta el destete al DPN25, donde cesa la exposición.

Durante el establecimiento del modelo experimental, en el período en el cual los animales estuvieron expuestos a Pb, se registró en las madres la ingesta de fluidos (agua corriente filtrada o Pb), la ganancia de peso durante la gestación y la duración de la gestación. En las crías, se determinó el tamaño de cada camada, la proporción de crías hembras y machos y el peso de estas crías durante el período de tratamiento perinatal. Al respecto, no se evidencian diferencias significativas en la ingesta de fluidos ni en los parámetros referidos a la gestación y nacimiento de las crías por el tratamiento con Pb, como la duración del período gestacional, el número de animales por camada, la ganancia de peso de las crías y su posterior crecimiento. Los niveles alcanzados de Pb en sangre fueron de 6,51 $\mu\text{g}/\text{dl}$ a los 35 días (inicio del esquema de consumo) comparados con niveles menores a 0,75 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en el grupo control, siendo indetectables en ambos grupos a los 63 días (fin de los experimentos), respondiendo a la toxicocinética y dinámica del metal, que luego de circular unido a los eritrocitos se distribuye a tejidos blandos y en última instancia en un depósito dinámico en tejidos duros (Mattalloni y cols, 2013).

Consumo voluntario de etanol

Esta prueba involucra un paradigma de libre elección entre EtOH y agua, y es ampliamente usada para estudiar las propiedades motivacionales de EtOH en animales de laboratorio, con validez aparente en seres humanos. En estos esquemas el animal es capaz de decidir la cantidad de EtOH que va a consumir en un determinado período de tiempo (Hungund y cols, 2003; Little, 1991).

De acuerdo con antecedentes de nuestro grupo de investigación en este trabajo de tesis se escogió como paradigma conductual el consumo voluntario de EtOH de libre elección EtOH/agua durante 2 h diarias. (Mattalloni y cols, 2013 y 2017). El protocolo consiste en presentarle al animal diariamente dos probetas, una con agua filtrada y otra con una solución de EtOH, preparada diariamente a partir de EtOH 96% tridestilado apto para consumo (Porta Hnos., Argentina) y registrar el volumen consumido de cada botella para calcular el índice de preferencia, basado en la proporción de EtOH consumido en relación a la ingesta total. La limitación del consumo a 2h por día pretende inducir en estos animales una conducta de ingesta de EtOH compulsiva denominada en inglés "*binge drinking*" que, como se mencionó anteriormente, reproduciría con mayor realismo los patrones de consumo de los adolescentes. Una consideración importante a tener en cuenta en los modelos de consumo voluntario de EtOH, es que los roedores presentan aversión a las propiedades organolépticas del EtOH y, además, cuando la concentración de EtOH alcanza valores superiores al 10% v/v puede producirse una acumulación periférica de ACD generando aversión por su consumo. La alternativa elegida a este respecto fue aumentar progresivamente cada 4 días la concentración de EtOH ofrecida a los animales (**Figura 12**) y, a su vez, se tuvo la precaución de alternar todos los días la posición de las probetas para evitar el condicionamiento a un lugar que podría influenciar la preferencia de los animales.

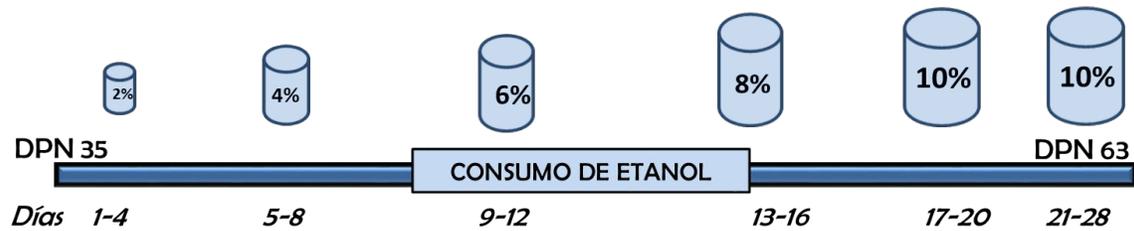


Figura 12. Línea temporal del consumo voluntario de etanol utilizado en los experimentos. Se esquematizan los porcentajes de EtOH utilizados (2-10%) en bloques de 4 días consecutivos.

Para llevar a cabo el procedimiento, un grupo de animales de 35 días de edad fue pesado, alojado en pares (para evitar el efecto estresor del aislamiento) y restringido al acceso de líquido durante las 24 h previas al inicio del esquema de consumo voluntario, para habitar a los animales a un consumo diario limitado de bebida. La elección del inicio del esquema durante la adolescencia, un período que comienza con el destete de las ratas (usualmente en el DPN 21) y se extiende aproximadamente hasta el DPN 45-50, se basa en resultados previos, así como en evidencias experimentales que indican que cepas de ratas que naturalmente prefieren el EtOH e inician el consumo en la adolescencia, lo cual condiciona efectos a largo plazo manifestados como mayor autoadministración y mayor recaída en el consumo abusivo de la droga (Rodd y cols, 2005). De acuerdo a estas consideraciones, el protocolo consistió en la presentación durante 2 h diarias (de 13:00-15:00 h) de 4 probetas graduadas conteniendo 2 de ellas agua y otras dos una solución de EtOH en concentraciones crecientes de acuerdo al siguiente esquema (expresado en v/v): días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días 13-16: 8%; días 17-28: 10% de EtOH (**Figura 12**). Las soluciones de EtOH se prepararon diariamente a partir de un stock de 96% de EtOH tridestilado (Porta Hnos., Córdoba, Argentina). La ingesta de EtOH y de agua se registró diariamente y se expresó como gramos de EtOH por kilogramo de peso corporal, para lo cual los animales fueron pesados cada 4 días registrándose el aumento de peso correspondiente. Una vez que la ingesta se estabilizó el consumo de EtOH al 10% (día 20-21), los animales fueron anestesiados y sometidos a cirugía, tal como se explica a continuación. Cabe destacar que el día de la implantación de las cánulas los animales vieron interrumpido su

esquema normal de consumo, con el objetivo de facilitar su recuperación, por lo que tuvieron un acceso ilimitado únicamente a agua durante 24-48 h.

Administración intracerebroventricular (i.c.v.) de cianamida

Cirugía estereotáxica

Para realizar las cirugías los animales fueron inyectados con una mezcla de ketamina/xilacina en dosis de 55 mg/Kg y 11 mg/Kg, respectivamente administrada vía i.p. Una vez que se constató que estuvieran correctamente anestesiados, los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL, USA), con la barra dental incisiva ubicada a -3,3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo fue expuesto cortando la piel del animal y liberando las meninges. Los orificios fueron realizados con un torno de uso odontológico, para poder implantar las cánulas guías y tornillos que fueron fijados con cemento de uso dental. Las cánulas guías de acero inoxidable (de 10 mm de largo, fabricadas a partir de agujas de 22G) fueron implantadas unilateralmente del lado derecho a 2mm, por encima del sitio seleccionado para la microinfusión. Las coordenadas utilizadas: AP -0.92, ML-1.5 y DV -3.6; fueron elegidas para alcanzar el espacio ventricular de acuerdo al atlas Paxinos y Watson (2009), considerando como referencia al bregma. Para disminuir el riesgo de infecciones, una vez finalizadas las cirugías los animales recibieron inyecciones por vía subcutánea de una suspensión antibiótica formada por penicilina/estreptomicina (Norcilina, Laboratorios Nort, S.A, Argentina). Durante las 48 h de recuperación los animales tuvieron libre acceso a agua de bebida y alimento y, a continuación, se reanudó el esquema de consumo voluntario de EtOH al 10% (días 21-25).

Para las microinfusiones i.c.v. se preparó de manera aséptica una solución que contenía 0,3 mg de cianamida cálcica (Sigma Aldrich, Argentina) cada 2,5 µl de líquido ceforraquídeo artificial (CSF: NaCl 124, 3mM; KCl 4,9 mM; MgSO₄·7H₂O 1,3 mM; H₂KPO₄ 1,25 mM; NaHCO₃ 25, 6 mM; glucosa 10,4 mM; CaC₂·2H₂O 2,3 mM). Luego se introdujo un inyector (fabricado a partir de agujas de 30G) dentro de las cánulas guías, el cual excedió 2,5 mm desde el sitio final de la cánula hasta alcanzar el sitio de inyección

en el ventrículo lateral. Los inyectores se conectaron a una micro-jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) de 10 μ l mediante un catéter de polietileno (P10, Becton Dickinson, MD). Durante la microinfusión, se liberó un volumen de 2,5 μ l en un período de 2,5 min (flujo de infusión: 1 μ l/min), utilizando una bomba de infusión (MasterFlex pump, Modelo 77200-20). Finalizada la administración, los inyectores se mantuvieron en el sitio de inyección durante 1 min adicional para permitir la liberación completa de la solución. En la **Figura 13** puede observarse el esquema utilizado.

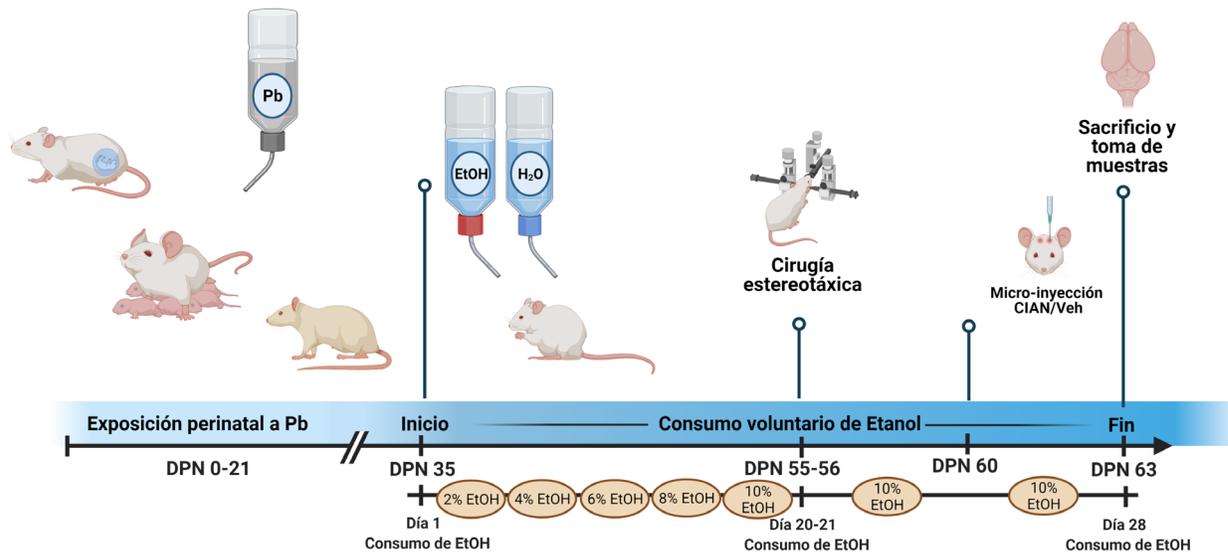


Figura 13. Esquema del modelo y diseño experimental utilizado en los experimentos del Capítulo 1. Se resume en la figura el procedimiento realizado desde el DPN 0 hasta el DPN63 en el modelo de ratas Wistar expuestas perinatalmente a Pb. En paralelo se esquematizan los detalles del consumo voluntario de EtOH.

Obtención de muestras para inmunohistoquímica: perfusión transcardíaca.

Finalizada la sesión de consumo del último día (día 28, DPN 63), los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina en dosis de 55 mg/Kg y 11 mg/Kg, respectivamente administrada vía i.p. y posteriormente perfundidos de manera transcardíaca, exponiendo la cavidad torácica y obstruyendo el flujo sanguíneo en la aorta descendente. Cada animal fue perfundido con una solución de salina/heparina (NaCl 0,9%/1000 unidades/l), lo cual permitió lavar el tejido del flujo sanguíneo circulante (aproximadamente 250 ml por animal) y luego, con una solución fijadora de

paraformaldehído al 4% buffer fosfato-salina (PBS) 0,1 M pH=7,4 (aproximadamente entre 300 y 350 ml por cada animal). Los cerebros luego fueron removidos y permanecieron en la solución de paraformaldehído al 4% durante 12 h a 4°C, para ser posteriormente transvasados a una solución de sacarosa al 30% en buffer fosfato (PB) a 4°C hasta el momento en que fueron seccionados.

Inmunohistoquímica para ALDH2

Para obtener los cortes para realizar la inmunomarcación de ALDH2, los cerebros fueron retirados de la solución de sacarosa y sometidos a una congelación rápida con aerosol congelante (Biofreez, Biopack, Argentina) y adheridos al taco del criostato (soporte) con un medio de inclusión crio-protector (Cryoplast, Biopack, Argentina). Para igualar la temperatura en todo el tejido con el medio de montaje se dejaron las muestras durante 15 a 20 min dentro del crióstato cerrado (Leica CM15105). Se realizaron secciones coronales de 30 µm de espesor, obteniéndose cortes correspondientes a CPF, NAc y Estriado dorsal utilizando como guía el atlas “The rat brain” (Paxinos y cols, 2009). Posteriormente, los cortes fueron lavados e incubados en una solución de 10% metanol, 30% de H₂O₂ en PB 0,01M por 1 h en agitación para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 0,01 M y los cortes fueron incubados por 2 h en agitación en una solución de bloqueo específico conteniendo 1% albumina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich), 0,1% Tritón X100, 10% de suero normal de caballo (NHS, Vetacord, Argentina) en PBS 0,01M. A continuación, los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4° C y en agitación suave y constante con el anticuerpo primario (mouse monoclonal anti-ALDH2, Abcam) en una dilución 1:1000, preparado en buffer de bloqueo específico. Al día siguiente, fueron lavados 3 veces durante 10 minutos e incubados 2 h a T° ambiente en agitación suave con un anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón (donkey anti-mouse biotynilated, Vector laboratorios, Burlingame, CA, USA), en una dilución 1:2000 en PBS 0,01 M, seguido por la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector ABC kit, Vector laboratorios, Burlingame, CA, USA) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante.

Como cromógeno se utilizó diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, Argentina) por 5 a 7 min, en una solución conteniendo 0,05% DAB y 0,006% de H₂O₂ en PB 0,1 M. De este modo, el producto final desarrolló una coloración marrón en presencia de marcación específica y sin coloración en los controles negativos (cortes que no fueron incubados con el anticuerpo primario). Una vez finalizado el revelado se realizaron 3 lavados con PBS 0,1 M y los cortes fueron posteriormente montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Una vez secos, fueron cubiertos con medio de montaje (DPX, Sigma Aldrich, Argentina) y cubreobjetos para su visualización en el microscopio óptico.

Cuantificación de células positivas para ALDH2

Luego del procedimiento de inmunohistoquímica, los cortes obtenidos fueron fotografiados usando microscopio de campo claro (Leica DM 4000B, Cambridge, UK) con una cámara montada (Leica DFC 300F_x) y el programa de computación LM50 (Leica) a una magnificación de 40X. Se seleccionaron 4 láminas de cada área cerebral y en cada caso se cuantificaron ambos hemisferios (8 campos visuales de cada una de las aéreas seleccionadas) y posteriormente se obtuvo un valor final promedio de estos conteos para cada unidad de experimentación de cuatro animales que fueron cuantificados por grupo experimental. Las células con marcación positiva para ALDH2 fueron identificadas y recuento de células positivas se realizó utilizando el software FIJI-ImageJ (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, NIH, EE.UU.).

Es así que los grupos experimentales que quedaron conformados para el análisis de la expresión de ALDH2 fueron los que se detallan a continuación:

- Grupo 35d (C y Pb): en el cual las crías fueron sacrificadas a los 35 días de edad (DPN 35). Este grupo revela la expresión enzimática basal de animales peri adolescentes (previo al inicio del esquema de consumo de EtOH). En este momento, además, los niveles de Pb aún son detectables en sangre (Mattalloni y cols, 2013) y se presentan en una fase dinámica de movilización a los tejidos blandos.

- Grupo 63d noEtOH Veh (C y Pb): crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo voluntario de EtOH y a las que se las sometió a *cirugía estereotáxica* para la microinfusión de *solución vehículo* durante 4 días. Estos animales fueron sacrificados a la misma edad que los animales que consumieron EtOH voluntariamente. Este grupo se usó como control de los grupos 63d que se describen a continuación.

- Grupo 63d EtOH Veh (C y Pb): crías sacrificadas al final del consumo de EtOH (DPN 63) luego de ser microinfundidos diariamente durante 4 días con *solución vehículo*. Este grupo refleja las modificaciones producidas por el consumo crónico de EtOH durante la adolescencia, cuyos niveles de Pb en sangre son indetectables, pero en los que el metal se encontraría depositado en tejidos blandos.

- Grupo 63d EtOH CIAN (C y Pb): crías sacrificadas al final del consumo de EtOH luego de realizarse la microinfusión diaria de CIAN. Este grupo refleja el efecto del bloqueo de la enzima ALDH2 sobre el consumo crónico de EtOH durante la adolescencia en animales cuyos niveles de Pb en sangre son indetectables, pero en los que el metal se encontraría depositado en tejidos blandos.

- Grupo 63d noEtOH CIAN (C y Pb): crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de EtOH, aunque sí fueron microinfundidas con CIAN siguiendo el mismo esquema de administración que los animales sometidos al paradigma de consumo. Se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron EtOH voluntariamente. Este grupo refleja los efectos de los tratamientos en la actividad de ALDH2 en animales que no han consumido EtOH.

Análisis estadístico:

El consumo de EtOH se analizó mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas, contrastando grupo (C vs Pb) y el tiempo/consumo de EtOH como la variable repetida. Una vez administrada CIAN, se realizó un ANOVA de tres vías contrastando grupo (C vs Pb), droga (Veh vs CIAN) y tiempo/consumo de EtOH.

Con respecto a la inmunohistoquímica, el análisis estadístico se efectuó en cada área por separado para facilitar su análisis e interpretación. Se analizó, por una parte,

el efecto producido por la edad posnatal sobre la expresión de la enzima ALDH2 mediante de un ANOVA de dos vías: grupo (C vs Pb) y edad/EtOH (grupos DPN35, DPN63 y DPN63 EtOH/noEtOH). Posteriormente, se aplicó un ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de la droga: grupo x consumo de EtOH x tratamiento con CIAN, seguido por la prueba de Tukey como *post-hoc*.

En todos los casos se utilizó como programa estadístico el GraphPad Prisma GraphPad Prism versión 8.04 (GraphPad Software, La Jolla California EE.UU. www.graphpad.com) para el análisis de los datos y la realización de gráficos.

Resultados

Efecto de la inhibición ALDH2 en el consumo voluntario de EtOH de ratas expuestas perinatalmente a Pb

Se registró el consumo voluntario de EtOH y se expresó como gramos de EtOH consumidos respecto al peso corporal. Como se observa en la **Figura 14**, se verificó que animales que han sido expuestos a Pb durante la etapa perinatal muestran un consumo mayor de EtOH respecto de sus controles. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas arroja diferencias entre los grupos (C vs Pb: $F_{(190)} = 21,39$; $p < 0,001$) y respecto al tiempo/concentración de EtOH: $F_{(590)} = 15,25$; $p < 0,001$, sin interacción entre ambos parámetros.

Por su parte, la administración de CIAN en el último bloque de 4 días de consumo provocó un aumento significativo en el consumo de EtOH, un efecto evidenciado en ambos grupos (C y Pb) como resultado de la inhibición de ALDH2. Esto fue apoyado estadísticamente por la diferencia significativa que emergió tanto en la comparación entre grupos: C vs Pb, $F_{(116)} = 8,29$; $p < 0,05$, en el factor droga: Veh vs CIAN $F_{(116)} = 13,32$; $p < 0,001$, y en su interacción: $F_{(116)} = 4,62$; $p < 0,05$.

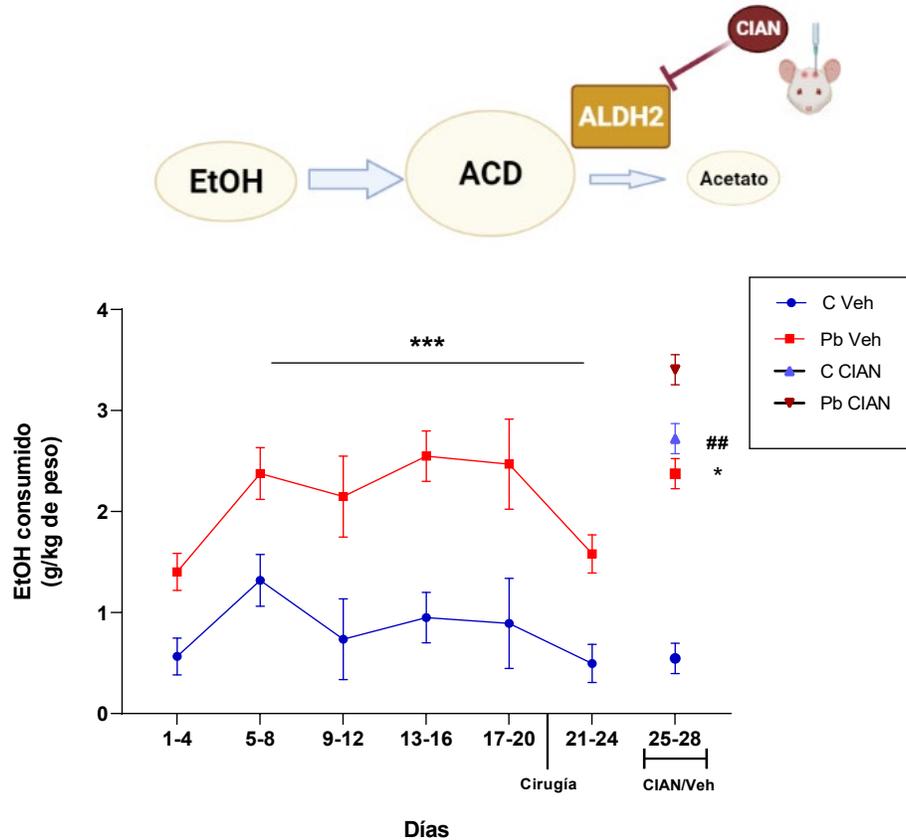


Figura 14. Consumo voluntario de EtOH. Se muestran graficados en bloques de 4 días los niveles de EtOH consumidos (expresados como g EtOH/kg de peso corporal). Los datos (media + SEM) agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, corresponden a la ingesta de EtOH en respuesta al aumento de las concentraciones de EtOH. $n = 5$ animales para cada grupo. * indica diferencias con respecto a los animales C, *** $p < 0,001$. Una vez que se administró Veh o CIAN: * indica diferencias significativas entre los animales C-Veh y Pb-Veh a * $p < 0,05$ y # indica diferencias significativas entre los animales tratados con C-Veh y C-CIAN a ## $p < 0,01$. En la parte superior se esquematiza la reacción de oxidación del EtOH, enfatizando la inhibición de ALDH2 por CIAN.

Inmunohistoquímica para ALDH2

Las **figuras 15 a 17** representan la expresión de ALDH2 en NAc, Estriado dorsal y CPF, respectivamente. En los *paneles A* se muestran los datos de animales de 35 días (35d C y Pb) con una imagen representativa mostrada en el *panel D* de cada figura. Los *paneles B* y *C* representan la expresión proteica de ALDH2 de los animales de 63 días después de la ingesta de EtOH (63d EtOH C y Pb, *panel B*) o de sus contrapartes que no

consumieron EtOH (63d NoEtOH C y Pb, *panel C*). Una imagen representativa de los grupos EtOH y noEtOH en cada condición de fármaco se muestra en los *paneles E y F*, respectivamente.

Efecto de la edad y el consumo de etanol en la expresión de ALDH2

El número de células positivas para ALDH2 por área de cada corte de tejido cerebral evaluado en cada grupo experimental se analizó por inmunohistoquímica y los resultados se evaluaron mediante ANOVA de dos y tres vías. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos al inicio del esquema de consumo de EtOH (35d C y 35d Pb) en ninguna de las 3 áreas estudiadas (*Panel A y D de las Figuras 15, 16 y 17*).

Los animales adultos expuestos a Pb y que consumieron EtOH (grupo 63d Pb EtOH Veh) mostraron un menor número de células ALDH2 positivas respecto al grupo control no expuesto a Pb (C 63d EtOH Veh), aunque la disminución no fue estadísticamente significativa. Del mismo modo, la disminución no fue significativa al comparar número de células ALDH2 positivas en los animales adultos expuestos a Pb tanto del grupo EtOH como noEtOH respecto a sus respectivos controles jóvenes (35d Pb y 35d C). Por lo tanto, los resultados evidenciaron una tendencia que no llega a ser significativa en la reducción de la expresión proteica de ALDH2 en todas las áreas estudiadas en los animales adultos expuestos a Pb en comparación con los animales más jóvenes (35 días), independientemente del consumo de EtOH.

El ANOVA de dos vías realizado en cada área por separado no mostró inicialmente un efecto significativo de las variables grupo (C vs Pb, edad/consumo de EtOH o su interacción en NAc; **Figura 15A** y barras Veh de los *paneles B y C*). Sin embargo, en Estriado dorsal (**Figura 17A** y barras Veh de los *paneles B y C*) se evidenció un efecto significativo de la variable grupo: $F(1,22) = 5,12$; $p < 0,05$; mientras que en CPF (**Figura 16A** y barras Veh de los *paneles B y C*) se observaron diferencias significativas en la interacción entre el grupo y la condición de edad/consumo de EtOH: $F(2,22) = 5,08$; $p < 0,05$.

Efecto de la administración de CIAN en la expresión de ALDH2

Los datos muestran que la administración CIAN fue capaz de reducir la expresión de ALDH2 en ambos grupos (C y Pb) independientemente de su ingesta de EtOH, particularmente en NAc, Estriado dorsal y en menor medida en CPF. Así, el ANOVA de tres vías realizado para cada área reveló que en NAc (**Figura 15, paneles B y C**) se observó una diferencia significativa de la variable grupo (C vs Pb): $F_{(1,31)} = 6,12$; $p < 0,05$, droga (Veh vs CIAN): $F_{(1,31)} = 39,70$; $p < 0,001$ y en la interacción entre ambos: $F_{(1,31)} = 5,26$; $p < 0,05$, evidenciando la reducción en la inmunomarcación para ALDH2 en NAc luego de la administración de CIAN.

En estriado dorsal (**Figura 17, paneles B y C**) diferencias significativas se hallaron en la variable grupo: $F_{(1,31)} = 16,09$; $p < 0,001$, consumo de EtOH: $F_{(1,31)} = 16,60$; $p < 0,001$ y droga: $F_{(1,31)} = 68,06$; $p < 0,001$ y también en la interacción grupo x droga: $F_{(1,31)} = 14,76$; $p < 0,001$ e ingesta de EtOH x droga: $F_{(1,31)} = 10,82$; $p < 0,01$.

En CPF (**Figura 16, paneles B y C**) se evidenciaron diferencias en el efecto de la variable droga: $F_{(1,31)} = 10,44$; $p < 0,01$, y del grupo x consumo de EtOH: $F_{(1,31)} = 14,25$; $p < 0,001$. Por tanto, no se realizó un análisis *post-hoc*, debido a la ausencia de diferencias significativas en la interacción global.

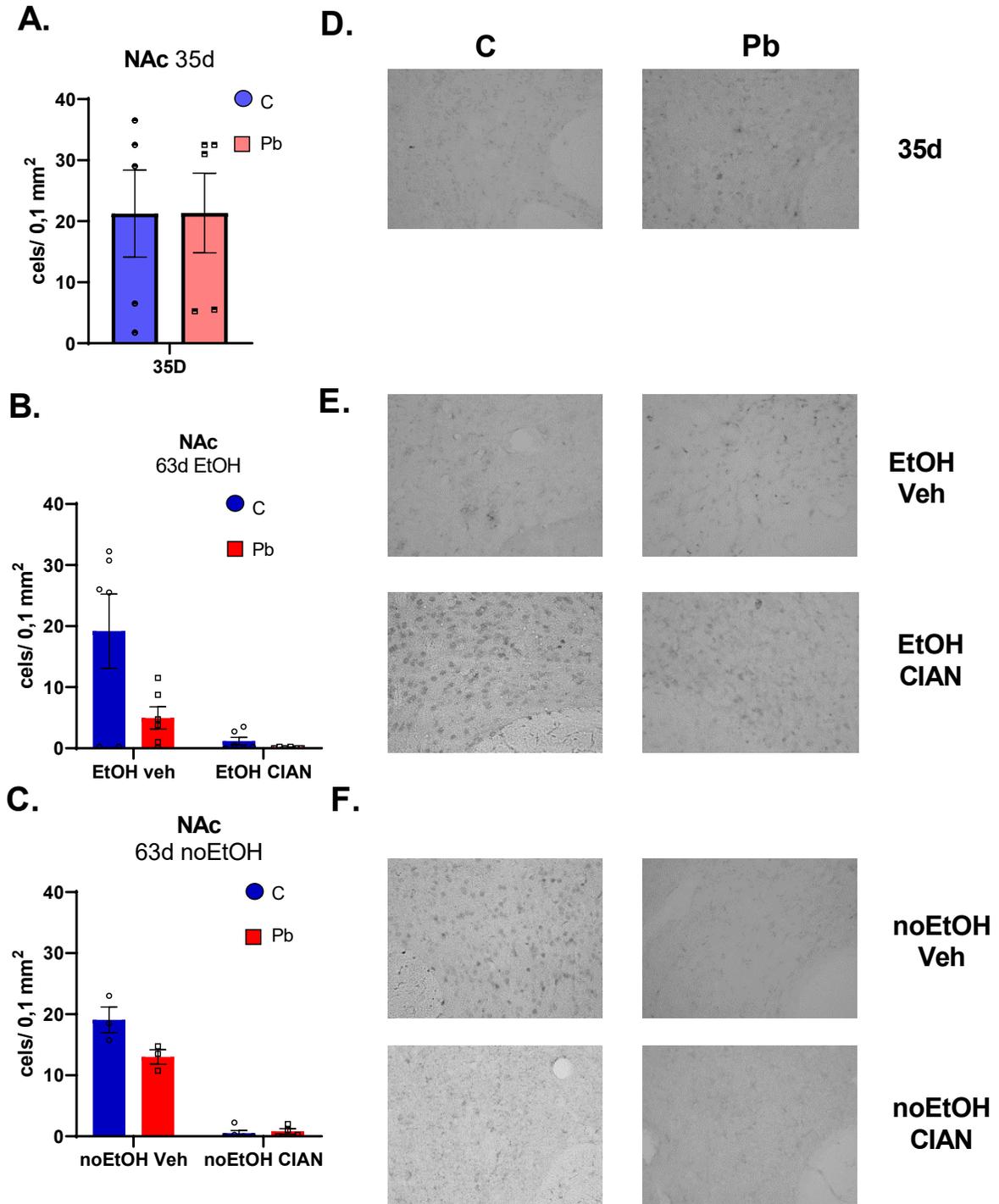


Figura 15. Inmunomarcación para ALDH2 en NAc. Paneles A, B y C corresponden a los gráficos de cuantificación de células positivas para ALDH2 en NAc. En los paneles D, E y F se muestran imágenes representativas de cada grupo experimental (40X).

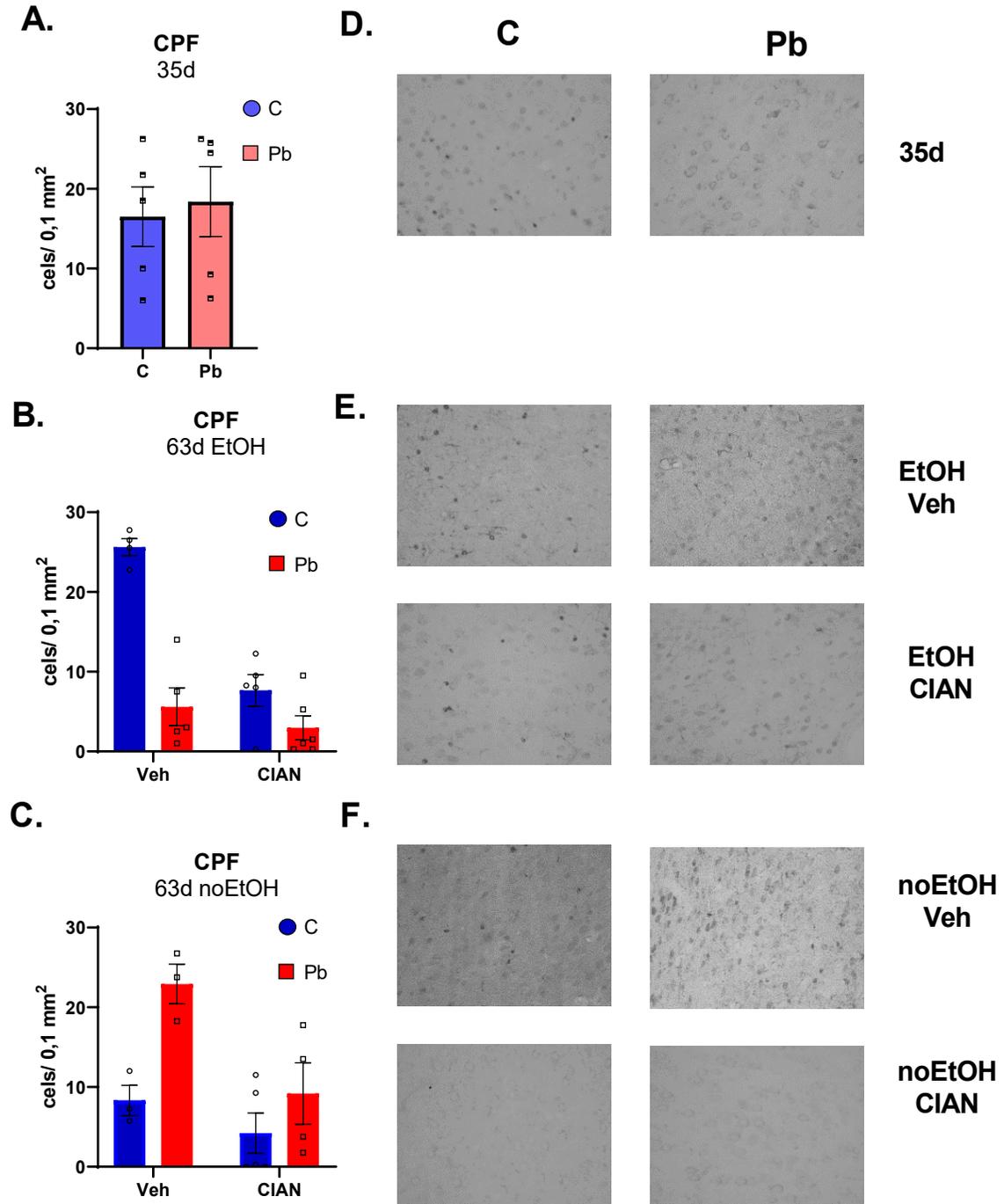


Figura 16. Inmunomarcación de ALDH2 en CPF. Paneles A, B y C corresponden a los gráficos de cuantificación de células positivas para ALDH2 en CPF. En los paneles D, E y F se muestran imágenes representativas de cada grupo experimental (40X).

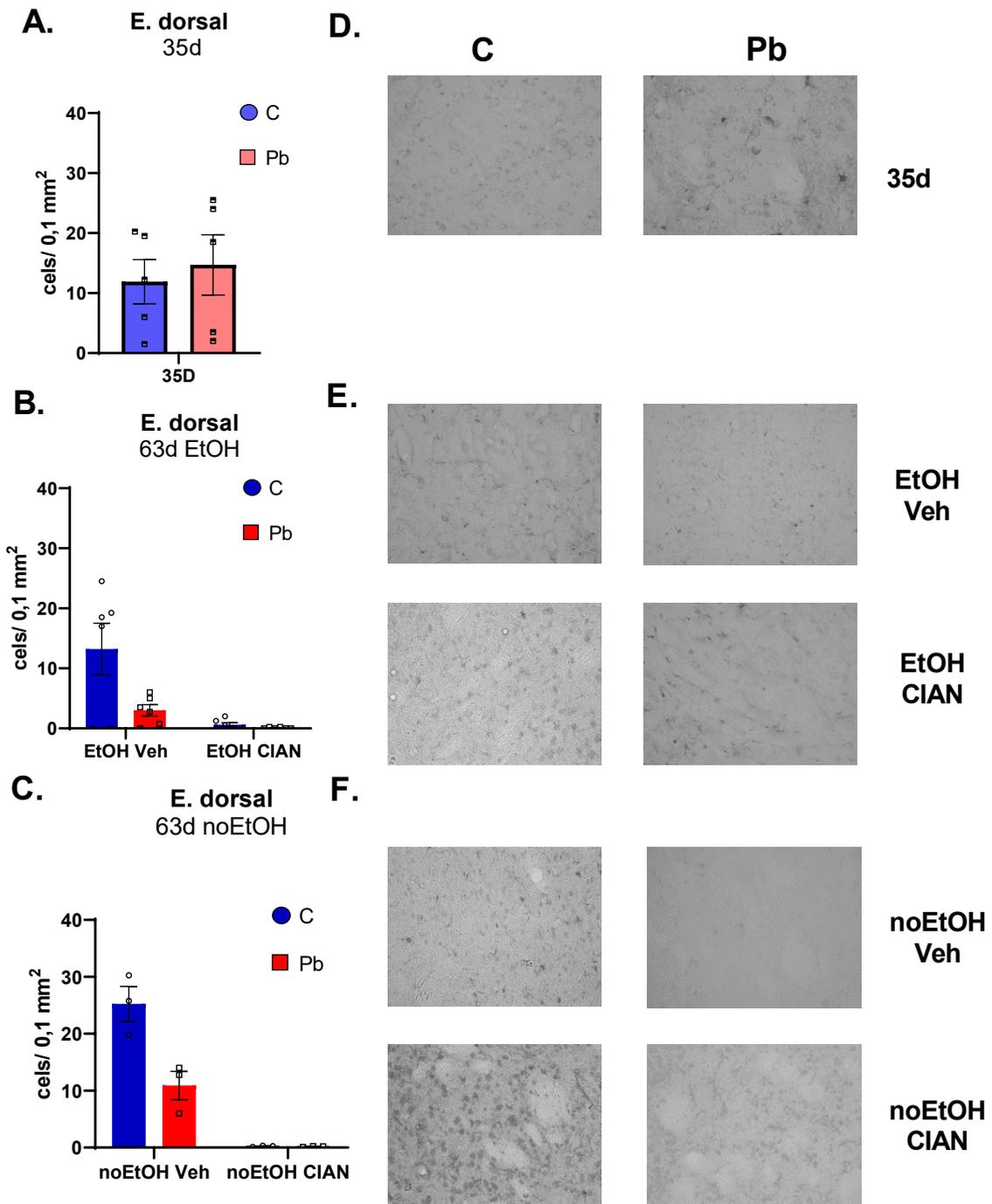


Figura 17. Inmunomarcación para ALDH2 en Estriado dorsal. Paneles A, B y C corresponden a los gráficos de cuantificación de células positivas para ALDH2 en Estriado dorsal. En los paneles D, E y F se muestran imágenes representativas de cada grupo experimental (40X).

Discusión y conclusiones parciales.

Consumo de etanol

Replicando resultados anteriores pudimos verificar que animales expuestos a Pb durante el desarrollo mostraron una aumentada ingesta de EtOH respecto del grupo C, diferencia que fue relativamente estable después de la concentración de EtOH al 6%. En contraste, los animales C demostraron una ingesta constante y menor de EtOH durante toda la duración del experimento (Mattalloni y cols, 2013, 2017).

Puede observarse que la inhibición de ALDH2 cerebral por microinyección *in situ* de CIAN, incrementa aún más el consumo de EtOH tanto en animales expuestos a Pb (que de acuerdo a lo mencionado anteriormente muestran un elevado consumo de EtOH en condiciones basales) como en animales controles. Debido a que la inhibición de ALDH2 por CIAN fue inducida directamente en el cerebro, este comportamiento podría explicarse basándose en un desequilibrio hacia la prevalencia de los efectos reforzantes de ACD cerebral por su acumulación *in situ* frente a la acumulación periférica de ACD relacionada con efectos aversivos. Esto podría desempeñar un papel clave en la respuesta motivacional diferencial al EtOH evidenciada en animales expuestos a Pb, puesto que hemos propuesto que la exposición a este metal en etapas tempranas del desarrollo promovería una mayor vulnerabilidad a la adquisición de un consumo excesivo de EtOH. Los actuales resultados son consistentes y cuentan con sustento experimental en base a resultados previos de nuestro laboratorio. Al respecto, hemos demostrado que en estos animales se evidencia una mayor expresión y actividad de CAT cerebral (Mattalloni, 2013, 2017), lo que promovería el metabolismo de EtOH hacia la formación de ACD y, en combinación con la disminuida actividad y expresión proteica de ALDH2, los animales perinatalmente expuestos a Pb consumirían mayores cantidades de EtOH que sus contrapartes. Más aún, en la prueba de consumo voluntario de EtOH el fármaco aminotriazol (AT, inhibidor de CAT) revierte, mientras que el 3-NPA (ácido 3-nitropropiónico, activador de CAT) incrementa aún más la ingesta de EtOH selectivamente en los animales expuestos a bajas dosis de Pb. Estos efectos se acompañan de los cambios correspondientes en los niveles de actividad sanguíneos y

cerebrales de CAT (Mattalloni y cols, 2013), sustentando así la hipótesis que el ACD modularía en gran parte los efectos de EtOH en cerebro. A su vez, la microinyección en VTA de un sh contra el ARN de CAT clonado en un lentivirus (shRNAantiCAT) evidenció en el grupo de animales expuestos perinatalmente a Pb una disminución en el consumo voluntario de EtOH, que se mantiene en niveles elevados en animales expuestos a Pb no inyectados con el lentivirus (Mattalloni y cols, 2019).

Es importante destacar que una limitación de estos resultados es la posibilidad de que el acceso limitado de 2 h a los líquidos para su ingesta modifique la toxicocinética de EtOH y evoque una percepción rápida de los efectos farmacológicos de la droga (Pautassi y cols, 2006). Sin embargo, esto es poco probable puesto que hemos demostrado previamente que este esquema de exposición a Pb no modifica la toxicocinética de EtOH (Virgolini y cols, 1999), por lo que no explicaría las diferencias observadas entre los grupos C y los expuestos a Pb.

Otra consideración a discutir es el hecho de que el corto período de disponibilidad de líquidos puede promover el estrés por privación de consumo, particularmente en los animales expuestos a Pb. Al respecto, resultados previos de nuestro grupo y de otros autores demuestran que la exposición a este metal en animales adultos (Haider y cols, 2013) o en las etapas tempranas (Cory-Slechta y cols, 2004; Virgolini y cols, 2004; Yu y cols, 1996) elevan la corticosterona basal y desencadena una alta reactividad a eventos estresantes en comparación con los animales no expuestos a Pb. Por lo tanto, la posibilidad de que el aumento de la ingesta de EtOH observado en los animales expuestos a Pb fuera impulsado por los efectos reforzantes negativos o ansiolíticos de esta droga requiere consideración. Sin embargo, se ha reportado que los efectos reforzantes positivos prevalecen en la etapa de adquisición del consumo excesivo de drogas y que el reforzamiento negativo cobra importancia en estadios posteriores del ciclo de la adicción (Volkow y cols, 2016).

Expresión de ALDH2 en áreas cerebrales del circuito de recompensa

La presencia de ALDH2 determinada mediante inmunohistoquímica en las áreas bajo estudio ha sido reportada previamente por (Zimatkin y cols, 1989.; Zimatkin, 1991). En relación a nuestros resultados, la inmunomarcación para ALDH2 no evidenció diferencias entre las ratas expuestas a C y Pb de 35 días de edad. Sin embargo, posterior a la ingesta de EtOH la exposición a Pb disminuyó selectivamente la expresión de ALDH2 en las tres áreas bajo estudio, sugiriendo que la interacción entre Pb y EtOH reduciría no solo la actividad de ALDH2 (Mattalloni y cols, 2017), sino también su expresión proteica. Estos resultados podrían indicar que los animales expuestos a Pb durante el desarrollo experimentarían, posterior al consumo de EtOH, una mayor acumulación de ACD en cerebro respecto a los animales controles y en consecuencia haría que experimenten mayores efectos motivacionales de esta droga, con ALDH2 teniendo un rol crítico. Este efecto fue potenciado por la administración de CIAN, a consecuencia de la mayor disminución en la expresión de ALDH2 posterior a la ingesta de EtOH, lo que podría determinar un incremento aún mayor en los niveles cerebrales de ACD.

Estos cambios, en conjunto con el aumento de liberación de DA resultante del consumo excesivo de EtOH, podría promover la formación de bioproductos como el salsolinol (SAL, Melchior y Collins, 1982), derivado de la condensación no enzimática entre DA y ACD. Estudios con cepas de ratas que prefieren EtOH, demostraron que los animales se autoadministraban SAL en VTA en concentraciones micro molares (Rodd y cols, 2005) y se evidenció que la microinyección de SAL en el VTA genera preferencia asociada a un sitio en ratas (Hipólito y cols, 2011). Asimismo se ha descrito que SAL aumenta los niveles de consumo de EtOH en ratas UChB, que son llamadas “bebedoras” ya que muestran una preferencia por EtOH y un consumo elevado del mismo (Quintanilla y cols, 2014). De hecho, la microinyección directa de concentraciones micromolares de ACD en el ATV de ratas también estimula la liberación de dopamina en el NAc (Deehan y cols, 2013; Melis y cols, 2007). Los estudios en animales han demostrado que la administración de SAL en el ATV da como resultado una mayor liberación de DA en NAc (Rodd y cols, 2008) y promueve la ingesta voluntaria de EtOH

en ratas (Quintanilla y cols, 2014, 2016a), lo que sugiere que el SAL es una molécula activa involucrada en los efectos gratificantes reforzantes del ACD y EtOH. Estudios *in vitro* utilizando células recombinantes de la línea CHO-K1 que sobre-expresan sólo el receptor opioide μ humano (asociado a proteína G), detectando los niveles de segundos mensajeros que reflejan la activación de la cascada de señalización intracelular mediada por AMPc, demostraron que el SAL actúa como agonista del receptor μ -opioide, hecho que guarda relación con el uso del antagonista opioide naltrexona como alternativa terapéutica para reducir la ingesta de EtOH en humanos (Berríos-Cárcamo y cols, 2017).

En conclusión, estos resultados proporcionan mayores evidencias a la interacción entre Pb y EtOH, en este caso relacionadas al rol crítico de la enzima ALDH2 y, en consecuencia, del ACD cerebral y otros metabolitos en la vulnerabilidad de animales expuestos perinatalmente a Pb para iniciar un patrón de ingesta excesiva de EtOH. Por consiguiente, resulta de interés estudiar los eventos celulares y moleculares de esta interacción enfocándose en el rol ejercido por la enzima ALDH2. Estos aspectos serán abordados en los capítulos subsiguientes de este trabajo de tesis.

Capítulo 2

Interacción Pb-EtOH en la línea celular SH-SY5Y: determinación de la actividad y expresión proteica de ALDH2 *in vitro*.

Interacción Pb-EtOH en la línea celular SH-SY5Y: determinación de la actividad y expresión proteica de ALDH2 *in vitro*.

Con el objetivo de estudiar los eventos celulares y moleculares por los cuales la enzima ALDH2 participa en los efectos producidos por la interacción Pb-EtOH nos propusimos utilizar un modelo celular de tipo neuronal.

Interacción entre plomo y etanol en modelos *in vitro*

Como se ha reportado en la Introducción y en el Capítulo 1 de esta tesis, evidencias propias y de otros grupos de investigación han demostrado la existencia de una interacción entre la exposición a Pb y los efectos motivacionales y estimulantes de EtOH, probablemente resultantes de alteraciones en las enzimas que participan en el metabolismo de esta droga de abuso. Sobre la base de los antecedentes descriptos, el presente capítulo pretende describir los mecanismos celulares y moleculares de la interacción entre Pb y EtOH mediante estudios *in vitro* utilizando como modelo experimental una línea celular de neuroblastoma humano. A este respecto, existe una publicación en la que se han evaluado las consecuencias de la co-exposición a ambos neurotóxicos. Se ha demostrado en la línea celular de feocromocitoma de rata PC-12 que la exposición a Pb y EtOH (10 μ M y 200 mM respectivamente), durante 24 h, indujo un aumento del Ca^{2+} intracelular y aumento en la producción de EROs, con el consecuente daño por estrés oxidativo. En mitocondria, se produjo un aumento en la liberación de citocromo c, dando inicio a mecanismos de apoptosis mediados por un aumento en la expresión de caspasa 3 y 9. También fueron reportadas concentraciones disminuidas de GSH y un aumento en los niveles de MDA indicando daño por peroxidación lipídica (Kumar y cols, 2015). No se han estudiado estos efectos en otras líneas celulares que permitan elaborar conclusiones sobre los mecanismos que subyacen a los efectos neurotóxicos de Pb y EtOH, por lo que en este capítulo nos proponemos abordar los efectos de la exposición combinada a Pb y EtOH sobre la enzima ALDH2 en células de la línea SH-SY5Y.

Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Características principales.

La línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) deriva de un neuroblastoma humano. Originalmente fue obtenida una biopsia a partir de un tumor metastásico en médula ósea. Las células SH - SY5Y son una sublínea de la línea parental SK - N - SH (ATCC® HTB-11™); fueron subclonadas tres veces para finalmente ser depositadas en la ATCC® en 1970 por June L. Biedler (Biedler & Schachner, 1978). Estas células expresan una serie de proteínas e isoformas de proteínas específicas para seres humanos que no estarían intrínsecamente presentes en cultivos primarios de roedores.

En la forma indiferenciada, las células SH-SY5Y se caracterizan morfológicamente por cuerpos celulares no polarizados, similares a neuroblastos, con pocos procesos truncados. Las células tienden a crecer en grupos y pueden formar cúmulos al desarrollarse encimadas en capas, en la región central de una masa celular. Además, cabe destacar que los cultivos contienen células tanto adherentes como en suspensión. Las células SH-SY5Y indiferenciadas proliferan continuamente, expresan marcadores neuronales inmaduros, aunque carecen de marcadores neuronales maduros y se considera que las células indiferenciadas son las que más se asemejan a las neuronas catecolaminérgicas inmaduras. Tanto en estados indiferenciados como diferenciados, las células SH-SY5Y expresan varios marcadores neuronales dopaminérgicos como la enzima tirosina hidroxilasa (TH), clave para la síntesis de DA y, posteriormente, de noradrenalina y adrenalina. También expresan la enzima dopamina-B-hidroxilasa y el transportador de DA, DAT, así como los subtipos de receptor de DA 2 y 3 (D2R y D3R), lo que las convierte en un sistema *in vitro* de elección para estudios de toxicidad en neuronas dopaminérgicas.

A este respecto, existen controversias acerca de la necesidad de trabajar con células diferenciadas. Cheung y cols, en 2009, demostraron que la expresión de DAT y TH es independiente a la diferenciación por ácido retinoico en células SH-SY5Y y, a su vez, demostraron también que existen mínimos cambios en el perfil dopaminérgico de estas células al ser diferenciadas y que, en estudios de neurotoxicidad, como por ejemplo con 6-OHDA, el tratamiento con ácido retinoico no presenta beneficios por sobre las células no diferenciadas (Cheung y cols, 2009).

Esta línea celular es utilizada como modelo de los sistemas neuronales humanos y son útiles, no solo para la investigación sobre la comprensión de la función y el desarrollo del cerebro, sino también en los campos de la neurotoxicología y de las enfermedades neurológicas, que comprenden trastornos como la depresión, y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Xicoy y cols, 2017). En comparación con los modelos de cultivo primario de células humanas, presentan la ventaja del potencial proliferativo, ya que las células de líneas celulares, diferenciadas o no, pueden crecer durante más tiempo en el cultivo y no presentan limitaciones éticas asociadas al trabajo con especímenes humanos.

Por todo lo mencionado anteriormente, se seleccionó a la línea celular humana SH-SY5Y como modelo experimental para estudiar las consecuencias sobre la funcionalidad de ALDH2 resultante de la interacción entre los neurotóxicos Pb y EtOH en los siguientes objetivos de este trabajo de tesis. A continuación, se describirán los procedimientos experimentales llevados a cabo en este modelo *in vitro*.

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo y mantenimiento de células SH-SY5Y

Células de la línea SH-SY5Y pertenecientes al banco de células del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC - CIQUIBIC-CONICET fueron utilizadas en los experimentos.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Gibco) con alto contenido de glucosa (HG), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) a una concentración del 10% y con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml) como antibióticos. Se mantuvieron en un incubador termostático (Thermo Fisher Scientific) a 37°C en atmósfera húmeda con una concentración de 5% de CO₂ en el aire. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 2 o 3 días durante el periodo de mantenimiento. Para la realización de los repiques o pasajes, se descartó el medio de cultivo y las células adherentes fueron tratadas con tripsina/EDTA (Gibco) durante 3 a 5 minutos en condiciones de cultivo dentro del incubador. Luego se inactivó la actividad de tripsina con SFB y finalmente se adicionó PBS, (1X, pH= 7,4) a un volumen final deseado para trasvasar a tubos falcon o eppendorf estériles y lavar las células mediante centrifugación a 1500 rpm. El pellet obtenido fue re-suspendido suavemente en DMEM-HG fresco y las células colocadas en placas del diámetro elegido conteniendo DMEM-HG suplementado con SFB 10% y antibióticos. Se las dejó crecer entre 24-48 h hasta alcanzar una confluencia de 60-85% según corresponda en cada experimento.

Exposición a Pb y etanol

El procedimiento de exposición a Pb se realizó a partir de soluciones stock estériles de Pb en concentración de 0,5 mg/ml de acetato de plomo (JT Baker, Argentina) disuelto en PBS 1X estéril. Dicha solución se preparó cada 15 días y se calcularon los volúmenes necesarios para alcanzar la concentración de Pb deseada en el volumen final de medio de cultivo correspondiente a cada diámetro de placa elegida.

En el caso de la exposición a EtOH, la solución fue preparada diariamente al momento de utilizar para evitar cambios en la concentración de la misma por evaporación debido a sus características físico-químicas. Se preparó una solución madre de concentración 200mM a partir de EtOH absoluto de grado analítico (Cicarelli, Argentina) y DMEM-HG fresco.

La exposición se realizó durante 24 h a Pb, EtOH o su combinación a las dosis correspondientes en DMEM-HG suplementado con SFB al 3% y antibióticos, a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. En el caso del tratamiento con EtOH, el medio de cultivo se renovó entre las 6-8 h de exposición para minimizar la pérdida de concentración de EtOH por evaporación.

Curva dosis respuesta para Pb y Etanol

Se realizó en primer lugar una curva dosis-efecto cuyo objetivo fue evaluar la actividad de la enzima ALDH2 en respuesta a Pb y EtOH, a fin de seleccionar las dosis a utilizar en los experimentos subsiguientes. El rango de concentraciones para realizar las curvas fue escogido tomando como referencia los antecedentes de Kumar y cols, 2015 en la línea celular PC-12.

Para ello, las células fueron sembradas en placas de 6 cm 48 h antes de la exposición a los tóxicos. Se procedió a cambiar el medio de cultivo transcurridos los días de crecimiento y se reemplazó por DMEM HG conteniendo 3% de SFB y antibióticos suplementados con Pb, EtOH o su combinación según la siguiente escala de concentraciones:

- Pb: 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100 y 200 μ M
- EtOH: 25, 50, 100 y 200 mM
- Pb + EtOH: 1,25 μ M Pb + 25 mM EtOH

2,5 μ M Pb + 50 mM EtOH

5 μ M Pb + 100 mM EtOH

10 μ M Pb + 200 mM EtOH

La exposición se realizó durante 24 h y luego se procedió a determinar la viabilidad celular, la concentración de l-lactato, la actividad enzimática de ALDH2 y su expresión mediante western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF) como se detalla a continuación. Asimismo, se evaluaron los efectos sobre de la suplementación con NAD⁺, cofactor de ALDH2, sobre la actividad de esta enzima.

Ensayo de viabilidad celular: MTT

Mosmann en 1983 desarrolló un ensayo colorimétrico cuantitativo para células de mamífero con el objetivo de determinar la viabilidad en cultivo celular a partir de una sal de tetrazolio. El ensayo detecta solo células vivas, por lo cual este método se puede utilizar para medir citotoxicidad, proliferación o activación (Mosmann, 1983). Con el objetivo de evaluar el efecto de Pb, EtOH y su combinación sobre la viabilidad celular, se procedió a realizar el ensayo de MTT. Para ello, el bromuro de MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (Sigma-Merck) se disolvió en PBS en una concentración de 5 mg/ml y se filtró para esterilizar y eliminar una pequeña cantidad de residuo insoluble que pudiera quedar remanente.

Las células SH-SY5Y se hicieron crecer durante 24h en placa de 96 pocillos a razón de 10.000 células/pocillo. Al día siguiente, se realizaron los tratamientos correspondientes con Pb, EtOH o su combinación y las células fueron incubadas durante 24h más. Posteriormente el sobrenadante (aproximadamente 200 µl) fue retirado y reservado para la determinación de lactato (ver experimento siguiente). Posteriormente, se incubaron las células con 100 µl de la solución de MTT preparada anteriormente durante 1h a 37°C en condiciones de cultivo.

Transcurrido ese tiempo, se añadió a todos los pocillos 50µl de DMSO puro (Merck Millipore) y se mezcló con el objetivo de disolver los cristales de formazán azul oscuro. Pasados unos minutos a temperatura ambiente y habiéndose disuelto los cristales, las placas se leyeron en un lector de micro placas (Tecan Infinite M200, TECAN Industries, Männedorf, Suiza) utilizando una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto al control (% del control).

Determinación de la concentración de Lactato

La sobreproducción repentina de NADH (y, por consiguiente, el cambio en la relación de concentraciones entre NAD^+/NADH) en las reacciones catalizadas por ADH y ALDH2 conduce a un cambio en la reacción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y a la producción de lactato, reflejando un consumo ineficiente de la glucosa por parte de las células (Birková y cols, 2021). El piruvato que se obtiene luego de la glucólisis estaría siendo utilizado por la enzima LDH y transformado en lactato en lugar de ingresar al ciclo de Krebs para producir finalmente ATP. A su vez, la presencia de lactato en el medio de cultivo y el aumento de osmolaridad causado por su transporte a través de la membrana plasmática, ha demostrado restringir el crecimiento celular (Kurano y cols, 1990).

Se determinó entonces la concentración de L-Lactato como un marcador de control metabólico en el sobrenadante de cultivo de células SH-SY5Y en respuesta a los diferentes tratamientos. El sobrenadante fue centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos para descartar el pellet con posible debris celular. Posteriormente 25 μl fueron inyectados en un lactímetro electroquímico YSI, modelo 2700 STAT PLUS (Ohio, EUA) para la determinación de la concentración de lactato. Los resultados fueron expresados en mmol/l.

Determinación de la actividad enzimática de ALDH2

A continuación del tratamiento correspondiente con los tóxicos bajo estudio, las células crecidas en placa de 6cm se trataron con Tripsina/EDTA para determinar la actividad de ALDH2. Fueron luego lavadas tres veces con PBS 1X mediante centrifugación suave a 1.000 rpm y posteriormente lisadas con 100-150 μl de una solución de lisis compuesta por sacarosa 0,25M (Cicarelli, Argentina) y Tritón-X100 (Sigma Aldrich) al 1%. El homogenato obtenido fue sonicado y luego centrifugado durante 10 minutos a 800 g a 4°C, recolectándose el sobrenadante y descartando el pellet de debris celular. A continuación, este sobrenadante fue centrifugado a 12.000g durante 10 minutos a 4°C.

Una vez determinada la concentración de proteínas de los extractos mediante la técnica de Bradford (ver más adelante), la actividad de ALDH2 se midió mezclando en un tubo de kxan 150 µg de proteínas totales con 1 mM del cofactor NAD⁺ en solución de pirofosfato de sodio 50 mM pH 8,8; conteniendo 5 mM de MgCl₂, 4 mM de 4-metilpirazol, 2 µM de rotenona (disuelta en metanol) en un volumen final de reacción de 300 µl. La reacción se inició con el agregado de ACD al resto de los componentes incubados previamente durante 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la lectura. La concentración final de ACD en la mezcla de reacción fue de 21 mM, lo que aseguró que la actividad medida fue exclusivamente la actividad de la enzima ALDH2. La absorbancia, determinada por la aparición de NADH, se midió a 340 nm cada 2,5 minutos durante 10 minutos en un espectrofotómetro (Varian Cary 50). Los cambios de absorbancia respecto al tiempo fueron graficados y la actividad de la ALDH2 expresada como nmoles de NADH generados por mg de proteína presente en los extractos por minuto de reacción (nmoles NADH/mg prot/min).

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio colocados en el fondo de la placa de 24 pocillos, a razón de 10.000 células por pocillo. Se dejaron crecer durante 48 h para asegurar la adherencia al vidrio sin ningún tratamiento adherente. Luego se procedió a cambiar el medio de cultivo por medio con Pb, EtOH o ambos según lo descrito en la sección de tratamiento. La exposición se realizó durante 24h. Transcurrido ese tiempo se realizaron lavados con PBS y las células se fijaron con metanol puro de grado analítico (J.T. Baker, Argentina) durante 3 minutos a -20°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS para retirar los restos de fijador. Luego se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas utilizando una solución de bloqueo compuesta por BSA 5% en PBS 1X y Tritón X-100 al 0.1% durante 1 hora en cámara húmeda a T° ambiente.

En la etapa siguiente, el anticuerpo primario (en todos los casos) se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios fueron preparados en solución de albúmina sérica bovina (BSA) 3% en PBS 1X y Tritón X-100

al 0.1%. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y posteriormente se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios, conjugados a fluoróforos (AlexaFluor), por 2 horas a temperatura ambiente en una dilución de 1:1000 en solución de BSA 1% en PBS 1X. Luego se incubaron las muestras durante 10 minutos con una solución de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, 1/10.000), lo que permitió marcar el ADN de los núcleos celulares para su posterior visualización en el microscopio confocal. Se realizaron 2 lavados con PBS seguidos por un último lavado en agua Milli Q, procediendo al montaje que se realizó sobre portaobjetos en presencia de FluorSave (Merck Millipore).

Las imágenes de las muestras resultantes de la IFI fueron obtenidas mediante microscopía confocal a una magnificación de 63X con objetivo de inmersión utilizando el microscopio confocal LSM800 (CEMINCO, UNC).

Western blot

Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en placas de 6 cm. Luego de los tratamientos correspondientes, fueron resuspendidas mediante el uso de tripsina. Los pellets obtenidos fueron lavados 2 veces con PBS 1X y adicionados con 150µl de buffer de lisis (sacarosa 0,25M con EDTA al 1%) con suplemento de fluoruro de metilfenilsulfonio (PMSF) 2 mM, leupeptina 10 µg/ml y aprotinina 10 µg/ml como inhibidores de fosfatasa y proteasas. Los homogenatos fueron obtenidos mediante sonicación y centrifugación a 12000g durante 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se le adicionó buffer Laemmli a una concentración final de 1X (una parte de buffer por cada 3 partes de muestra) y conservado en alícuotas congeladas a -70 °C hasta su uso.

Al momento de ser utilizadas, las muestras obtenidas fueron desnaturalizadas por calor colocándolas en un baño termostático a 100°C y sometidas luego a electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE, usando un porcentaje de acrilamida de 12% en el gel de corrida. Se sembraron entre 30-50 µg de proteína total para la determinación de las diferentes proteínas a analizar. Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó un marcador de pesos moleculares

(Precision All Blue, BioRad). Completada la electroforesis se realizó la transferencia a membranas de PVDF o nitrocelulosa durante 50 minutos a 350mA, en frío. Una vez completada la transferencia, se realizó el bloqueo de sitios de unión no específica con una solución compuesta por PBS 1X y leche descremada al 5%; 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego, las membranas bloqueadas fueron incubadas con una solución de anticuerpo primario durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas con PBS 1X -Tween-20 por 30 min, en agitación a temperatura ambiente para luego ser incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (anticuerpos IR- para determinación en Odyssey). Las membranas fueron finalmente escaneadas mediante el uso del lector infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences). Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados del WB fueron analizadas y cuantificadas con el programa FIJI-Image J (National Institute of Health, USA).

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas en las muestras obtenidas para actividad enzimática y para Western blot se determinó mediante el método de Bradford empleando el reactivo de Bradford comercial (BioRad). Para ello, las muestras se incubaron en placa de 96 pocillos con el reactivo de Bradford de manera que la presencia de proteínas genera un cambio de coloración que es posible valorar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 560 nm. La concentración se determinó en relación a la recta patrón de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) realizada a partir de diluciones seriadas de un stock de 1 mg/ml de BSA.

Resultados

Curvas dosis respuesta de actividad enzimática de ALDH2

Se realizó la exposición de células SH-SY5Y a diferentes dosis de Pb₂Ac y EtOH según lo descripto en la sección materiales y métodos. Se presentan a continuación los valores obtenidos de actividad enzimática de ALDH2 en respuesta a la exposición a estos tóxicos.

Curva dosis respuesta de actividad de ALDH2 en respuesta a Pb

De acuerdo con datos de bibliografía, se seleccionaron dosis de Pb₂Ac en un rango entre 1,25 a 200 μ M y se expuso a las células durante 24 h. Se puede observar en la **Figura 18** que a partir de 10 μ m de Pb₂Ac se comienza a observar una disminución estadísticamente significativa en la actividad enzimática de ALDH2, cuyo efecto se mantiene a concentraciones más altas de Pb. ANOVA de una vía, $F(7, 27) = 4,24$; $p < 0,05$. El test de Tukey utilizado como *post-hoc* arrojó diferencias significativas: C vs Pb_{10 μ M}, $p < 0,05$; C vs Pb_{50 μ M}, $p < 0,01$; C vs Pb_{100 μ M}, $p < 0,05$; C vs Pb_{200 μ M}, $p < 0,05$.

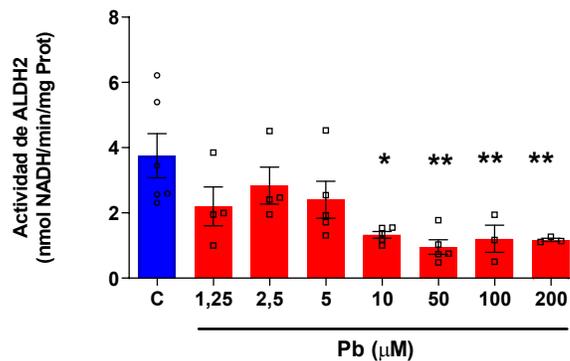


Figura 18. Curva dosis respuesta. Actividad enzimática de ALDH2 en respuesta a dosis crecientes de Pb₂Ac en células SH-SY5Y. Los datos se graficaron como la media \pm SEM. El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas en relación al grupo Control. * $p < 0,05$. ** $p < 0,001$.

Ensayo de viabilidad celular en respuesta a la exposición a Pb

Mediante el ensayo de MTT se determinó el porcentaje de células viables luego de la exposición a concentraciones crecientes de Pb₂Ac (**Figura 19**). El análisis realizado mediante ANOVA de una vía, demostró una disminución de un 25% en la viabilidad celular a una concentración de 50µm, siendo significativas las diferencias a concentraciones mayores a 50µm de Pb, momento en el que el porcentaje de células viables se redujo hasta en un 37% luego de la exposición a 200µM de Pb. ANOVA de una vía: $F_{(7,28)} = 4,783$; $p=0,0012$. Test de Tukey utilizado como *post-hoc* mostró diferencias respecto al control: C vs Pb_{100µM}, $p<0,05$; C vs Pb_{200µM}, $p<0,001$.

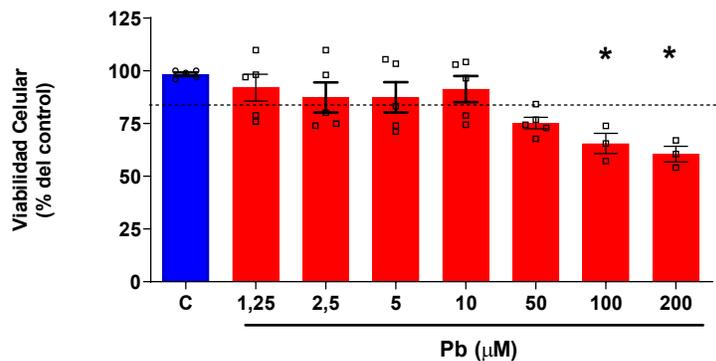


Figura 19. Ensayo de MTT. Viabilidad celular expresada como porcentaje respecto al control en respuesta a dosis crecientes de Pb₂Ac en células SH-SY5Y. Los datos se graficaron como la media \pm SEM. El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas respecto al control. *denota diferencias entre grupos C vs Pb a $p<0,05$.

Curva dosis respuesta de actividad de ALDH2 en respuesta a etanol

Se seleccionaron dosis de EtOH en un rango entre 25 y 200 mM. Se observa en la **Figura 20** una tendencia dosis dependiente hacia una disminución en la actividad de ALDH2 luego de la exposición a EtOH durante 24h. Los resultados demuestran que la dosis de EtOH a la que se evidenciaron diferencias significativas en la actividad enzimática de ALDH2 fue de 200 mM de EtOH. El ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey reveló las siguientes diferencias: $F_{(4,16)} = 3,668$; $p=0,0265$; C vs EtOH_{200 mM}, $p<0,05$.

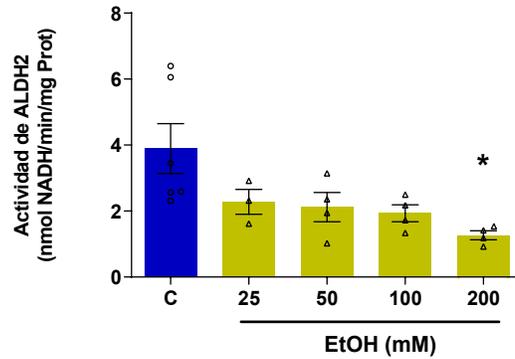


Figura 20. Actividad enzimática de ALDH2 en respuesta a dosis crecientes de EtOH evaluada en células SH-SY5Y. Los datos se graficaron como la media \pm SEM. El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas respecto al grupo control. *denota diferencias entre grupos C vs EtOH $p < 0,05$.

Ensayo de viabilidad celular en respuesta a la exposición a Etanol

De igual manera que para la evaluar las consecuencias de la exposición a Pb, se realizó el ensayo de MTT para la determinación del porcentaje de viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de EtOH durante 24 h. El análisis estadístico realizado mediante un ANOVA de una vía: $F_{(3, 15)} = 2,151$; $p > 0,05$ demostró que no existen diferencias significativas en la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones de EtOH ensayadas, evidenciándose el menor porcentaje de células viables, 82,33%, a una concentración de 200 mM de EtOH (**Figura 21**).

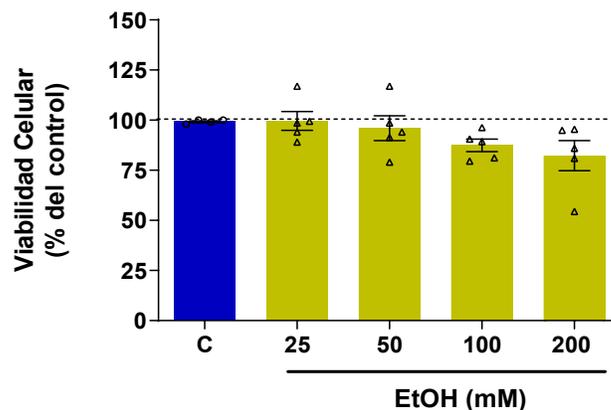


Figura 21. Ensayo de MTT. Viabilidad celular expresada como porcentaje respecto al control en respuesta a dosis crecientes de EtOH evaluadas en células SH-SY5Y. Los datos se encuentran graficados

como la media \pm SEM. El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Ensayos de exposición combinada a Pb y etanol

Con el objetivo de seleccionar las dosis que conformarán el modelo experimental y serán utilizadas en los siguientes experimentos, se realizó la exposición de células SH-SY5Y a diferentes combinaciones de dosis de Pb y EtOH durante 24 h según lo explicado en la sección de materiales y métodos. Se presentan a continuación los resultados de la actividad enzimática de ALDH2. En la **Figura 22** se han graficado los niveles de actividad enzimática de ALDH2 para las combinaciones de 1,25 μ M Pb + 25 mM EtOH (*Panel A*), 2,5 μ M Pb + 50 mM EtOH (*Panel B*) y 5 μ M Pb + 100 mM EtOH (*Panel C*). El análisis realizado mediante un ANOVA de una vía no arrojó diferencias significativas en ninguna de estas combinaciones: para Pb 1,25 μ M + EtOH 25mM: $F_{(3, 15)} = 2,336$; $p=0,1150$; Pb 2,5 μ M + EtOH 50 mM: $F_{(3, 17)} = 1,809$; $p=0,1838$ y Pb 5 μ M + EtOH 100 mM: $F_{(3, 15)} = 1,378$; $p=0,2876$.

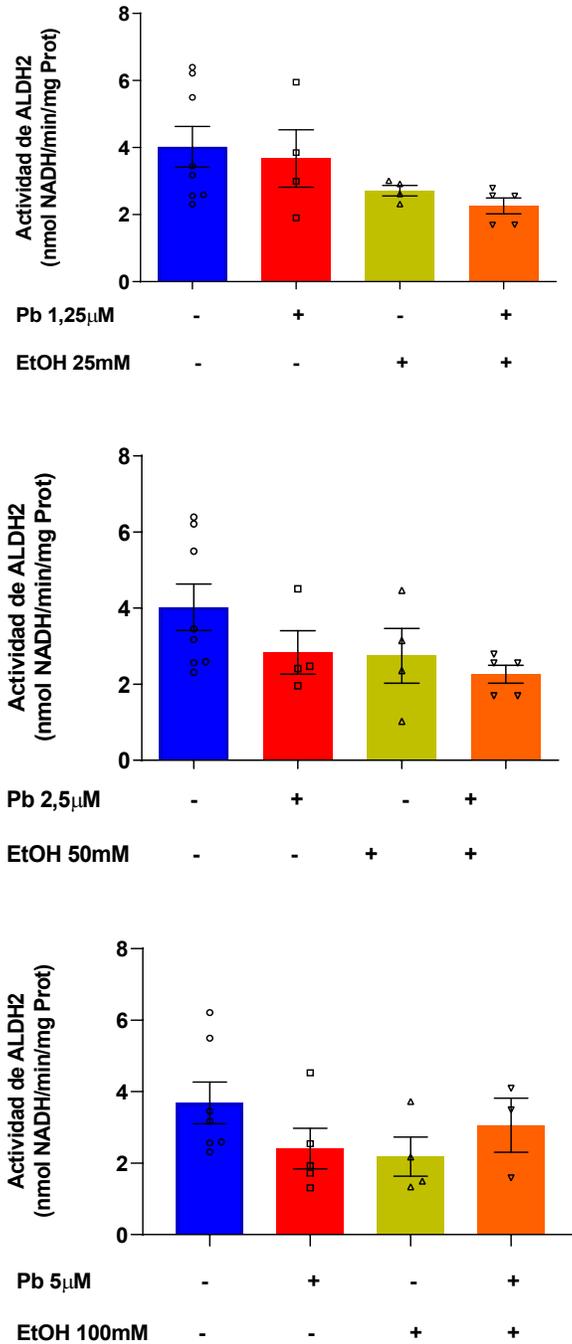


Figura 22. Actividad enzimática de ALDH2 en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH durante 24h. Los datos están expresados como nmoles NADH/min/mg de proteínas evaluada. El ANOVA de una vía no reveló diferencias entre grupos en estas combinaciones de dosis ensayadas. **A.** Ensayo con 1,25 μ M de Pb y 25mM de EtOH. **B.** Ensayo de exposición a 2,5 μ M de Pb y 50mM de EtOH. **C.** Ensayo de exposición a 5 μ M de Pb y 100mM de EtOH.

La exposición combinada a 10 μ M de Pb y 200mM de EtOH en células SH-SY5Y se muestran en la **Figura 23**. El ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como prueba *post-hoc* arrojó diferencias respecto al grupo control: $F_{(3, 20)} = 18,49$; $p < 0,0001$. C vs Pb_{10 μ M} $p < 0,01$; C vs EtOH_{200mM}, $p < 0,01$; C vs Pb_{10 μ M} +EtOH_{200mM}, $p < 0,0001$. Se observaron asimismo diferencias entre grupos: Pb_{10 μ M} vs Pb_{10 μ M} +EtOH_{200mM}, $p < 0,001$; EtOH_{200mM} vs Pb_{10 μ M} +EtOH_{200mM}, $p < 0,001$. Estos resultados podrían sugerir que la interacción entre ambos tóxicos, a una dosis de 10 μ m de Pb y 200mM de EtOH, tendrían un efecto sinérgico e inhibitorio sobre la actividad enzimática de ALDH2.

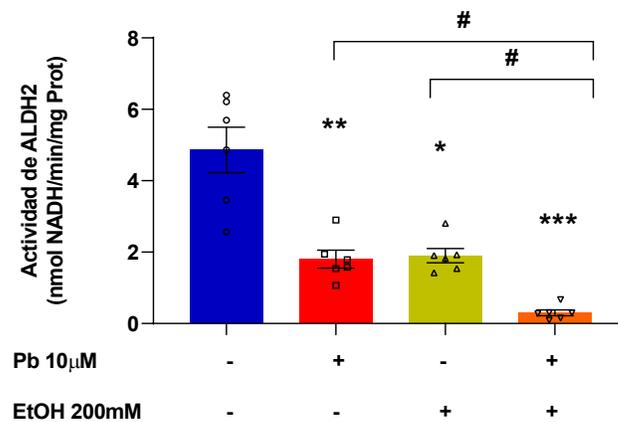


Figura 23. Dosis elegidas de exposición a Pb y EtOH. Actividad enzimática de ALDH2 expresada como como nmoles NADH/min/mg de proteínas en células SH-SY5Y expuestas a 10 μ M de Pb y 200mM de EtOH según el protocolo descrito. ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como *post-hoc* reveló diferencias significativas entre grupos. * denota diferencias respecto al control en $**p < 0,01$ y $***p < 0,0001$. # denota diferencias entre grupos, # $p < 0,05$.

En cuanto a la viabilidad celular, si bien se puede observar una tendencia, no se manifestaron diferencias significativas entre los grupos conformados por las dosis de exposición seleccionadas: 10 μ M de Pb y 200mM de EtOH (**Figura 24**). El ANOVA de una vía revela el siguiente efecto: $F_{(3, 16)} = 1,852$; $p > 0,1$. En el grupo tratado con Pb 10 μ m + EtOH 200 mM, se observa una disminución en la viabilidad celular de un 17,9%, sin significancia estadística.

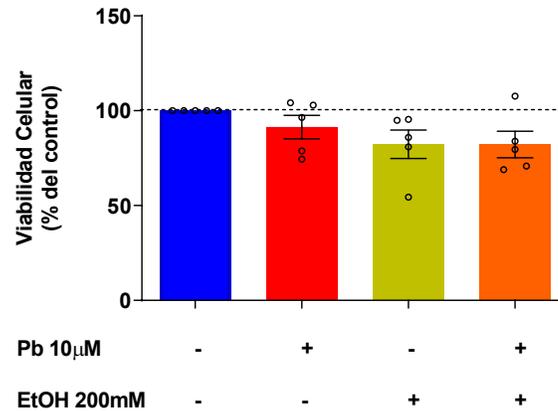


Figura 24. Ensayo de MTT. Viabilidad celular expresada como porcentaje respecto al control en respuesta a Pb y/o EtOH en células SH-SY5Y.

Determinación de la concentración de L-lactato.

Como puede observarse en la **Figura 25** en la determinación de la concentración de L-lactato, el análisis mediante un ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas respecto al control: $F_{(3,12)} = 1,19$; $p > 0,1$.

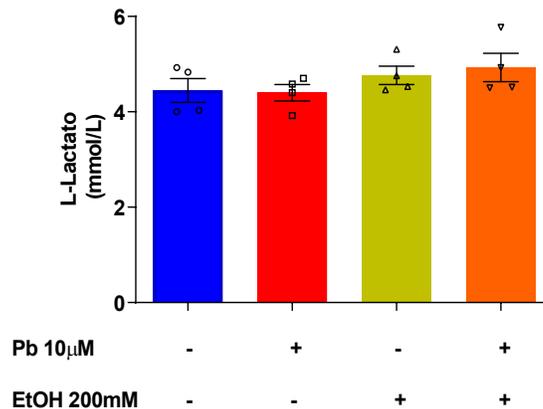


Figura 25. Determinación de los niveles de L-Lactato en el sobrenadante de cultivo en respuesta a Pb y/o EtOH en células SH-SY5Y. El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas respecto al control.

Si bien puede observarse una tendencia al aumento de la concentración de L-lactato, esta no manifiesta significancia estadística. Este resultado sugiere que en estas

condiciones experimentales las células no estarían aun experimentando un cambio metabólico hacia la glicólisis anaerobia, por lo que el metabolismo no estaría alterado.

Suplementación con NAD⁺

Como fue descrito en la introducción de este trabajo, el cofactor NAD⁺ es esencial para el funcionamiento no sólo de la enzima ALDH2 sino también de numerosas enzimas mitocondriales y es un aceptor de electrones asociado al CI de la CTE en esa organela. Este se puede sintetizar *de novo* a partir de triptófano o de vías de rescate que requieren la captación de NAD⁺ a través de precursores de la dieta. Su síntesis es de vital importancia ya que, como fue mencionado, no solo es un cofactor en reacciones redox, sino que también es un cosustrato para una serie de enzimas que consumen NAD⁺ como sirtuinas, PARP y ADPR-ciclasas, las cuales regulan procesos biológicos esenciales como la transcripción, regulación, señalización y reparación de ADN entre otros, como ha sido mencionado en la introducción de este capítulo.

La actividad de NAD⁺ está regulada por oscilaciones en el estado oxidativo y por su concentración, determinada por el equilibrio relativo entre su consumo y biosíntesis. La interrupción de la homeostasis NAD⁺ se ha convertido en un factor común característico de varias enfermedades, mientras que el aumento de sus niveles se ha asociado con efectos positivos para la salud. Por lo tanto, las enzimas implicadas en su metabolismo se han convertido en objetivos interesantes para el descubrimiento de fármacos con un amplio potencial terapéutico en diferentes patologías, incluidas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (revisado en Arenas-Jal & García-Montoya, 2020). Se han utilizado diferentes estrategias para aumentar los niveles de NAD⁺, que incluyen mejora de la biosíntesis e inhibición de su degradación, hasta intervenciones nutricionales, farmacológicas y genéticas para regular el metabolismo de este cofactor en humanos (Trammel y cols, 2016). Así, modificaciones del metabolismo de NAD⁺ pueden impactar severamente en diferentes procesos biológicos, como la regulación transcripcional, reparación del ADN, señalización celular, longevidad y viabilidad celular (Chiarugi y cols, 2012). De hecho, alrededor de 500 enzimas, que son indispensables para mantener la homeostasis, utilizan NAD⁺ como

cofactor o cosustrato, y las enzimas dependientes de NAD⁺ no pueden funcionar sin él (Pankiewicz y cols, 2015), como es el caso de la ALDH2.

Evidencia reciente señala los efectos benéficos de NAD⁺ como agente regulador de la homeostasis mitocondrial en diferentes modelos experimentales. Al respecto, neuronas obtenidas de cultivos corticales primarios de ratón fueron tratadas con glutamato (en una concentración de 30 μ M) en conjunto con glicina (3 μ M) durante 24 h en presencia o ausencia de 15 mM NAD⁺. Se observó que la suplementación con NAD⁺ preserva la integridad funcional mitocondrial después de la excitotoxicidad del glutamato, inhibiendo la fragmentación mitocondrial y restaurando la biogénesis. De igual manera, el tratamiento con NAD⁺ fue capaz de inhibir la apoptosis evitando la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) (Wang y cols, 2014).

En un modelo de isquemia-reperfusión en células H9c2, Liu y cols en 2014, realizaron un tratamiento con una dosis de 500 μ M de NAD⁺ a diferentes tiempos, evidenciando la reducción en la apoptosis disminuyendo la expresión de BAX y aumentando la viabilidad celular. Asimismo reportaron una regulación positiva para la actividad de Sirt1, una enzima deacetilasa de la familia de las Sirtuinas, que son NAD⁺ dependientes y fundamentales para la homeostasis mitocondrial, ya que regulan las modificaciones post-traduccionales de muchas proteínas (Liu y cols, 2014). Este es uno de los mecanismos más aceptados para explicar el efecto positivo de NAD⁺ sobre la bioenergética celular (Sultani y cols, 2017).

Asimismo, se ha determinado que en células PC-12 diferenciadas, la suplementación con una dosis de 1 mM de NAD⁺ se logró la reversión los daños causados por rotenona (Rot) en los niveles de apoptosis y potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo que esta estrategia podría ser utilizada en el tratamiento de diferentes patologías que cursen con disfunción mitocondrial (Hong y cols, 2014).

Por todo lo expuesto, en este experimento, las células SH-SY5Y fueron expuestas a Pb y EtOH, y tratadas con 1 mM del cofactor NAD⁺ durante 24 h con el objetivo de evaluar su impacto sobre la posible restauración de los niveles de actividad enzimática de ALDH2.

Efectos del tratamiento con NAD⁺ sobre la actividad de ALDH2

El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías en el cual se contrastó la exposición (que incluye los parámetros Pb, EtOH y Pb+EtOH) y tratamiento (NAD⁺), arrojó diferencias entre los grupos respecto al control: C vs Pb, $F_{(3,32)} = 8,086$; $p < 0,001$; C vs EtOH, $F_{(3,32)} = 26,84$; $p < 0,001$, y se observa interacción entre ambos parámetros en respuesta al tratamiento con NAD⁺: $F_{\text{Interacción}}(3,32) = 8,09$; $p < 0,0001$. El análisis *post-hoc* realizado mediante el Test de Tukey reveló diferencias entre los grupos en respuesta al tratamiento con NAD⁺: Pb + EtOH vs Pb + EtOH_{NAD+}, $p < 0,001$; EtOH vs EtOH_{NAD+}, $p < 0,05$.

La administración de NAD⁺ resultó en un aumento de actividad de ALDH2 respecto al control en el grupo EtOH (2,6 veces) y su combinación con Pb (5,6 veces), sin evidenciarse un aumento de actividad enzimática en el grupo C (C vs C_{NAD+}, $p > 0,05$). Por otra parte, en el grupo expuesto a Pb se observa una tendencia al aumento de actividad sin significancia estadística (Pb vs Pb_{NAD+}, $p < 0,1$) (Figura 26).

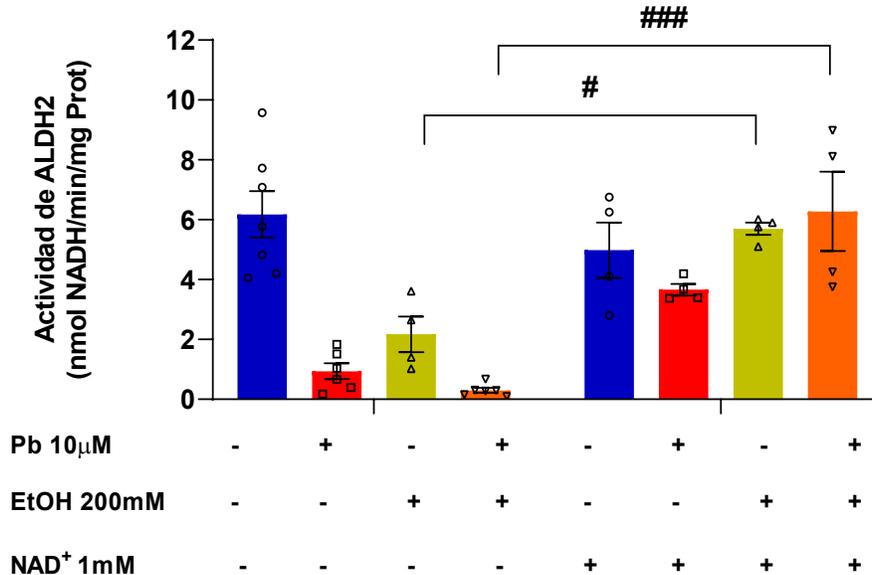


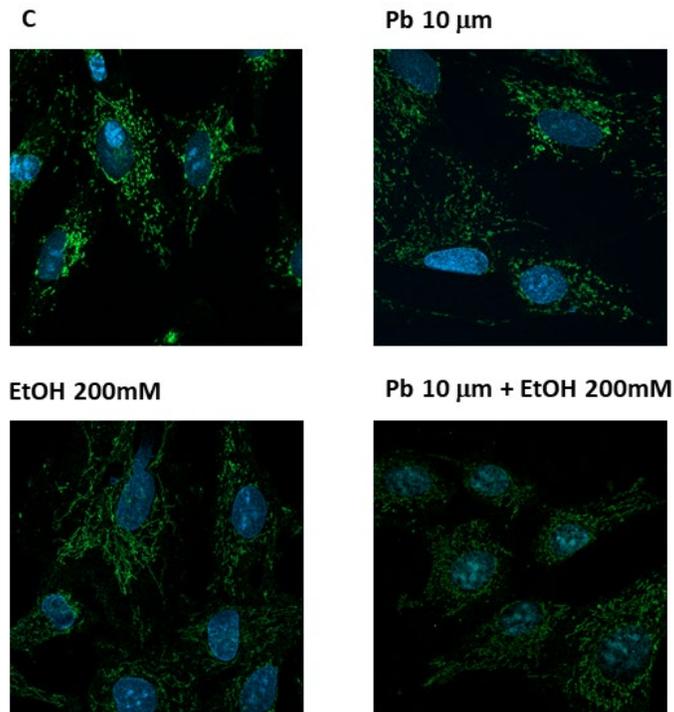
Figura 26. Actividad enzimática de ALDH2 en respuesta al tratamiento con NAD⁺. Los datos se grafican como la media \pm SEM. ANOVA de dos vías seguido por el test de Tukey arrojó diferencias entre grupos. # denota $p < 0,05$ ### denota $p < 0,01$ respecto al estado de exposición con Pb, EtOH o su combinación.

Los experimentos siguientes estuvieron orientados a la determinación de la expresión de ALDH2 mediante IFI y WB a fin de cuantificar los niveles de la enzima en estas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos mediante ambas metodologías evidenciaron una disminución de la expresión de ALDH2 producto de la exposición a Pb, EtOH o a su combinación.

Expresión de ALDH2 mediante Inmunofluorescencia

En el **panel A** de la **Figura 27** se observan las fotografías de células SH-SY5Y tomadas mediante microscopía confocal. En el **panel B** de la **Figura 27** se puede observar el gráfico para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para ALDH2 en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH. El análisis mediante ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey arrojó diferencias significativas respecto al control. $F_{(3,16)} = 11,60$; $p > 0,001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,0001$. Se evidencia entonces una disminución en la expresión de ALDH2 por la exposición a Pb, EtOH o su combinación.

A.



B.

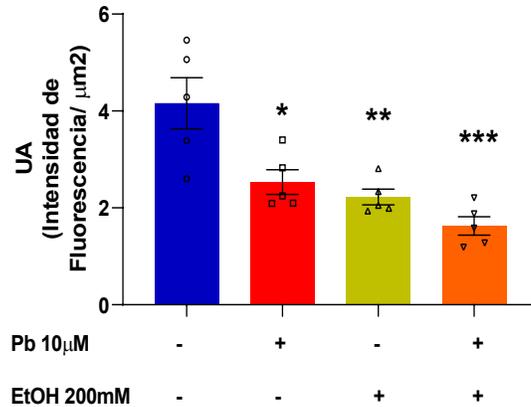


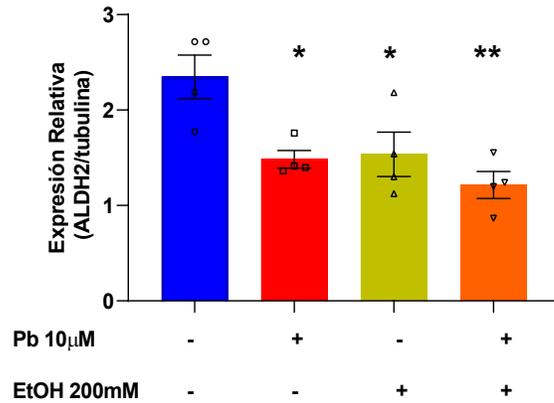
Figura 27. Intensidad de fluorescencia para la marcación de ALDH2 en respuesta a Pb y/o EtOH en células SH-SY5Y. A. Fotografías representativas de cada condición. ALDH2: verde. Se marcaron los núcleos con DAPI. **B.** Se muestran graficados los promedios de la media de la intensidad de fluorescencia por $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$ de cada grupo. ** denota $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Expresión de ALDH2 mediante western blot

Se determinaron los niveles de ALDH2 mediante WB y los resultados se muestran en la **Figura 28**. El análisis realizado mediante ANOVA de una vía arrojó diferencias: $F_{(3, 12)} = 7,117$; $p < 0,001$. El test de Tukey reveló diferencias entre los grupos expuestos a Pb, EtOH o su combinación y el grupo control: C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,01$.

Estos resultados demuestran el efecto inhibitorio de Pb y EtOH sobre la expresión de la enzima ALDH2.

A.



B.

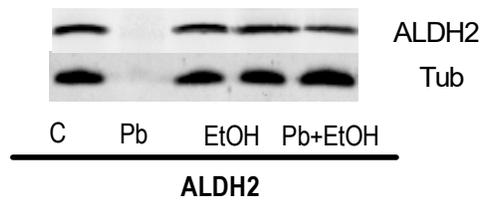


Figura 28. Expresión de ALDH2 en células SH-SY5Y en respuesta a Pb y EtOH. **A.** Cuantificación de la intensidad de banda. Tubulina fue utilizada como control de carga. Los datos se graficaron como la media \pm SEM. * denota $p < 0,05$ respecto al control. **B.** Imagen representativa de la membrana. Bandas superiores: ALDH2. Bandas inferiores: Tubulina.

Discusión y conclusiones parciales

Los estudios realizados en este capítulo buscaron determinar la expresión proteica y actividad enzimática de ALDH2 en el modelo de exposición combinada a Pb y EtOH *in vitro* en una línea celular de neuroblastoma humano. A partir de los resultados obtenidos, pudimos demostrar en primer lugar que, tanto Pb como EtOH y/o su combinación no modificaron significativamente la viabilidad celular, (al menos detectable mediante MTT), independientemente de la concentración ensayada de ambos tóxicos. Si bien a las dosis seleccionadas se evidencia una viabilidad del 78% en el grupo expuesto a ambos tóxicos, la mayor parte de las células demostraron poseer especial resistencia frente a las concentraciones de EtOH y Pb ensayadas. A este respecto se ha demostrado en células SH-SY5Y que los efectos del EtOH sobre la viabilidad celular son dosis-dependientes y acompañados de una reducción significativa de la expresión de RNAm de las proteínas p53 y Bax incluyendo la relación Bax/Bcl-2, todos indicadores de muerte celular por apoptosis (Grataitong y cols, 2012). Cabe destacar que en este estudio la dosis de 200 mM EtOH produjo un mayor porcentaje de muerte celular que en los resultados presentados por nosotros (35% vs 20% aprox.), probablemente debido a los mayores tiempos de tratamiento con EtOH (72 h vs 24 h, respectivamente), favoreciendo la cascada de eventos que desencadenan la apoptosis. En otro estudio en el que se investigaron los efectos citotóxicos de ACD también en células SH-SY5Y, se demostró que este metabolito promovió la señalización apoptótica e inhibición de patrones de supervivencia celular, lo que estuvo precedido por la producción de EROs y la elevación del estrés oxidativo (Yan y cols, 2016). En línea con los resultados observados en los ensayos de viabilidad celular, no se manifestaron diferencias significativas en la concentración de L-lactato, por lo que podría concluirse que las células continúan realizando los procesos metabólicos aeróbicos necesarios para mantener su homeostasis.

En relación al efecto de la interacción entre Pb y EtOH sobre la actividad enzimática y expresión de ALDH2 en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, demostramos que luego de 24 h de exposición, ambos neurotóxicos provocan una disminución en la cantidad y actividad de ALDH2.

En cuanto al mecanismo de inhibición de ALDH2, podría deberse a una conjunción de eventos. Existen reportes de que ALDH2 es susceptible a sufrir modificaciones post-traduccionales que modifican su actividad. A este respecto, las enzimas de la familia de sirtuinas interaccionan con una amplia gama de proteínas celulares en núcleos, citoplasma, y mitocondrias para la modificación postraduccionales por acetilación (SIRT 1, 2, 3 y 5), cumpliendo un rol principal en la regulación de la actividad de numerosas enzimas, mediante la remoción de los grupos acetilo de los residuos de Lys (Lee, 2013). En particular, se ha descrito la interacción entre la deacetilasa SIRT3, de localización mitocondrial, y principal reguladora del metabolismo y vías de estrés oxidativo a nivel de la organela, y ALDH2, con un sitio de acetilación en una Lys en posición 377 (correspondiente al sitio catalítico). La expresión de SIRT3 se encuentra disminuida frente al consumo crónico de EtOH, lo que ocasiona una hiper-acetilación de proteínas y enzimas mitocondriales, llevando a la inactivación de las mismas, entre ellas SOD y ALDH2; alterando así el balance oxidativo y el metabolismo de aldehídos tóxicos (Fritz y cols, 2012). Recientemente se ha asociado a algunos metales pesados, entre ellos Pb, con un rol inhibitorio sobre SIRT3 y SIRT1, lo que desencadenaría un estado de hiper-acetilación global de proteínas, con la consecuente disrupción del estado metabólico celular que podría explicar en parte los efectos neurotóxicos de Pb y otros metales (Tinkov y cols, 2021). En un estudio realizado en cultivo de células SH-SY5Y expuestas a Pb, se determinó el efecto inhibitorio sobre la expresión proteica de SIRT1 (determinada por WB) de manera dosis dependiente, evidenciando diferencias significativas a partir de 10µm de Pb, dado evidencia de la importancia de este mecanismo (Bai y cols, 2021).

Cabe destacar que ALDH2 es susceptible a otras modificaciones post-traduccionales, como lo son la inactivación mediante s-nitrosilación, descrita en cultivo de células de hepatoma de rata H4IIE-C3 (Moon y cols, 2005); y sumoilación, caracterizada en muestras de hígado de pacientes con hepatocarcinoma (Ong y cols, 2021).

Como fue descrito en la introducción de este trabajo, Pb es un metal que compete con cationes esenciales, como lo es el Mg²⁺, que a su vez es un ion necesario para la actividad catalítica de ALDH2. Pb también tiene afinidad por los grupos tioles,

como los del aminoácido Cys, que forma parte crucial del sitio catalítico de ALDH2, Cys302. A su vez, EtOH consume en su metabolismo oxidativo NAD^+ , depletando así a las células de este cofactor de numerosas enzimas mitocondriales, y desestabilizando el equilibrio NAD^+/NADH . Este efecto, si bien no fue manifestado aún por cambios en la concentración de lactato, podría tener un rol importante en la modulación de la actividad enzimática de ALDH2 en estas condiciones, donde se postula un aumentado consumo del cofactor por las enzimas del metabolismo de EtOH. Así, la exposición combinada a Pb y EtOH podrían disminuir las concentraciones de NAD^+ en las células y así modificar la actividad y función de numerosas enzimas y proteínas mitocondriales. Con respecto a la suplementación de células SH-SY5Y con el cofactor, NAD^+ , se evidenció un aumento de la actividad enzimática de ALDH2 en los grupos expuestos a EtOH, o su combinación con Pb. Al elevarse los niveles de NAD^+ , por lo tanto, la relación NAD^+/NADH , la enzima recupera su actividad catalítica (incluso a niveles mayores que el grupo control). A su vez, numerosas enzimas recobrarían su actividad y funcionalidad, por lo que podría dar cuenta de un microambiente mitocondrial dañado, que revierte su estado luego del aumento de la concentración de NAD^+ .

Es importante mencionar que, la inhibición tanto en la actividad y expresión proteica de ALDH2 conlleva numerosos efectos deletéreos para la célula, principalmente involucrando a la mitocondria como blanco principal. Como se ha descrito en la introducción de este trabajo de tesis, ALDH2 tiene un rol clave en la oxidación de aldehídos reactivos como ACD, DOPAL y 4-HNE. En este contexto, podría producirse la acumulación de estos metabolitos generando daño a las macromoléculas por la formación de aductos o daño oxidativo.

Se ha reportado también un rol neuroprotector para la enzima ALDH2 por lo mencionado anteriormente, y se ha asociado su déficit con procesos tempranos de senescencia celular, sobre todo en SNC tanto *in vivo* como *in vitro*. La **Figura 29** ilustra la relevancia del mecanismo protector de ALDH2 especialmente en mitocondrias neuronales, donde se evidencia que su deterioro funcional no sólo provoca acumulación de metabolitos tóxicos, sino que también tiene implicancias en los mecanismos que regulan la producción de EROs y el consecuente daño oxidativo lípidos, proteínas y

ADN. Estos eventos pueden llevar a las mitocondrias a un estado disfuncional que puede culminar en mecanismos apoptóticos.

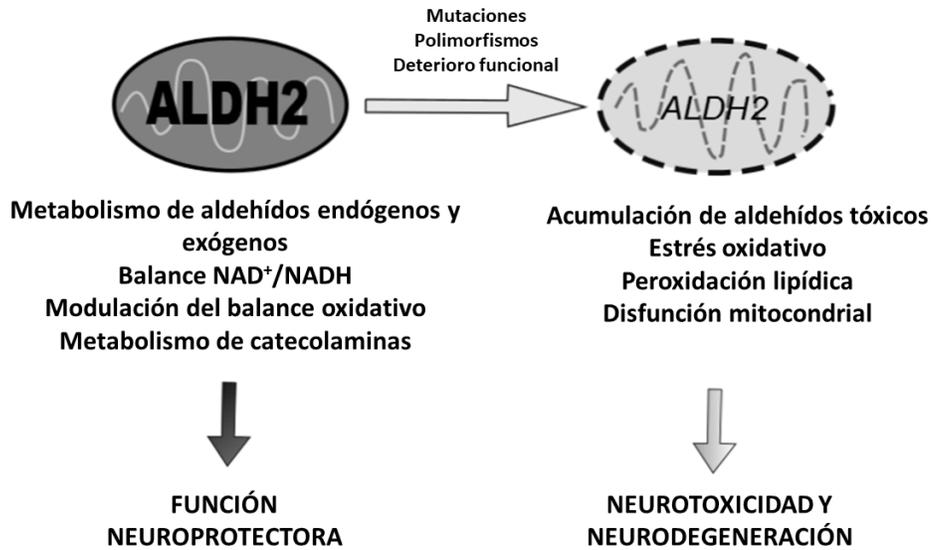


Figura 29. Rol de ALDH2 y sus funciones en SNC. Modificada de Deza-Ponzio y cols, 2018.

A continuación, se abordarán los efectos de la inhibición de ALDH2 por la interacción entre Pb y EtOH sobre la funcionalidad mitocondrial en células SH-SY5Y. La relación con mecanismos de estrés oxidativo será abordada en el capítulo 4 de este trabajo de tesis.

Capítulo 3

Funcionalidad mitocondrial en respuesta a Pb y etanol

Funcionalidad mitocondrial en células SH-SY5Y respuesta a Pb y etanol

Mitocondria: Organización y funciones

Las mitocondrias tienen un rol fundamental en la funcionalidad y adaptación celular mediante su capacidad de ajuste dinámico en respuesta a las necesidades celulares. Debido a su participación en numerosos procesos críticos de la función celular estas organelas son contribuyentes importantes a la señalización intracelular y pueden afectar la homeostasis de varias maneras. Además de producir ATP, las mitocondrias son reguladoras críticas de la síntesis y ensamblaje de esteroides, pirimidinas, hemo y grupos de hierro y azufre (Fe-S). También cumplen funciones críticas en la regulación homeostática del Ca^{2+} , cobre, manganeso y hierro. Además, las mitocondrias son fuentes de EROs que pueden ser, dependiendo de su concentración, citotóxicas o cumplir funciones como moléculas de señalización (Hamanaka & Chandel, 2010). Dado su rol fundamental en numerosos procesos, se puede decir que la disfunción mitocondrial puede provocar eventos celulares adversos relacionados con el estrés crónico, incluido el estrés oxidativo, la inflamación, la desregulación epigenética, la expresión genética alterada y la senescencia celular (Duchen y cols, 2004).

La mitocondria ha sido descrita en una primera instancia como el sitio subcelular donde se realiza la fosforilación oxidativa, es decir, la síntesis química de ATP acoplada a la transferencia electrónica a través de la cadena de transferencia de electrones (CTE), hasta el último aceptor, el oxígeno.

Estructuralmente, estas organelas están formadas por dos membranas con funciones y estructuras muy diferentes. La membrana mitocondrial externa (MME) tiene una superficie lisa y es fácilmente permeable a iones y pequeñas moléculas, ya que posee canales transmembrana compuestos por porinas, las que permiten que atraviesen fácilmente la mayoría de las moléculas con un peso molecular de menos de 5000 Da. Los canales aniónicos dependientes del voltaje (VDAC) son porinas sensibles al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) que permiten el intercambio de

metabolitos entre la mitocondria y el citosol. En cambio, la membrana mitocondrial interna (MIM) es impermeable a la mayoría de las moléculas e iones, incluidos los H^+ , siendo las únicas moléculas que atraviesan la membrana interna aquellas para las que existen proteínas transportadoras específicas (transportadores de ADP, ATP, ácidos carboxílicos, aminoácidos, Ca, entre otros). Esta propiedad provee la base para la transducción de energía en la mitocondria, ya que la permeabilidad selectiva permite compartimentar los intermediarios y enzimas de las rutas metabólicas que ocurren en el citosol de los procesos metabólicos que ocurren en la matriz mitocondrial (MM). La MMI también posee numerosas invaginaciones llamadas crestas, que proporcionan una mayor superficie en relación al volumen mitocondrial, permitiendo el anclaje de los complejos de la CTE y su ensamblaje. Esta membrana contiene como proteínas constitutivas a los componentes de la cadena respiratoria (Complejos I al IV) y al complejo enzimático FoF_1 -ATPasa (Complejo V o ATP-asa) responsable de la síntesis de ATP.

Entre ambas membranas queda conformado un compartimento denominado espacio intermembrana (EIM), que proporciona el lugar físico hacia donde son bombeados los H^+ provenientes de los complejos I, III y IV, para luego ser ingresados a la matriz mitocondrial mediante la ATP-asa. La extrusión asociada de H^+ desde la matriz mitocondrial genera un gradiente de pH y una diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) a través de la MIM, que en conjunto constituyen la fuerza protomotriz esencial para la síntesis de ATP y para el transporte de iones y otras moléculas.

Bajo condiciones normales, la tasa de oxidación de NADH a NAD^+ a través de la CTE está restringida por la demanda celular de ATP, empleándose mecanismos para acoplar la demanda de ATP a la oxidación de sustratos, por ejemplo, por regulación de la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs que controlan el suministro de NADH a la CTE. Sin embargo, hay condiciones en las que es beneficioso para la célula disminuir el acoplamiento estricto de la oxidación de sustratos y síntesis de ATP, proceso que se realiza a través de proteínas de desacoplamiento (UCPs), que conforman canales que disipan el $\Delta\Psi$ al permitir la fuga controlada de protones a través la MMI y, por lo tanto, permitir que la transferencia electrónica ocurra la restricción de la utilización de ATP.

El otro compartimiento, la MM, está rodeada por la membrana interna y contiene aproximadamente el 50% de proteínas de la organela, experimentando grandes cambios de volumen y organización durante la actividad respiratoria. Se encuentran, por ejemplo, el complejo piruvato deshidrogenasa, enzimas del ciclo del ácido cítrico, enzimas de la oxidación de ácidos grasos y oxidación de aminoácidos. También contiene el ADN mitocondrial, ribosomas, ATP, ADP, fosfato inorgánico (Pi), e iones como Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ .

Cadena de Transferencia Electrónica

La CTE, consiste en una serie de proteínas de membrana que actúan secuencialmente, con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar uno o dos electrones. Cada componente de la cadena acepta electrones del transportador precedente y se los transfiere al siguiente en una secuencia específica. Estos transportadores mitocondriales de electrones funcionan dentro de complejos proteicos multienzimáticos: Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa), Complejo IV (citocromo oxidasa) y Complejo V (F_1F_0 -ATPasa). La acción combinada de los complejos I, III y IV dan lugar a la transferencia de electrones desde el NADH al oxígeno, que es el aceptor final; en cambio, los complejos II, III y IV desde el succinato al oxígeno.

Complejos enzimáticos mitocondriales

El complejo I es el complejo enzimático más grande de la CTE. Presenta una forma en "L" con un brazo inserto en la MIM y el otro que sobresale hacia la MM. Utiliza como sustratos malato y glutamato, uniendo NADH en la zona distal de la región hidrofílica y transfiere dos electrones, en pasos sucesivos, a través de las flavinas-mononucleótido (FMN) y siete dominios hierro-sulfuro (Fe-S) a la ubiquinona, unida en la interfase entre los dos brazos del complejo. La energía de oxidorreducción de la ubiquinona se utiliza para inducir un cambio conformacional en el complejo que permite el bombeo de cuatro H^+ hacia el EIM.

El complejo II, también conocido como succinato deshidrogenasa (SDH), se encarga de la oxidación de succinato en fumarato, generando flavín adenín dinucleótido (FADH₂). Transfiere los electrones a través de tres dominios Fe-S a la ubiquinona, transformándola en ubiquinol. El complejo II representa el punto de encuentro entre el ciclo de Krebs y la cadena electrónica mitocondrial, siendo el único complejo que no participa en la generación del $\Delta\Psi_m$, al no poseer estructuras que atraviesen la MIM y no bombear H⁺ hacia el EIM.

El complejo III presenta una estructura dimérica y está compuesto por grupos hemo y Fe-S. Es el responsable de la oxidación de ubiquinol en ubiquinona a través de un intermediario inestable, semiquinona. Realiza dos transferencias de un electrón cada una hacia el cit *c*, bombeando cuatro H⁺ al EIM.

El complejo IV es el eslabón final en la cadena de transferencia electrónica, recibiendo los electrones del citocromo *c* y transfiriéndolos al oxígeno, que se reduce formando 2 moléculas de agua (esta reducción requiere de 4 electrones). Por cada par de electrones que se transporta a partir del complejo IV, se translocan dos H⁺ desde la MM hacia el EIM, contribuyendo de esta manera a la síntesis de ATP en el complejo V (Lodish y col., 2002). La enzima citocromo oxidasa se presenta como un dímero que está unido en forma estable a la MIM (Mills y Ferguson-Miller, 2003).

La F₁F₀-ATP sintasa, F₁F₀-ATPasa o complejo V produce la mayoría del ATP celular en eucariotas y en bacterias. La ATP sintasa utiliza el potencial electroquímico generado por los complejos de la cadena respiratoria para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi utilizando como fuerza impulsora el gradiente de H⁺ generado durante la transferencia electrónica. Por otra parte, según las condiciones de la fuerza protomotriz, este complejo puede funcionar como ATP sintasa (síntesis de ATP) o ATPasa (hidrólisis de ATP), dicha regulación está determinada por la disponibilidad de los sustratos ADP y Pi, así como por el potencial electroquímico (Hase y cols, 1996). El complejo ATP sintasa se organiza en dos regiones estructural y funcionalmente distintas: un dominio de membrana (porción F₀), que participa en la translocación de iones (H⁺ o Na⁺) y está compuesto básicamente por dos subunidades (a y c); y un dominio que queda expuesto a la MIM (porción F₁), que contiene los sitios catalíticos

(Deckers-Hebestreit & Altendorf, 1992); estos dominios se encuentran unidos a través de un tallo central y un brazo periférico.

En cuanto a la síntesis de ATP, estudios funcionales y estructurales han mostrado que el canal de protones F_0 y la porción catalítica F_1 se acoplan estructural y funcionalmente, en donde los H^+ atraviesan la membrana por un hemicanal formado entre las subunidades a y la subunidad c, provocando el giro del anillo de proteolípidos formado por la subunidad c. Esta rotación hace girar al tallo central en movimientos sucesivos de 120° , provocando cambios conformacionales alternados consecutivos en las subunidades catalíticas e induciendo la unión de los sustratos, así como la síntesis y la liberación del ATP (Yasuda y cols, 1998).

Aunque normalmente se describe la transferencia electrónica como un proceso paso a paso, la organización y la estequiometría de los componentes respiratorios no está realmente clara. Han sido demostradas interacciones entre los diferentes complejos para formar estructuras denominadas supercomplejos respiratorios o respirasomas (Schägger & Pfeiffer, 2000). Se ha purificado una variedad de supercomplejos, dando lugar a un modelo de organización con relativa plasticidad (Wittig y cols, 2006).

Teoría quimiosmótica y fuerza protomotriz

Como se mencionó previamente, los complejos I, III y IV funcionan como bombas de H^+ y los movimientos de H^+ ocurren en una dirección específica, desde la MM hacia el EIM, generando entonces una diferencia de cargas con el consecuente gradiente electroquímico, siendo positiva en el lado de la MIM en contacto con el EIM (con exceso de H^+ , pH = 7.0) y una cara negativa de la MIM en contacto con la MM (con defecto de H^+ , pH = 7.8). Este gradiente electroquímico de H^+ constituye la fuerza protomotriz (Δp), cuyos componentes son la diferencia en la concentración de H^+ (ΔpH) y del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi$).

Por lo antes descripto, podría resumirse que el transporte de electrones mitocondrial está acoplado a la síntesis de ATP, y genera un gradiente de H^+ a través de la MIM que constituye la fuerza molecular responsable de la formación de ATP a partir

de ADP y de Pi, por la acción de la F₁-ATPasa. Es decir, $\Delta\Psi$ lleva a la síntesis de ATP, como consecuencia del flujo pasivo de H⁺ hacia la MM a través de un poro de H⁺ (F₀) asociado a la ATPsintasa (Mitchell, 1961, 2011). Por otro lado, el $\Delta\Psi$ es también utilizado para la homeostasis del Ca²⁺ citosólico que es acumulado en la MM, ya que el pH relativamente alto (pH = 7.5-7.8) estabiliza al Ca²⁺ que forma compuestos con ácidos orgánicos y con aniones fosfato.

El acoplamiento entre la extrusión de H⁺ y la síntesis de ATP no es perfecto, debido a que la impermeabilidad de la MIM a los H⁺ no es total; parte de los H⁺ vuelven a la MM sin pasar por la F₁-ATPasa y sin generar ATP, en un proceso denominado “la entrada pasiva de H⁺” (*H⁺ leak* en inglés). y ha sido propuesto que este proceso tiene un papel en el gasto energético correspondiente al metabolismo basal. A su vez, aproximadamente una fracción (1%-2%) de los electrones que pasan a través de la cadena respiratoria se desvían para generar EROs, principalmente O₂^{•-}, evento que constituye la principal fuente endógena de estrés oxidativo en muchos tipos de células. Los sitios principales de EROs formación en la cadena de transporte de electrones son los complejos I y III. Este aspecto será abordado en profundidad en el capítulo 4. La **Figura 30** ilustra la CTE en el contexto mitocondrial.

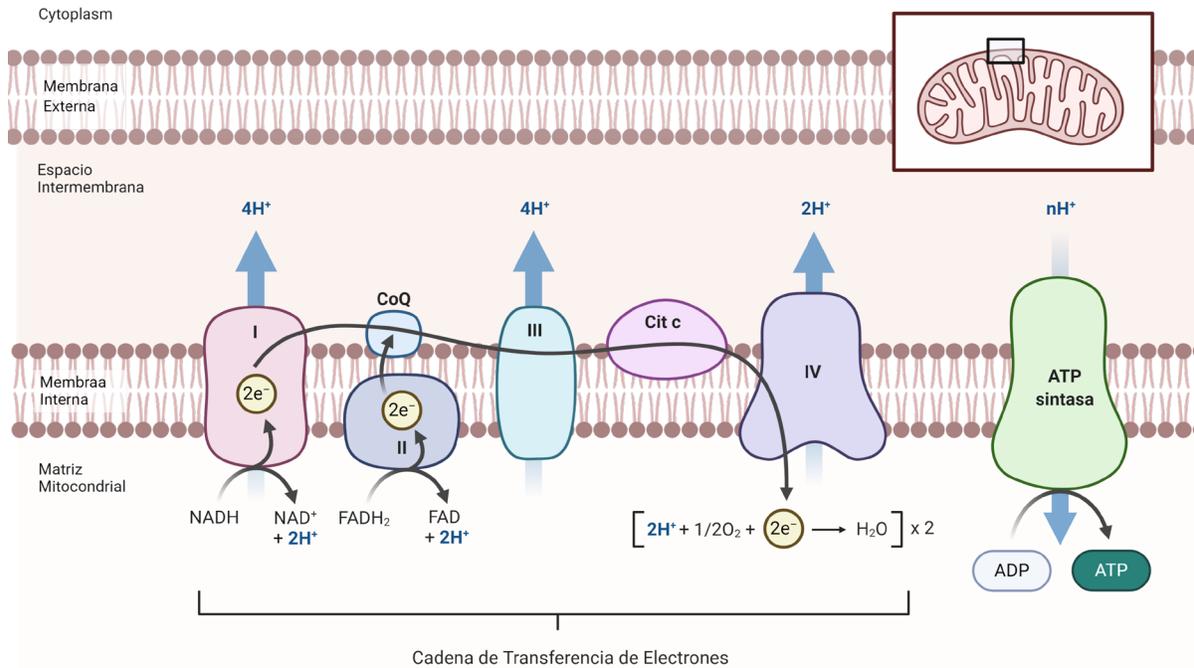


Figura 30. Esquema de la organización de la estructura mitocondrial e ilustración de los complejos proteicos que conforman la CTE. Realizada con Biorender.

Las mitocondrias también son capaces de aumentar la eficiencia de la fosforilación oxidativa regulando su dinámica de acuerdo a los requerimientos energéticos de la célula. Brevemente, la dinámica mitocondrial implica eventos de fisión y de fusión. La fusión está mediada por las mitofusinas, GTPasas relacionadas con dinamina (Mfn1y Mfn2) y atrofia óptica 1 (OPA1), que inducen fusión de membranas de la organela, con el objetivo de aumentar la superficie mitocondrial y restablecer la eficiencia de la fosforilación oxidativa. La fisión es realizada por la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1), que es reclutada por la proteína Fis1 a la membrana mitocondrial para contraer mitocondrias induciendo su división en caso, por ejemplo, de división por mitosis o en respuesta a diferentes estímulos (Eisner y cols, 2018).

A continuación, se abordarán las evidencias más relevantes que describen los mecanismos de toxicidad de Pb y EtOH en diversos procesos de la funcionalidad mitocondrial.

Toxicidad de plomo en la mitocondria

Como se ha mencionado, las mitocondrias son la fuente principal de EROs en la mayoría de los tipos de células de mamíferos y son responsables de la producción del 60-80% del H_2O_2 en células en condiciones basales y esos porcentajes pueden incrementarse en condiciones patológicas y a través de la inhibición de los complejos de la CTE.

La actividad neuronal depende casi exclusivamente del ATP que se genera en la mitocondria. A este respecto, varios estudios han demostrado que el Pb induce efectos neurotóxicos tales como apoptosis, excitotoxicidad, incrementa los niveles de EROs produciendo estrés oxidativo y daño a las mitocondrias de neuronas y también de células gliales. La exposición a Pb en etapas de desarrollo temprano desencadena cambios estructurales patológicos en las sinapsis, tales como hinchazón (*swelling* en inglés) de terminales nerviosos, formación de sinapsis deficientes y difusas, como así también la acumulación de vesículas en la pre-sinapsis. También se ha evidenciado en animales tratados con Pb, elongación (fusión) de las mitocondrias neuronales y pérdida de integridad de las crestas mitocondriales, viéndose modificada la dinámica mitocondrial, lo que lleva a una ineficiente transferencia electrónica y a una menor producción de ATP (Gąssowska y cols, 2016).

Está descripto, principalmente en estudios realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata, que Pb produce deterioro indirectamente al disminuir la expresión del uniportador de calcio mitocondrial, desestabilizar la homeostasis del calcio intracelular, promover un aumento del daño al ADN, y activar las quinasas redox-sensibles al incrementar los niveles de EROs.

En un estudio realizado por Ma y cols, se investigó acerca de los efectos de la exposición a Pb (dosis entre 10-160 μM) en la funcionalidad de las mitocondrias de hígado. Se evidenció que Pb inhibió las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios mitocondriales, siendo el complejo III la principal fuente de EROs. Demostraron también que Pb indujo un aumento significativo en la peroxidación lipídica, deterioro en la fosforilación oxidativa y oxidación y pérdida de las reservas de GSH. Por otro lado, Pb indujo cambios marcados en la transición de la permeabilidad

mitocondrial (MPT) acompañados de hinchazón mitocondrial, colapso del $\Delta\Psi$, disminución de la fluidez de la membrana mitocondrial y liberación del citocromo c. Esta serie de eventos demostró tener un papel clave en toxicidad hepática inducida por Pb, pero fue observada principalmente a dosis elevadas (40-160 μM). Sin embargo, a una dosis de 10 μM de Pb se observó una disminución en la producción de ATP debido a una inhibición parcial de los complejos de la CTE, sin cambios evidentes en la producción de EROs ni disminución de las reservas antioxidantes (Ma y cols, 2017).

Las mitocondrias conforman entonces un importante sitio diana intracelular para Pb y estos procesos han sido propuestos como parte de su multifactorial mecanismo de toxicidad.

Toxicidad de etanol en la mitocondria

Diferentes estudios muestran que los efectos tóxicos que EtOH ejerce podrían atribuirse a la disfunción en la homeostasis mitocondrial. Las proteínas mitocondriales son en sí mismas blanco de EROs, y la regulación mitocondrial del balance oxidativo tiene consecuencias tanto para el metabolismo energético celular como para los procesos que controlan el inicio y la progresión de la respuesta de muerte celular, ya sea que resulte en apoptosis o necrosis o algún otro tipo de muerte celular (Manzo-Avalos y cols, 2010).

La exposición aguda a EtOH produce un aumento de EROs y disminución de las reservas antioxidantes celulares, lo que da lugar a los primeros efectos deletéreos sobre la mitocondria culminando con la disminución en la producción de ATP. Todos estos eventos pueden desencadenar posteriormente muerte celular mediante apoptosis. Así, ha sido reportado en diferentes estudios que involucran distintos esquemas de consumo de EtOH, que la disfunción mitocondrial podría ser uno de los mecanismos principales por los cuales EtOH ejerce sus efectos neurotóxicos.

Existe evidencia de que el EtOH produce alteraciones en la estructura y función mitocondrial de varios órganos, incluidos el hígado y el corazón, tanto en animales como en humanos, con afección de la función mitocondrial por disminución de la eficiencia respiratoria y los niveles de ATP, lo que podría resultar en una mayor

producción de EROs (Albano, 2002). Varios sistemas enzimáticos, incluidas las CYP2E, la CTE y las enzimas citosólicas XOs han sido implicadas como fuentes O_2^- y H_2O_2 en células parenquimales durante la intoxicación por EtOH y muestran que los niveles mitocondriales de EROs pueden aumentar por el consumo crónico de EtOH como consecuencia del aumento de los niveles de CYP2E1 mitocondrial (Robin y cols, 2005).

En otros estudios, se demostró una disminución en varios mecanismos antioxidantes en el hígado causada por el aumento de los niveles de EROs y ARN durante la exposición crónica al EtOH y la reducción del GSH mitocondrial, lo que hace a la mitocondria más susceptible al daño oxidativo y precede al desarrollo de disfunciones mitocondriales, como la peroxidación de lípidos y el deterioro de la síntesis de ATP (Hirano y cols, 1999).

También se ha observado una marcada disminución en la actividad enzimática y las concentraciones de proteínas inmunorreactivas de Cu/Zn SOD, CAT y GPx lo que sugiere que el EtOH podría interferir a nivel postranscripcional con la síntesis de enzimas antioxidantes o podría estimular su degradación intracelular (French y cols, 2001).

En un modelo de *binge-drinking* mediante la administración i.p de 3g/kg/2 días de EtOH, a partir del día posnatal 25 (ratas peri adolescentes) durante dos semanas Tapia-Rojas y cols, muestran que la exposición a EtOH desencadena alteraciones en la estructura y función de las células del hipocampo. Cuando los animales fueron sacrificados a 1, 3 o 7 semanas después del tratamiento, se evidenció un aumento de proteínas oxidadas en una semana después del tratamiento, que posteriormente se restauró a las 3 y 7 semanas después del protocolo de exposición. Además, se vieron afectadas las proteínas que participan en la regulación de la dinámica mitocondrial. La administración de EtOH alteró los niveles de proteínas Drp1, Fis1, Mfn1, Mfn2 y Opa1, lo que sugiere que el consumo de EtOH similar al *binge drinking* promueve un estado de desbalance hacia la fisión mitocondrial entre 1 y 3 semanas después de la administración. Si bien se restauró parcialmente el desequilibrio de la dinámica mitocondrial a las 7 semanas después del tratamiento con EtOH, las proteínas involucradas siguen evidenciando una reducción en comparación con los controles. También se informó una disminución en la producción de ATP a partir de la semana 3,

lo que indica una falla mitocondrial bioenergética específica inducida EtOH que persiste en el tiempo. A pesar del daño presente en el hipocampo de estos animales, en este estudio también se detectó la activación de un mecanismo que posiblemente podría proteger el cerebro, que incluyen la disminución de la expresión de proteínas que son clave para la formación de MPTP, como el VDAC y el aumento de los niveles de Nrf2, que estaría regulando la expresión de enzimas antioxidantes, antiinflamatorias y desintoxicantes para prevenir el deterioro mitocondrial. El aumento se observó principalmente a las 3 y 7 semanas, lo que sugiere que esta vía de señalización podría estar involucrada en la restauración del equilibrio redox (Tapia-Rojas y cols, 2018).

Estudios recientes también consideran el rol del ACD como nocivo para la funcionalidad mitocondrial. Al respecto, Yan y cols en 2020, demostraron que la exposición a ACD altera la morfología mitocondrial en células SH-SY5Y modificando las proteínas encargadas de mantener la dinámica de fusión/fisión. Así, ACD promueve la fosforilación de Drp-1 induciendo la fragmentación mitocondrial con pérdida de la capacidad respiratoria con aumento del Ca^{2+} intracelular (Yan y cols, 2020). Este mecanismo cobra relevancia ya que, en el contexto de este trabajo de tesis, la exposición a Pb y EtOH conduce a una menor actividad y expresión proteica de ALDH2 lo que podría generar una acumulación de ACD.

Sobre la base de esos antecedentes, en este capítulo nos propusimos realizar una evaluación de la funcionalidad mitocondrial en un contexto de baja expresión y actividad de ALDH2, en presencia concomitante de Pb y EtOH.

Materiales y métodos

Estimación de la masa mitocondrial

Con el objetivo de cuantificar la masa (redes) mitocondrial se empleó Mitotracker Green FM como marcador de mitocondrias celulares. Para esto, las células fueron cultivadas en placas individuales de 3,5mm a una densidad de 10.000 células/cápsula. Al día siguiente las células fueron tratadas con Pb y EtOH 24 h según el protocolo previamente descrito. Luego, fueron incubadas con Mitotracker Green FM a una concentración de 50 nM durante 20 min a 37°C en incubadora con 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron lavadas una vez con PBS 1X y se observaron en un microscopio de fluorescencia con objetivo de 63X sumergible (AXIOPLAN).

Se obtuvieron entre 5 y 8 imágenes de cada condición y se analizaron al menos 15 células de cada grupo en 3 experimentos independientes. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software ImageJ.

Determinación de la respiración celular y mitocondrial

La respirometría mitocondrial en cámara cerrada se obtiene a partir de la tasa de concentración de oxígeno, que disminuye a medida que la muestra biológica lo consume. Se han utilizado electrodos (como el electrodo de Clark) para medir la concentración de oxígeno y han llevado a una comprensión íntima de la función respiratoria mitocondrial. Aunque estos electrodos siguen siendo una herramienta económica y útil para la evaluación de la respiración mitocondrial, las limitaciones incluyen señales inestables y ruido de fondo instrumental relativamente alto. Los sistemas de respirometría Oroboros 2k (Oroboros Oxigraph 2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) incorporan cámaras de reacción cerradas y herméticas, con todos sus componentes, vidrio y polímeros, de baja permeabilidad al oxígeno lo que minimiza la retrodifusión y las sobreestimaciones de la respiración. También cuenta con sensores capaces de detectar cambios de oxígeno con un ruido mínimo, maximizando la sensibilidad respirométrica y la precisión con la mínima fuga de O₂ y electrodos altamente sensibles. Los avances del software Datlab en las derivaciones de flujo de los

cambios en el O₂ de la cámara también permiten informes de la cinética respiratoria en tiempo real, lo que mejora y facilita los análisis de datos.

Parámetros a determinar en el ensayo de consumo de oxígeno: inhibidores de los complejos de la CTE

En medios sin sustratos energéticos (por ejemplo, ADP), la respiración se rige por la concentración de los sustratos endógenos celulares. En esas condiciones, la demanda de energía fisiológica, el recambio energético y el grado de acoplamiento (desacoplamiento intrínseco y desacoplamiento patológico) controlan los niveles de respiración y fosforilación en el estado fisiológico *basal* de las células intactas.

Luego de establecidos y estabilizados los niveles de respiración basal, se desafían las células frente a oligomicina (oligo), que bloquea la síntesis de ATP mediante la inhibición de la porción F₀ de la ATP sintasa. En este estado *leak* o en reposo (análogo al estado 4), la respiración refleja el desacoplamiento intrínseco como compensación por la fuga de protones a la máxima fuerza protomotriz, el escape de protones (respiración desacoplada) y deslizamiento de electrones que conllevan hacia la producción de EROs. El monitoreo del *leak* debe limitarse a menos de 5 min para evitar efectos secundarios sobre el acoplamiento y la capacidad respiratoria (Fisher y cols, 2018). Consecutivamente, la determinación de la capacidad respiratoria máxima se evidencia parcial o totalmente por desacoplamiento experimental por titulación de un protonóforo, tal como el compuesto carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Este compuesto actúa causando el colapso del $\Delta\Psi$ a través de su capacidad de permeabilizar la MIM, generando la eliminación del equilibrio electroquímico en las bombas de protones (complejos CI, CIII y CIV), y la pérdida de la fuerza protomotriz. Al disiparse el gradiente de protones, estos ingresan a la MM por difusión a través de los poros generados por el FCCP. De esta manera, se estimula la respiración máxima como una medida de la capacidad de funcionamiento de la CTE en el estado no acoplado (en presencia de oligomicina, ATPasa inhibida) (Doerrier y cols, 2018; Gnaiger, 2014).

Está ampliamente descrito que, a medida que las células están expuestas a factores estresantes, las mitocondrias cuentan con una "capacidad de reserva", la cual proporciona la respuesta mitocondrial para responder a las mayores demandas de energía, preservar las funciones celulares y reparar o activar los mecanismos de eliminación de EROs (Nannelli y cols, 2018; Dranka y cols, 2010). Esta capacidad de reserva puede estimarse como la diferencia entre la capacidad respiratoria máxima (experimentalmente determinada durante la exposición a FCCP o desacoplantes) y la respiración en estado basal. Por último, se procede a exponer a las células a Rot, que inhibe el segmento NADH-coenzima Q reductasa (Complejo I) y antimicina A (AA), un potente inhibidor del sitio coenzima QH₂-citocromo *c* reductasa (Complejo III). Con ello se consigue determinar finalmente la respiración no-mitocondrial. Diferentes procesos pueden estar consumiendo oxígeno, como por ejemplo la producción excesiva de EROs y las enzimas NOX, son los que van a determinar un consumo aumentado de oxígeno en esta etapa final.

Titulación de la concentración de células por cámara de reacción

Con el objetivo de determinar la concentración adecuada de células en la cámara del Oroboros O2K, se procedió a realizar unas corridas de prueba con diferentes concentraciones celulares: 125.000 cels/ml, 250.000 cels/ml, 500.000 cels/ml y 1.000.000 cels/ml. en todos los casos se registró la respiración basal y la respuesta a inhibidores de los complejos de la CTE (Evinova y cols, 2020).

Titulación de la concentración de FCCP a utilizar

Una vez seleccionada la cantidad de células por ml en la cámara de reacción, se procedió a realizar una titulación con concentraciones crecientes del desacoplante FCCP para evitar la inyección de niveles que provoquen depresión respiratoria y no permitan evidenciar posibles cambios en la respiración.

Para ello, 500.000 cels/ml de medio se colocaron en la cámara de reacción. Se estableció la respiración basal, luego en respuesta a oligomicina y se comenzó la titulación adicionando, en intervalos de 30 s, alícuotas de 1 µl de solución de FCCP 0,02

mM, escalando luego a adiciones de 1 μ l de solución de FCCP 0,05 mM; 0,2 mM, 0,5 mM y finalizando con inyecciones de 1 μ l de FCCP 1 mM hasta encontrar la concentración máxima tolerada por el sistema, en donde se observa una disminución en el consumo de oxígeno por pérdida de la fuerza protomotriz debido a la acción del protonóforo.

Determinación del consumo de oxígeno mediante oximetría

El ensayo de consumo de oxígeno mitocondrial se llevó a cabo de la siguiente manera: las células SH-SY5Y se expusieron a Pb y EtOH durante 24h. Transcurrido ese tiempo, la respiración de la suspensión de 500.000 cels/ml se midió a 37°C mediante respirometría de alta resolución utilizando un oxígrafo Oroboros®. Se empleó el software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) para la adquisición de datos (intervalos de 1 o 2 s) y el análisis posterior.

El régimen experimental se inició con el estado de rutina (*routine*) o de respiración basal (respiración sin sustratos adicionales ni efectores), permitiendo a las células respirar libremente en constante agitación, suspendidas en medio DMEM sin SFB. Después de inhibir la actividad de la ATP sintasa con oligomicina (1 μ g/ml), se determinó la respiración para detectar el nivel de la etapa *leak*, que responde al estado de respiración independiente de la fosforilación de ADP, y se produce principalmente debido a la fuga de protones hacia el EIM. Luego, la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones (respiración máxima) se obtuvo desacoplando la fosforilación oxidativa mediante titulación escalonada con FCCP. Finalmente, la adición de Rot (0,5 μ M) y A-A (2,5 μ M) inhibió la actividad de los complejos I y III respectivamente. El estado resultante proporciona una medida del consumo de oxígeno residual (Hall y cols, 2013). La **Figura 31** ilustra la CTE con los inhibidores específicos de cada complejo proteico utilizados en este trabajo.

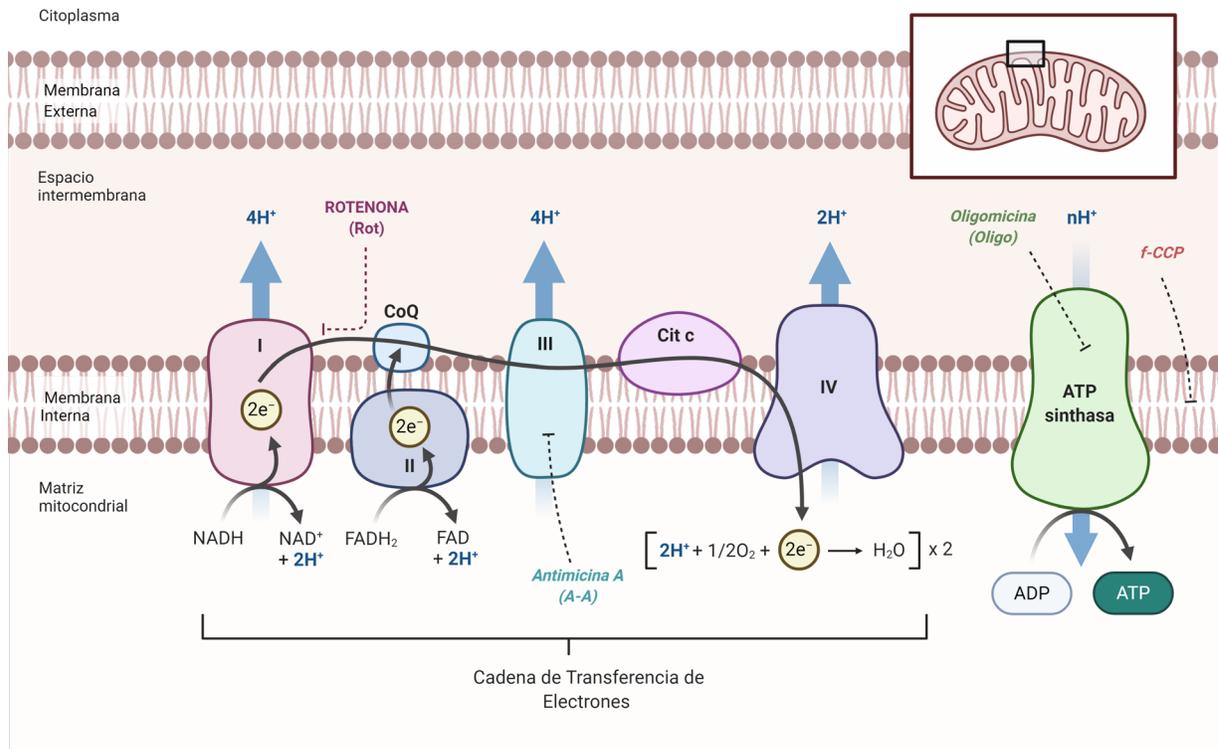


Figura 31. Cadena de transferencia de electrones. Se esquematizan los efectos de los inhibidores sobre los diferentes complejos mitocondriales. Realizada con Biorender.

Determinación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

Se ha descrito que la sonda fluorescente JC1 ingresa a las células y se establece un equilibrio entre la forma monomérica (verde) y la forma agregada (rojo). En condiciones basales en células saludables, JC-1 forma en su mayoría agregados que se visualizan de color rojo (abs: 595nm). En células con déficit funcional mitocondrial prevalecen los monómeros verdes de JC-1 (abs: 530nm). El cociente entre JC-1 agregado/JC-1 monomérico puede calcularse y de esta manera establecer cualitativamente si hay cambios en el $\Delta\Psi$ debido al tratamiento con Pb y EtOH.

Para este objetivo se cultivaron células SH-SY5Y en cápsulas individuales de 3,5mm a una densidad de 10000 cels/cápsula. Al día siguiente las células fueron expuestas a Pb y EtOH durante 24 h. Luego, fueron incubadas con JC-1 a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos a 37°C en incubadora con 5% de CO_2 . Posteriormente los preparados se lavaron dos veces con PBS 1X y se observaron en un

microscopio de epifluorescencia con objetivo de 63X sumergible para obtener imágenes de las células vivas (AXIOPLAN, CIQUIBC, CONICET).

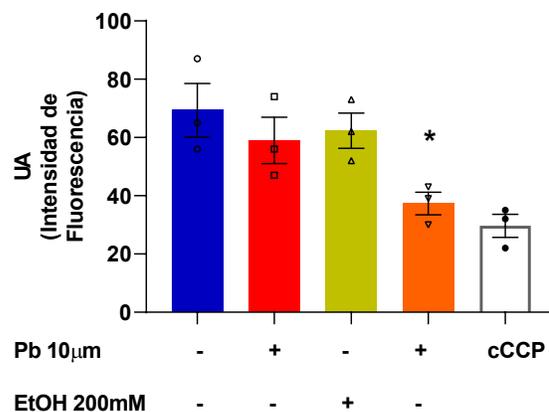
Se obtuvieron 5 a 7 imágenes de cada condición, analizándose entre 20 y 25 células, lo que equivale a un N=1. Se realizaron 3 experimentos independientes. Las imágenes fueron cuantificadas mediante la utilización del software ImageJ.

Resultados

Estimación de la masa mitocondrial

Se muestran en la **Figura 33** (panel A.) los resultados de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Mitotracker Green FM en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH durante 24h. Se observa un efecto sinérgico de la interacción entre ambos tóxicos, ya que sólo se evidencia una disminución significativa de la masa mitocondrial en el grupo expuesto a Pb y EtOH. ANOVA de una vía: $F_{(4,10)} = 6,804$; $p < 0,01$. El test de Tukey realizado como *post-hoc* reveló diferencia estadística significativa sólo en el grupo expuesto a ambos tóxicos respecto al control: C vs Pb +EtOH, $p < 0,05$.

A.



B.

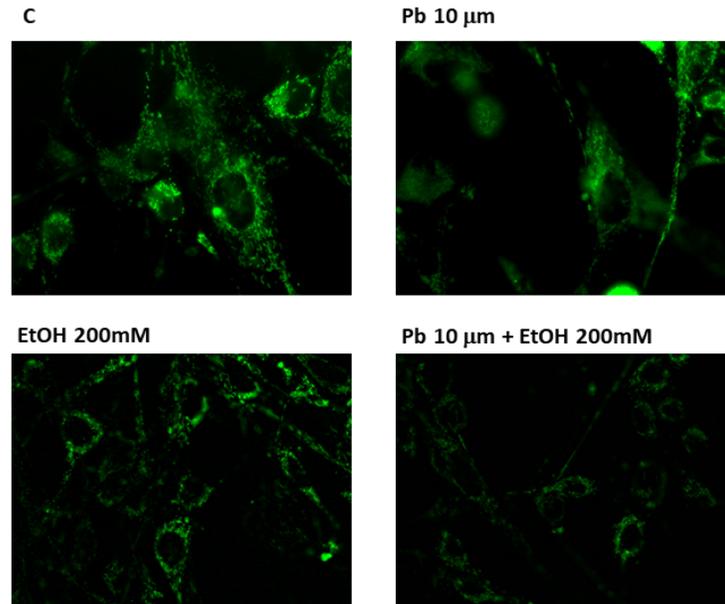
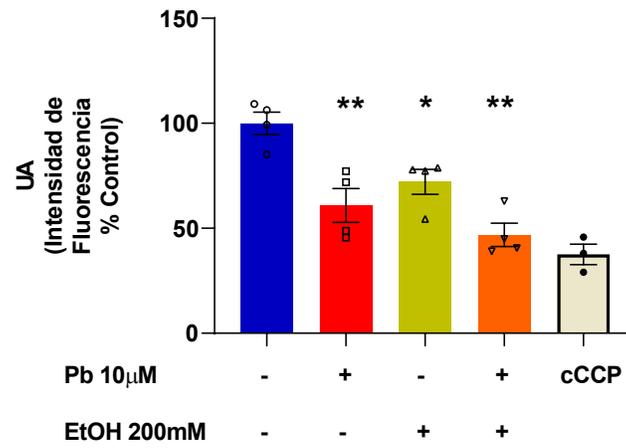


Figura 33. A. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Mitotracker Green FM. Los datos están graficados como la media de la intensidad de fluorescencia \pm SEM. * denota $p < 0,05$ respecto del grupo control. **B. Fotografías representativas de cada condición (63X)** de cada grupo experimental tratados con Mitotracker Green FM.

Evaluación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

En la **Figura 34** se observa la cuantificación de la relación de intensidad de fluorescencia roja y verde (rojo/verde) correspondiente a la sonda JC1. El ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como *post-hoc* arrojó diferencias significativas en los grupos Pb, EtOH y su combinación: $F_{(3, 12)} = 12,83$; $p < 0,001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,0001$. Estos resultados indicarían que ambos tóxicos producen daño mitocondrial al disminuir directamente el $\Delta\Psi$ de la organela. En el panel B de la **Figura 34** se muestran fotografías representativas de la fluorescencia de JC-1.

A.



B.

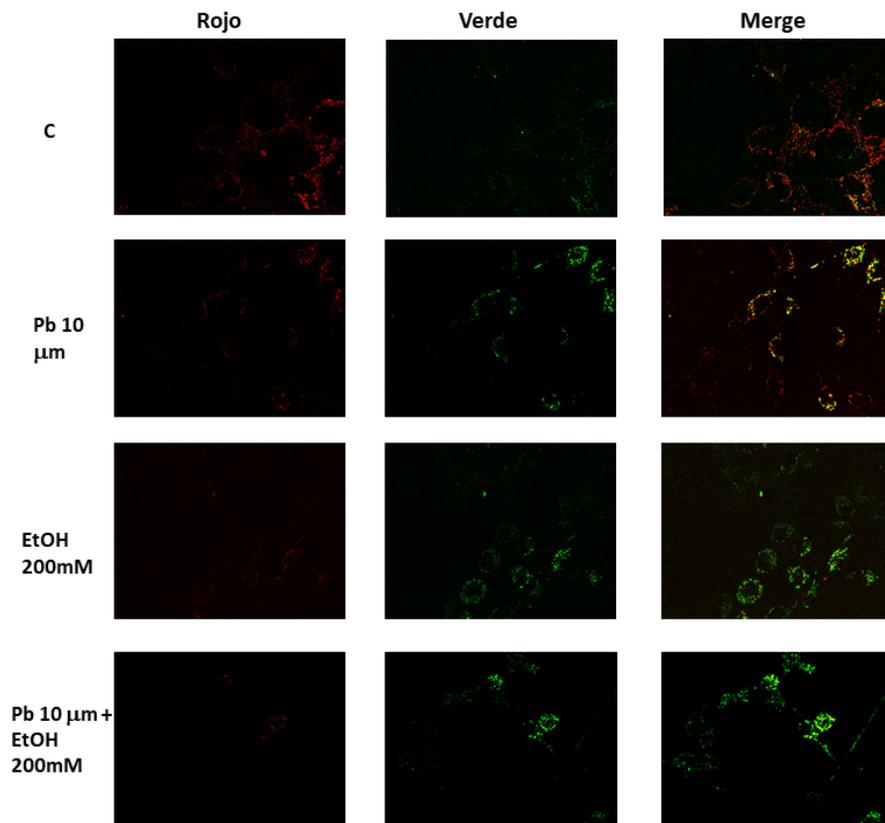


Figura 34. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial. A Cuantificación de la relación de intensidad de fluorescencia roja/verde de la sonda JC-1, por campo. Los datos están graficados

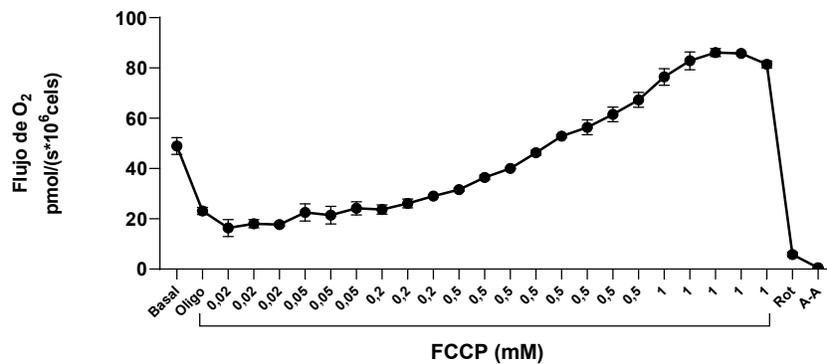
como porcentaje del control * denota $p < 0,05$ y ** denota $p < 0,001$ respecto del grupo control. **B.** Fotografías representativas de cada condición. (63X).

Consumo de oxígeno mitocondrial

Concentración elegida de FCCP

Como puede observarse en la **Figura 35** se realizó la titulación con FCCP para determinar la dosis máxima del protonóforo que genera un aumento en la respiración, a los fines de evitar utilizar concentraciones por sobre las cuales se evidencie ya una pérdida parcial o total de la capacidad respiratoria celular, y comience a disminuir el consumo de oxígeno. Previo a esto, se observa una meseta en el gráfico, quedando de manifiesto la falta de respuesta celular frente al agregado de FCCP (a concentraciones de 1 mM). Finalmente, luego de los cálculos referidos al volumen final de la cámara (2ml) y los moles totales de FCCP administrados durante la titulación, se arribó a la conclusión de que la concentración máxima de FCCP tolerada por el sistema es de $1,5\mu\text{M}$ ($0,0015\text{ mM}$) y determinada a partir de un stock de FCCP de concentración $7,5\text{mM}$ en cuatro o cinco pulsos de $0,1\mu\text{l}$ con inyección automática.

A.



B.

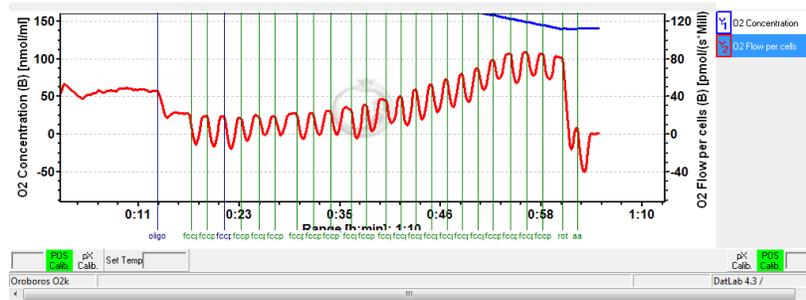


Figura 35. Titulación de la concentración de FCCP. A. Gráfico de los valores de consumo de oxígeno obtenidos durante los ensayos de titulación de la concentración de FCCP. **B.** Curva representativa del consumo de oxígeno de células SH-SY5Y controles durante la titulación de la concentración de FCCP.

Consumo de oxígeno de células SH-SY5Y en respuesta a inhibidores de los complejos de la CTE.

Se muestran a continuación los resultados correspondientes a la curva de consumo de oxígeno de células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH durante 24 h. Los valores de respiración basal, *leak* y capacidad máxima fueron corregidos mediante la supresión de los valores correspondientes a la respiración extra-mitocondrial (en respuesta a Rot – AA).

En la **Figura 36** se evidencia que la exposición a Pb, EtOH o su combinación producen una disminución de la respiración basal mitocondrial. El ANOVA de una vía seguido del test de Tukey como *post-hoc* arrojó diferencias: $F_{(3, 13)} = 9,552$; $p < 0,001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+ EtOH, $p < 0,01$.

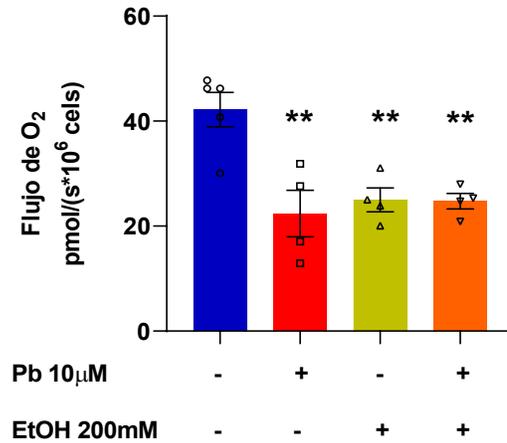


Figura 36. Consumo de oxígeno basal mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a Pb y/o EtOH durante 24hs. Se muestra graficada la media \pm SEM de la diferencia entre la respiración basal o de rutina y el consumo de oxígeno en respuesta a Rot+AA. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey como *post-hoc*. ** denota $p < 0,01$.

Se observan diferencias en el estado de fuga de protones (después de oligo) en el grupo expuesto a Pb, y un efecto más pronunciado luego de la exposición a EtOH o su combinación con Pb. El ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como *post-hoc*: $F_{(3,12)} = 35,66$; $p < 0,0001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,0001$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,0001$; Pb vs EtOH, $p < 0,05$; Pb vs Pb+EtOH, $p < 0,05$; (**Figura 37**).

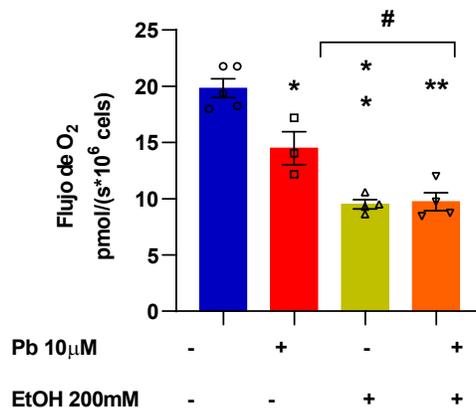


Figura 37. Leak o fuga de protones evidenciando el desacople de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Consumo de oxígeno (corrección por respiración no mitocondrial) en respuesta a oligo en células SH-SY5Y expuestas a Pb y/o EtOH durante 24hs. Se muestran graficadas las medias \pm SEM de cada

grupo. * denota $p < 0,05$ ** denota $p < 0,001$ respecto al grupo control. # denota $p < 0,05$ respecto del grupo Pb.

En relación a la respiración máxima evidenciada luego de la administración de concentraciones crecientes de FCCP, se puede observar que el efecto de la interacción Pb y EtOH disminuye la capacidad respiratoria máxima de las células, lo que puede significar una menor capacidad para responder a desafíos fisiológicos o eventos que representen una mayor demanda energética. ANOVA de una vía: $F_{(3, 12)} = 12,25$; $p < 0,001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,001$, (**Figura 38**).

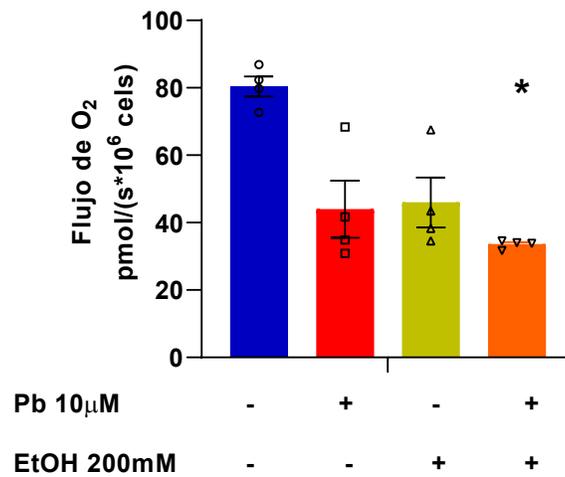


Figura 38. Capacidad respiratoria máxima. Consumo de oxígeno en respuesta a FCCP en células SH-SY5Y expuestas a Pb y/o EtOH durante 24h. Se muestran graficadas las medias \pm SEM de cada grupo.

Finalmente, se administraron Rot y A-A a la suspensión celular para evidenciar el remanente de respiración no-mitocondrial, donde se observaron diferencias en los grupos expuestos a Pb, EtOH y su combinación con respecto al grupo control (**Figura 39**). El ANOVA de una vía seguido del test de Tukey reveló diferencias: $F_{(3,13)} = 4,369$; $p < 0,05$; C vs Pb, $p < 0,05$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,05$. Este resultado pone de manifiesto el consumo de oxígeno aumentado por diferentes procesos que no responden a la fosforilación oxidativa propiamente dicha, como por ejemplo la producción de EROs y el consumo por parte de las enzimas NOx.

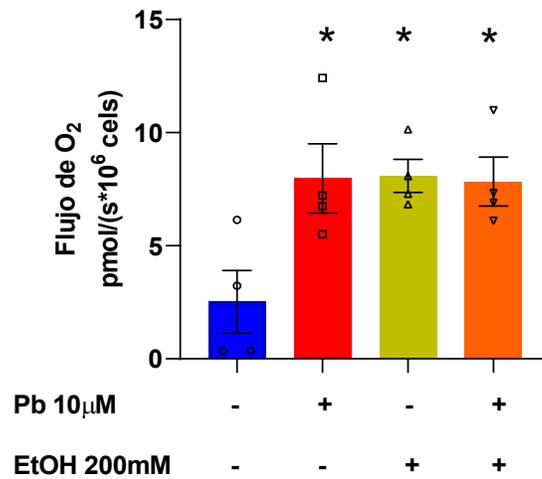


Figura 39 - Respiración no mitocondrial. Consumo de oxígeno en respuesta a rotenona y Antimicina-A en células SH-SY5Y expuestas a Pb y/o EtOH durante 24h. Se muestran graficadas las medias \pm SEM de cada grupo. **p <0,01 y *p <0,05 respecto al grupo control.

Por otra parte, al analizar la diferencia entre la máxima capacidad respiratoria celular y el consumo de oxígeno en estado basal se obtiene un parámetro que se conoce como capacidad de reserva mitocondrial (*spare capacity* en inglés), que representa la reserva energética que poseen esas mitocondrias para responder rápidamente a las demandas energéticas celulares. Puede observarse (**Figura 40**) una marcada disminución en dicha capacidad en células SH-SY5Y en respuesta a la exposición a Pb y EtOH. El ANOVA de una vía seguido del test de Tukey como *post-hoc* reveló diferencias significativas: $F_{(3, 13)} = 4,615$; $p < 0,05$. C vs Pb+EtOH, $p < 0,05$.

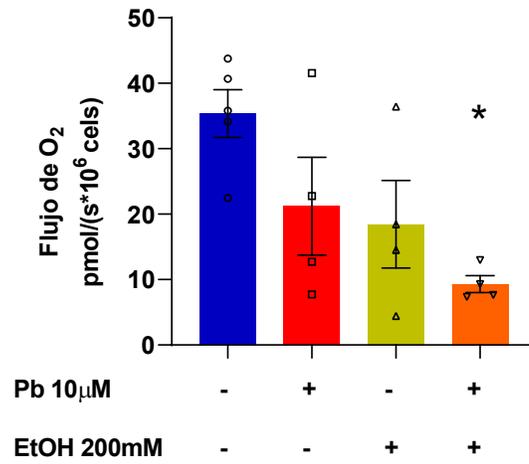


Figura 40 - Capacidad de reserva mitocondrial de células SH-SY5Y expuestas a Pb y/o EtOH durante 24hs. Se muestran graficadas las medias \pm SEM de cada grupo. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Discusión y conclusiones parciales

Los resultados presentados en este capítulo muestran una disminución de la respiración basal, capacidad máxima respiratoria y capacidad de reserva mitocondrial en células SH-SY5Y en respuesta a la exposición a Pb y EtOH. También se evidencia un déficit en la CTE, debido a que el tratamiento con oligomicina arrojó diferencias entre los grupos de tratamiento respecto al control. Al estar inhibida la actividad de la ATP-asa, el consumo de oxígeno registrado es resultado de la actividad de la CTE. Este déficit podría encontrarse en el complejo I debido a que EtOH genera un gran consumo de NAD⁺ para su metabolismo mediante la oxidación secuencial catalizada por las enzimas ADH y ALDH2.

De la misma manera, puede inferirse que la fosforilación oxidativa en relación a la producción de ATP se ve comprometida, ya que se evidencia una disminución significativa de la respiración mitocondrial en respuesta a oligo, indicando un desacople intrínseco de la CTE, desencadenando un proceso de transferencia electrónica deficiente, con una disminución del $\Delta\Psi$ y, por consiguiente, de la fuerza protomotriz. Además, se observan diferencias significativas en la respiración residual no-mitocondrial (post AA + Rot), demostrando el incremento del consumo de oxígeno por parte de otros procesos celulares, como la producción incrementada de EROs debido a la exposición a Pb y EtOH.

Los resultados presentados además demuestran la disminución de la capacidad de reserva mitocondrial resultante de la exposición a Pb y EtOH durante 24 h en células SH-SY5Y. En este contexto, la pérdida de la capacidad de reserva mitocondrial y los demás efectos observados en relación a la funcionalidad de esta organela evidencian una menor capacidad de respuesta celular ante mayores requerimientos energéticos y podrían deberse al estado de toxicidad generado por la disminución en la funcionalidad de la enzima ALDH2, como consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos, como el ACD y la generación de un entorno oxidante en la célula como se discutirá en el próximo objetivo. Alternativamente, la disfunción mitocondrial podría tener un impacto negativo sobre la funcionalidad de la enzima debido al requerimiento de

disponibilidad de NAD⁺ para ejercer su función catalítica en condiciones óptimas, como fue discutido en el Capítulo 2 de este trabajo.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Nannelli y cols, que demostraron en cultivo de células endoteliales que la pérdida por silenciamiento génico de ALDH2, acelera la adquisición de un fenotipo de senescencia prematura que conduce a una disfunción endotelial. Estos eventos fueron asociados con un aumento en los niveles de EROs, acumulación de aductos de proteínas con 4-HNE y deterioro de las funciones bioenergéticas mitocondriales con pérdida de la capacidad de reserva mitocondrial (Nannelli y cols, 2018). Asimismo, Mali y cols, determinaron *in vitro*, en cultivo de cardiomiocitos, que el silenciamiento de ALDH2 lleva a muerte celular y disminución de la capacidad respiratoria (Mali y cols, 2016).

El daño acumulado en las biomoléculas provocadas por el ACD ejerce sus efectos tóxicos al inhibir las reacciones y funciones mitocondriales. Este compuesto puede dañar la función de la CTE, dando lugar a la producción de ROS, que pueden oxidar las subunidades de los complejos mitocondriales, provocando una lesión sobre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, por lo que disminuyen los niveles de ATP. Además, una producción aumentada de EROs puede provocar estrés oxidativo sobre los lípidos, lo que afecta la permeabilidad de las membranas mitocondriales. Estos permiten la apertura del MPTP y conducen a la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT), favoreciendo la translocación a las mitocondrias del factor proapoptótico Bax que forma un complejo con VDAC. El MPT extenso conduce a la inflamación o *swelling* de las mitocondrias y permite la liberación del citocromo *c*, lo que lleva a la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN, que son eventos clave para la inducción de la muerte celular programada o la apoptosis (Kim y cols, 2004). En apoyo a estas evidencias se ha descrito también que el tratamiento con ACD, el metabolito considerado responsable de los efectos neurotóxicos de EtOH indujo en células SH-SY5Y excesiva fragmentación mitocondrial y daño en la funcionalidad de la organela, acompañado de citotoxicidad (Yan & Zhao, 2020). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo, podemos sugerir que los efectos que evidenciamos en el modelo de exposición combinada a Pb y EtOH podrían deberse a la acumulación de ACD por inhibición de ALDH2.

Así, hemos demostrado eventos tempranos de disfunción mitocondrial, como lo son la disminución del consumo de oxígeno, el desacople parcial de la fosforilación oxidativa, la disminución en la capacidad máxima respiratoria con disminución de la capacidad de reserva y alteraciones del $\Delta\Psi$. Todos estos eventos conllevan a un desbalance bioenergético que podría culminar en muerte celular si el daño persiste en el tiempo y no es revertido.

Al ser las mitocondrias fuente principal de EROs, el siguiente capítulo tiene como objetivo indagar sobre el estado del balance oxidativo en este modelo experimental. Para ello, se abordará el estudio de marcadores específicos del estrés oxidativo en relación a la exposición a Pb y EtOH y su efecto sobre la enzima ALDH2.

Capítulo 4

Evaluación del estado redox de células SH-SY5Y expuestas a

Pb y etanol

Evaluación del estado redox de células SH-SY5Y expuestas a Pb y etanol

Balance oxidativo celular

El mantenimiento del estado de homeostasis redox en los seres vivos es fundamental para evitar el daño que producen las especies EROs o del nitrógeno (ERN), ya que ocasionan la pérdida del equilibrio entre moléculas reductoras y moléculas oxidantes originando un estado de estrés relacionado directamente con el deterioro celular. Para evitarlo, las células tienen sistemas antioxidantes que transfieren electrones a los radicales y los neutralizan y evitan así el daño a las macromoléculas biológicas resultantes de la oxidación. El sistema de defensa antioxidante tiene como objetivo principal mantener el proceso oxidativo dentro de los límites fisiológicos y sujeto a regulación, previniendo la propagación del daño oxidativo que puede culminar en daños sistémicos irreparables. El sistema de defensa enzimático incluye enzimas como SOD, CAT y GPx. Estas enzimas actúan a través de mecanismos de prevención y/o control la formación de radicales libres y especies no radicales, involucradas con el inicio de la cadena de reacciones que culminan en la propagación y amplificación del proceso y, en consecuencia, la aparición de daño oxidativo. Las enzimas CAT y GPx actúan con el mismo propósito, prevenir la acumulación de peróxido de hidrógeno.

La primera línea de la defensa antioxidante contra agentes exógenos incluye las enzimas implicadas en el metabolismo de fase I y II. El metabolismo de fase I es responsable del aumento de la polaridad del compuesto a través de la oxidación, reducción o reacciones de hidrólisis. El metabolismo de fase II, en cambio, facilita la exportación celular de esos compuestos; sus reacciones son principalmente glucuronidación, acetilación y sulfatación.

Las enzimas que componen el citocromo P450, como la ya mencionada CYP2E1, son las principales responsables de la oxidación de fármacos, productos químicos y diversos sustratos endógenos, como eicosanoides, colesterol, vitamina D3 y ácido araquidónico (Araújo y cols, 2016).

El sistema de transporte de electrones a través de la CTE es muy susceptible al estrés oxidativo. Durante este proceso, una fuga de electrones al último aceptor conduce a su unión al oxígeno, considerándose una fuente primaria de EROs. En este contexto, se considera la efectividad de la transferencia de electrones de NADPH a enzimas CYP para la monooxigenación de sustratos, como fuente de EROs porque durante el desacoplamiento, sin la presencia de ningún sustrato, la cadena de transferencia de electrones oxida NADPH y produce EROs. Durante el metabolismo de CYP2E1 se observa con frecuencia este tipo de reacciones de desacoplamiento, por lo que esta enzima está fuertemente asociada con la producción de EROs y el estrés oxidativo.

La glutatión S-transferasa (GST) forma parte de una familia de enzimas intracelulares que previenen la acción de toxinas endógenas y exógenas en las células. Las GST son enzimas multifuncionales que participan en la fase II del metabolismo xenobiótico y catalizan el ataque nucleofílico de la forma reducida de glutatión (GSH) a compuestos potencialmente peligrosos.

Las fuentes primarias de producción endógena de EROs son las mitocondrias, retículo endoplásmico y peroxisomas a través de una variedad de mecanismos que incluyen reacciones enzimáticas y/o autooxidación de varios compuestos, tales como catecolaminas e hidroquinona. Diferentes estímulos exógenos, como la radiación ionizante, los rayos ultravioletas, humo de tabaco, infecciones por patógenos, toxinas ambientales, y la exposición a pesticidas, son importantes fuentes de producción de EROs. La **Figura 41** esquematiza el balance entre la formación de EROs y los sistemas antioxidantes.

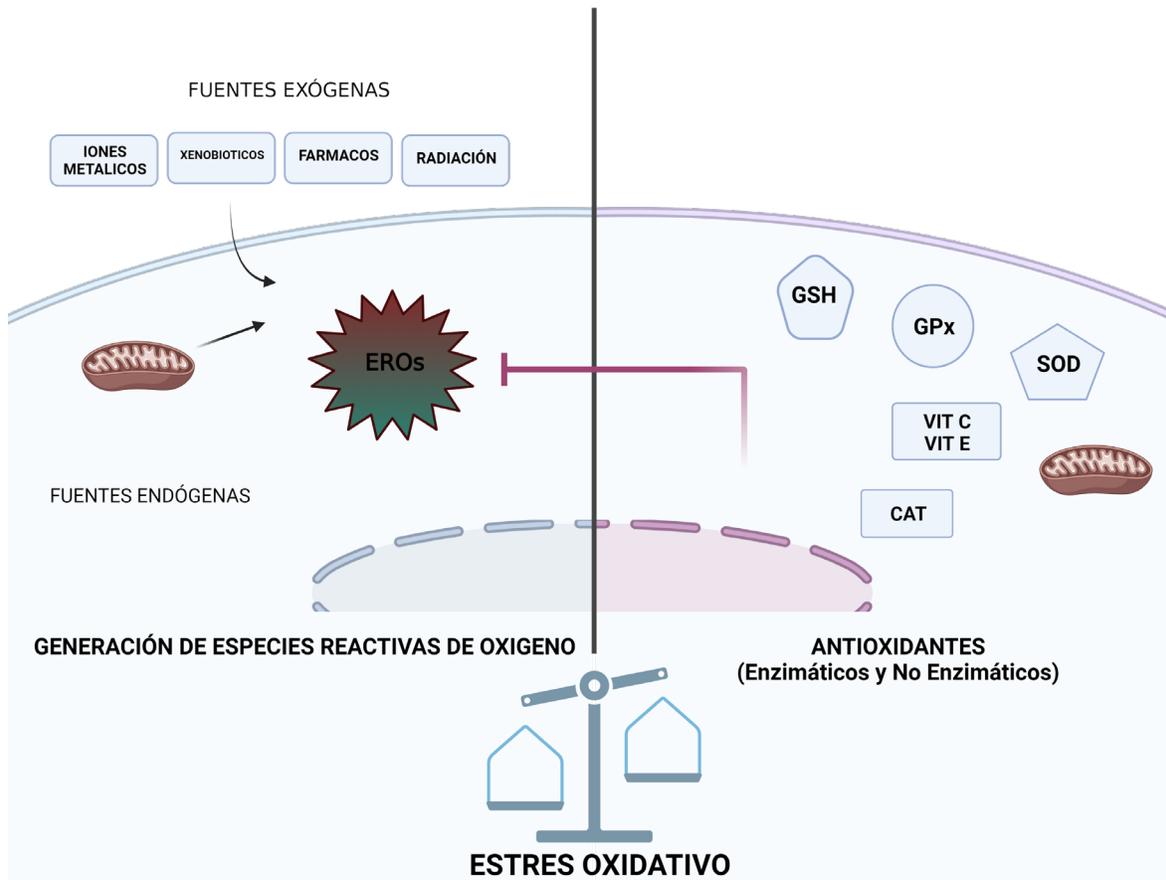


Figura 41. Estado de estrés oxidativo generado por el desbalance entre la producción excesiva de EROs y la depuración realizada por los sistemas antioxidantes. Adaptado de Reeg y cols, 2015.

Específicamente, en la mitocondria las EROs son generados por la enzima monoamino oxidasa y los CI y III; y en el citosol por NADPH oxidasa (NOX) y xantina oxidasa (XO). Esta producción de EROs es importante porque subyace al daño oxidativo en muchas patologías y contribuye a la señalización redox desde la organela hacia el citosol y el núcleo (Murphy, 2009). Los principales EROs incluyen el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), $\text{O}_2\cdot^-$ y H_2O_2 . Aunque este último no se considera un radical libre, es un intermedio importante en la generación de $\text{OH}\cdot$ tóxico a través de las reacciones de Fenton o Heber-Weiss, que requieren catión ferroso (Fe^{2+}) o catión cúprico (Cu^{2+}), respectivamente. El flujo de $\text{O}_2\cdot^-$ está relacionado con la concentración de donantes potenciales de electrones, la concentración local de O_2 y las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones entre ellos. Una incrementada producción de $\text{O}_2\cdot^-$ puede originarse (principalmente en el CI) cuando las mitocondrias no producen ATP y,

consecuentemente, tienen una fuerza protomotriz alta y un aumento en la concentración de grupo CoQH₂ (coenzima Q). Otra posibilidad es cuando hay una alta relación NADH/NAD⁺ en la MM (Cocheme & Murphy, 2008).

Así, el O₂^{•-}, formado rápidamente a partir de O₂ en cercanías de la MMI, se libera en la MM, principalmente en el complejo I y III y al EIM mediante el complejo III, pero también se genera a partir de flavoenzimas, NADPH oxidasa (NOx) o lipoxigenasas y ciclooxigenasas. Antioxidantes de tipo enzimático, como SOD, puede dismutar dos moléculas de O₂^{•-} para transformarlas en H₂O₂. Posteriormente, las enzimas CAT y GPx convierten H₂O₂ en H₂O. Estas enzimas, en conjunto con glutatión reductasa (GR) y peroxiredoxinas (Prxs), son los componentes principales del sistema antioxidante enzimático destinado a contrarrestar los daños moleculares por EROs (**Figura 42**).

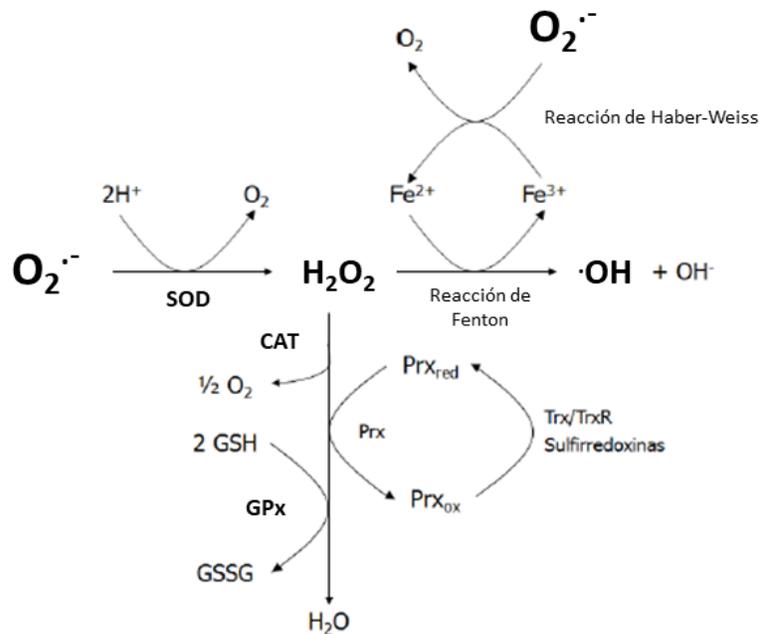


Figura 42. Producción y remoción de EROs. Adaptada de Lopez-Fabuel y cols, 2016.

Esta acción integrada es de gran importancia, dado que tanto CAT como GPx se encuentran implicadas en la eliminación de H₂O₂, se sugiere que CAT puede actuar como un mecanismo de defensa contra el exceso de H₂O₂, mientras que GPx actuaría predominantemente frente a concentraciones bajas o fisiológicas de H₂O₂.

Además, el péptido GSH es el compuesto derivado de tioles con menor peso molecular y con más abundancia que se sintetiza en las células. Tiene un rol clave en las defensas antioxidantes, protegiendo a las células contra los xenobióticos y manteniendo la homeostasis redox. Es el principal antioxidante no enzimático, particularmente en las mitocondrias, donde protege esta organela de la excesiva generación EROs. La mayor parte de GSH es utilizada por GPx y Prx6 para catalizar la reducción de H₂O₂.

Señalización mediante EROs

La señalización por EROs principalmente se encarga de la propia defensa celular frente al estrés oxidativo, reestableciendo la homeostasis redox. No obstante, presenta otras funciones fisiológicas, como la regulación de la vasculatura, control de la tensión de oxígeno, y la transducción de señales desde varios receptores celulares. El H₂O₂ ha sido el agente propuesto como un segundo mensajero en el proceso de señalización redox, puesto que presenta mayor estabilidad que el O₂^{•-}. Difunde a través de las membranas, y gracias al transporte mediado por las aquaporinas mitocondriales, está sujeto a un mayor grado de regulación. La oxidación reversible de Cys y metioninas constituye el principal mecanismo de señalización redox, en tanto que la modificación ejercida por el H₂O₂ sobre las Cys genera hidroxilación y los procesos de oxidación también pueden conducir a la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Dröge, 2002).

La señalización mediada por EROs es la responsable de la activación del factor transcripcional Nrf2, encargado de inducir la transcripción de genes antioxidantes, tales como HO-1 (hemo-oxigenasa 1), NQO-1 [NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1] o GCLc (glutamato cisteína ligasa catalítica). En condiciones basales, NRF2 se encuentra secuestrado en el citosol gracias a su unión a KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y Cul3 (culina-3). KEAP1 actúa como sensor de estrés oxidativo y adaptador de sustratos, permitiendo la interacción de Nrf2 con Cul3, que participa en la poli-ubiquitinación de Nrf2 para su posterior degradación por el proteasoma. El cambio conformacional va acompañado de la modificación postraducciona de KEAP1 y Nrf2,

que culminan con la disociación de Nrf2 del complejo KEAP1-Cul3 y su translocación al núcleo, incrementando la transcripción de genes antioxidantes (Kobayashi y cols, 2006; Niture & Jaiswal, 2009).

Peroxidación lipídica

El SNC es especialmente susceptible al daño inducido por EROs debido a su mayor disponibilidad y consumo de oxígeno, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, principales componentes de membranas celulares altamente susceptibles al daño por oxidantes; sus niveles relativamente bajos de defensas antioxidantes, y alto contenido de metales activos redox (Valko y cols, 2007; Virgolini & Aschner, 2021).

La peroxidación de lípidos altera la estructura y función normal de las bicapas lipídicas que rodean a la célula y a las membranas de organelas, como las mitocondrias. En particular, la peroxidación lipídica puede alterar la fluidez y permeabilidad de la membrana llevando a pérdida de función del transporte de iones y otras moléculas, limitando así la función de la organela o de la célula en general. En los sistemas biológicos, la peroxidación de lípidos se produce de dos formas, una enzimática, que implica la participación de ciclooxigenasa y lipoxigenasa en la oxidación de ácidos grasos y otras reacciones no enzimáticas, que incluye metales de transición, las EROs y ERNs y otros. Los resultados de la peroxidación excesiva son muy dañinos para la célula, a pesar de contribuir a la respuesta inflamatoria, debido a su importancia en la reacción en cascada del ácido araquidónico a formación de prostaglandinas.

La peroxidación lipídica se ha relacionado con el deterioro de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la aparición de megamitocondrias. En pacientes con enfermedad hepática alcohólica, los marcadores séricos de peroxidación lipídica, se encuentran aumentados y los aductos que forman con proteínas podrían ser uno de los mecanismos que subyacen a la aparición de hígado graso, necrosis focal y fibrosis hepática. Los niveles de OH^- , también aumentan, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana por el daño a lípidos y afecta su función, lo que lleva al colapso del potencial de la membrana mitocondrial y al inicio de la MPT (Matsushashi y cols, 1998).

Otros estudios demostraron que la lipoperoxidación aumentaba la sensibilidad del CTE a la inhibición por estrés oxidativo, excepto a nivel del complejo II, lo que contribuye a una disminución del funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa y reduce las tasas de síntesis de ATP.

Pb, Etanol y estrés oxidativo

Entre los mecanismos moleculares que están involucrados en la toxicidad inducida por Pb, se han reportado cambios a nivel de enzimas y reservas antioxidantes, principalmente por un mecanismo mediado por su afinidad a grupos tioles. Está documentado que la exposición a Pb aumenta los niveles de EROs y uno de los mecanismos propuestos es el aumento del Ca^{2+} intracelular, lo que conlleva una disminución del $\Delta\Psi$ dando como resultado los primeros estadios de disfunción mitocondrial vía liberación de citocromo c (Flora y cols, 2007).

Además, dada su afinidad por grupos tioles, Pb puede unirse al GSH y disminuir la reserva de tiol reactivo, induciendo así el estrés oxidativo. Otro mecanismo que ha sido descrito es la interrupción de la señalización del Ca^{2+} mitocondrial por Pb, que puede conducir también a la generación de EROs y la pérdida del $\Delta\Psi$, iniciar la apoptosis e inhibir la ATPasa Na^+/K^+ , disminuyendo los niveles de ATP celular, comprometiendo así el estado bioenergético de la célula (Baranowska-Bosiacka y cols, 2013). Aunque varios mecanismos como la inhibición de tioles y la competencia con cationes bivalentes esenciales pueden explicar los efectos adversos del Pb, el estrés oxidativo es un factor importante en la etiología de la toxicidad del Pb (Patrick, 2006b). Si bien no es un metal con actividad redox, sus acciones pro-oxidantes pueden estar mediadas por la inhibición de la δ -ALA-d y, por lo tanto, la acumulación del ácido delta aminolevulínico (δ -ALA), un compuesto que sufre enolización y autooxidación con la generación resultante de EROs.

La neurotoxicidad asociada con la exposición al Pb puede ser el resultado de una serie de pequeñas perturbaciones en el metabolismo cerebral y, en particular, del estrés oxidativo. En este estudio realizado por Villeda-Hernandez y cols, ratas preñadas de la cepa Wistar se expusieron durante la gestación a concentraciones variables de acetato

de Pb a través de agua potable (soluciones que contenían 320 o 160 ppm de Pb) y las crías fueron tratadas de la misma forma después del nacimiento hasta los 45 días de edad, cuando fueron sacrificadas para determinar los niveles de Pb en sangre y en diferentes regiones cerebrales: estriado, corteza parietal, tálamo, hipocampo y cerebelo. Los resultados mostraron que la plumbemia en estos animales aumentó de manera dependiente de la dosis, alcanzando valores de hasta 35 µg/dl. En el cerebro, el Pb se acumuló preferentemente en la corteza parietal, cuerpo estriado y el tálamo donde se alcanzaron los valores máximos de 97 µg/g de tejido, en comparación con el grupo de control, mientras que los niveles de lípidos oxidados aumentaron significativamente en el estriado, el tálamo y el hipocampo de los animales tratados, así como también en sangre periférica (Villeda-Hernández y cols, 2001).

El Pb también compite y puede desplazar metales en las metaloproteínas alterando su función y contribuyendo posteriormente a un estado de estrés oxidativo celular. Se ha descrito que Pb sustituye a los metales divalentes presentes en la SOD Cu/Zn, MnSOD y las diferentes isoenzimas de la familia de las GPx, inhibiendo así las actividades enzimáticas de los sistemas que son responsables de eliminar las EROs. Sin embargo, aunque el Pb puede inhibir estas enzimas a niveles elevados o después de una exposición prolongada, también se ha informado de la activación inducida por Pb, probablemente como una respuesta compensadora frente al desbalance oxidativo, y como resultado de una peroxidación lipídica exagerada. Esto es particularmente cierto para la actividad CAT, en la que se informó una correlación positiva con los niveles de Pb en adultos (Gurer-Orhan y cols, 2004), niños (Ahamed y cols, 2005) y en el cerebro de animales de laboratorio expuestos a Pb (Bokara y cols, 2008; Correa y cols, 2000) como se describió también en el en el Capítulo 1, en cerebro de ratas expuestas perinatalmente a Pb, modelo utilizado en este trabajo de tesis. Cabe señalar que, además de la capacidad del CAT para metabolizar el H₂O₂ a través de una reacción catalítica, esta enzima también puede promover la reacción del H₂O₂ con los donantes de H₂, como los alcoholes de bajo peso molecular, a través de una reacción peroxidativa, lo que constituye un paso metabólico importante en el proceso de oxidación de EtOH en cerebro (Vetrano y cols, 2005).

Numerosas evidencias experimentales posicionan al estrés oxidativo como uno de los principales mecanismos de acción tóxica, tanto de Pb como de EtOH (Adonaylo & Oteiza, 1999; Husain y cols, 2001; Tandon y cols, 2002).

Aunque no se puede atribuir un solo evento al mecanismo de toxicidad de EtOH, el desequilibrio del estado redox se señala frecuentemente como un mecanismo convergente (Cederbaum y cols, 2009). Entre los principales procesos que ocurren se evidencian alteraciones en la relación NAD^+/NADH , un factor crítico en el metabolismo del EtOH (por ser cofactor de ALDH2) y en la homeostasis mitocondrial al ser uno de los principales donores de electrones del Complejo I para iniciar la fosforilación oxidativa, ocasionando daño mitocondrial, con la consiguiente disminución de la producción de ATP. La reducción de los niveles de GSH en las mitocondrias y el aumento de las concentraciones de Fe^{2+} , promoviendo la formación de OH a través de la reacción no enzimática de Fenton, también forman parte de su mecanismo de toxicidad multifactorial.

Como se ha descrito en la introducción y a lo largo de este trabajo de tesis, la producción de ACD, con su alta reactividad y capacidad de formar aductos con macromoléculas es uno de los eventos cruciales en la toxicidad de EtOH. También se evidencian efectos peroxidativos sobre las membranas celulares, debido a sus características lipofílicas y anfipáticas y la inducción de CYP2E1 en el cerebro y el hígado, una fuente importante de ROS. Todos estos factores podrían contribuir a la generación de aldehídos reactivos, como 4-HNE y MDA, siendo ambos sustratos de ALDH2 (Zhao & Wang, 2015).

Al respecto, EtOH puede inducir procesos oxidativos directamente a través de O_2^- , OH^- e hidroxietilo radicales formados en su biotransformación, con un rol también de las ERNs como el peroxinitrito (Thurman y cols, 1999). El hígado y el riñón, siendo órganos que juegan un papel vital en el metabolismo y excreción de ambos tóxicos, son órganos blanco de daños debido a la acción oxidativa de estos xenobióticos. A este respecto, se ha reportado que la peroxidación lipídica de membranas celulares inducida por Pb y EtOH juega un papel crucial en los mecanismos de hepato y nefrotoxicidad de estas sustancias (Jurczuk y cols, 2006; Sandhir & Gill, 1995), reportándose mayor concentración de MDA, utilizado como bioindicador de peroxidación lipídica. También

se evidencian alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y CAT en el hígado y riñón de ratas expuestas a Pb o EtOH. Especialmente en hígado, los procesos de peroxidación lipídica se intensifican en la co-exposición a Pb y EtOH, lo que podría indicar un efecto potenciado de la interacción entre ambos (Jurczuk y cols, 2006).

Ha sido descripta asimismo la disminución inducida por EtOH de las concentraciones de GSH en hígado y en riñón, que puede ser el efecto resultante de la utilización de grupos tioles para eliminar los radicales libres formados durante la oxidación de EtOH. Además, la disminución de la concentración de GSH debido a la exposición a EtOH también podría ser causada por la unión (formación de aductos) de ACD a grupos SH, así como por cambios en las actividades de las enzimas responsables del mantenimiento de la concentración fisiológica de GSH, tales como GR y G6PD, ya que ha informado al respecto que EtOH puede inhibir la actividad de estas enzimas (Ohi y cols, 1998).

Interesantemente, en un trabajo realizado por Flora y col en 2012 se abordó el estudio de la toxicidad combinada de Pb y EtOH en cerebro. Para ello, se expusieron ratas machos de la cepa Wistar a Pb (0,1% en agua de bebida), EtOH (10% en agua de bebida) o su combinación; de forma crónica a lo largo de 16 semanas (4 meses). Fueron evaluados posteriormente diferentes marcadores de estrés oxidativo, incluyendo sistemas enzimáticos y no enzimáticos en sangre periférica, y en homogenato de cerebro de estos animales. Los grupos que recibieron Pb, EtOH o su combinación mostraron una disminución significativa en los niveles de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx, en comparación con los animales controles. Las mayores inhibiciones y alteraciones en los parámetros de estrés oxidativo fueron evidenciadas en el grupo que recibió ambos tóxicos. Este estado de desbalance oxidativo precedió al aumento en la expresión de proteínas marcadoras de apoptosis, como caspasa 3 y la proteína p53. A su vez, se encontró un aumento en la liberación de cit *c* hacia el citosol indicando una disfunción por apertura del poro mitocondrial y alteración del $\Delta\Psi$ de esta organela (Flora y cols, 2012).

ALDH2 y estrés oxidativo

ALDH2 es considerada como una enzima indirectamente antioxidante, por su rol principal en la degradación de aldehídos tóxicos como ACD y 4-HNE. A su vez, se ha reportado que ALDH2 es inhibida por altos niveles de 4-HNE por lo que al acumularse este metabolito produce aún más deterioro sobre esta enzima, lo que favorecería al incremento de EROs y daño oxidativo. Como un producto de peroxidación lipídica, 4-HNE es considerado un biomarcador de estrés oxidativo e identificado como uno de los aldehídos más reactivos, participando en múltiples procesos fisiológicos como un segundo mensajero, y formando aductos con muchas sustancias químicas, particularmente con residuos de cisteína de proteínas que contienen grupos tioles. En condiciones fisiológicas, 4-HNE tiene una corta vida media y está estrechamente regulado por la actividad de enzimas como glutatión sulfur-transferasa, aldo-ceto reductasa y ALDH (en particular ALDH2 y ALDH3), siendo la primera también inhibida por 4-HNE y disminuyendo por lo tanto la afinidad por su sustrato, dando como resultado mayor cantidad de aductos de proteínas e incrementando el daño celular particularmente en organelas vulnerables como la mitocondria (Breitzig y cols, 2016).

Numerosas evidencias recientes indican que el estrés oxidativo y los productos resultantes como el 4-HNE juegan un rol en la patogenia de diferentes enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Alzheimer y Parkinson, en las que se ha demostrado que la reducción en los niveles de 4-HNE podría limitar la progresión del daño neurológico. En esta patología, DA sufre desaminación oxidativa catalizada por monoamino oxidasa a DOPAL, que se metaboliza principalmente en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) a través de ALDH2. La biotransformación de DOPAL es crítica ya que este aldehído derivado de DA es un electrófilo reactivo y tóxico para las células dopaminérgicas. Por lo tanto, 4-HNE producido a través del estrés oxidativo inhibe la oxidación mediada por ALDH2 de la neurotoxina endógena DOPAL, ya que se demostró que la incubación de ALDH2 recombinante humana con 4-HNE (1,5-30 mM) produjo inhibición de la actividad y acumulación de DOPAL (Florang y cols, 2007).

A este respecto, en un trabajo realizado por Ma y cols, se observó que la deficiencia de ALDH2 acentuó la fibrosis hepática inducida por CCl₄ en ratones. Además,

en animales transgénicos ALDH2^{-/-} se desencadenó más generación de EROs, apoptosis de hepatocitos y mitofagia deteriorada después del tratamiento con CCl₄. En células HSC-T6, el silenciamiento del gen de ALDH2 mediante la transfección con un precursor de RNAi, aumentó la generación de EROs y, por el contrario, la sobreexpresión de ALDH2 o la activación por administración de Alda-1 (un activador de la enzima ALDH2) revirtió parcialmente el efecto antes mencionado. Además, la administración de Alda-1 protegió contra la fibrosis hepática *in vivo*, efecto que podría estar mediado por la regulación positiva de la cascada de Nrf2/HO-1, indicando que ALDH2 tiene un importante rol en el mantenimiento del balance redox celular (Ma y cols, 2018).

Así, por lo descripto anteriormente, resulta de total importancia estudiar los efectos del estrés oxidativo que ocurren a nivel cerebral, ya que el SNC conforma un sitio blanco de la acción tóxica tanto de Pb como de EtOH, además de ser un órgano muy susceptible al daño oxidativo. Los mecanismos por los cuales ejercen su acción tóxica a nivel neuronal no están aún completamente esclarecidos, por lo que en este capítulo proponemos abordar el estudio de marcadores de estrés oxidativo en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH en un contexto de baja actividad y expresión de ALDH2.

Materiales y métodos

Determinación de los niveles de EROs

El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) es una de las sondas más utilizada para estimar los niveles de EROs celulares y puede proporcionar mediciones fiables tanto en células enteras como también en preparaciones purificadas de mitocondria.

La H₂DCFDA difunde al interior de las células y allí es desacetilada por las esterasas celulares para formar 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), convirtiéndola en un compuesto más hidrofílico que es retenido en el citosol. En presencia de EROs, predominantemente H₂O₂, H₂DCF se oxida rápidamente a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente, con longitudes de onda de excitación y emisión de 498 y 522 nm, respectivamente, pudiendo cuantificarse por diferentes metodologías, por ejemplo, mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 43**).

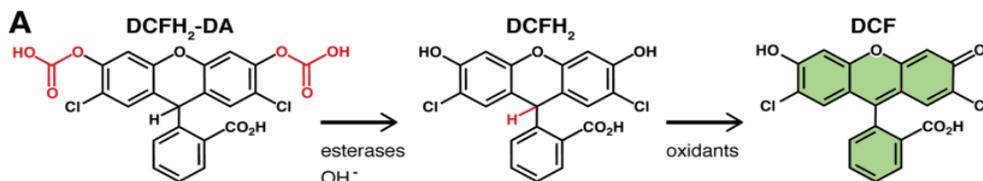


Figura 43. Reacción de oxidación de DCF H₂-DA.

Originalmente se postuló que la oxidación de H₂DCF a DCF era específica para H₂O₂, pero la evidencia reciente ha demostrado que otras EROs como el OH[•], los hidroperóxidos y el peroxinitrito también pueden oxidar H₂DCF, pero con una sensibilidad muy reducida en comparación con la del H₂O₂ (Winterbourn, 2014).

Para llevar a cabo este ensayo, se crecieron células SH-SY5Y en cápsulas individuales de 3,5mm a una densidad de 10.000 cels/cápsula. Al día siguiente las células fueron tratadas con Pb y EtOH durante 24 h de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2. Posteriormente fueron cultivadas en presencia de 10 mM de H₂DCFDA

(Sigma-Merck, Argentina) durante 30 min a 37°C en incubadora con 5% de CO₂ y lavadas dos veces con PBS 1X para su observación en un microscopio de fluorescencia con objetivo de 63X sumergible (AXIOPLAN, CIQUIBIC, UNC). Como control positivo de la técnica se analizó un grupo adicional conformado por células que fueron expuestas a H₂O₂ 50mM durante 30 minutos.

Se obtuvieron 5 a 7 imágenes de cada condición, analizándose al menos 20 células por condición en 3 experimentos independientes. Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

Determinación de la actividad enzimática de catalasa

La actividad enzimática de CAT se determinó mediante espectrofotometría, teniendo como referencia el método de Aebi (Aebi, 1984) con ligeras modificaciones. Esta técnica se basa en el seguimiento de la descomposición del H₂O₂ mediada por CAT, que se observa mediante la disminución en los niveles de absorbancia del H₂O₂ a una longitud de onda de 240 nm.

Para llevar a cabo este ensayo, se crecieron células SH-SY5Y en cápsulas individuales de 6cm hasta llegar a una confluencia del 70%. Estas células fueron luego tratadas durante 24 h con Pb y EtOH según lo descrito en el capítulo 2. Al finalizar el período de exposición fueron tripsinizadas y se procedió a homogeneizar el pellet celular obtenido en buffer fosfato que fue luego sonificado y centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado para la medición de la actividad enzimática de CAT en tanto que una alícuota del sobrenadante se usó para para la medición de proteínas mediante un kit comercial basado en el método de Bradford (BioRad Bradford Protein Assay Kit, Hércules, CA, USA). El procedimiento empleado consistió en colocar en una cubeta de cuarzo 1,25 ml de buffer fosfato 50 mM (pH=7) al que se le adicionó 100 µl de H₂O₂ 150 mM y 25 µl de la muestra. Se tomaron mediciones cada 1 min durante 10 min.

La actividad de CAT fue determinada utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 50. Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados a unidades de

actividad/min/ml/mg de proteína mediante la siguiente fórmula (coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a $240 = 0,0394 \text{ mmol}^{-1}$).

$$\text{U CAT/mg prot/min} = \text{Abs/min} \times V_{\text{cubeta}} / (40 \times V_{\text{muestra}} \times \text{mg proteína} \times 100)$$

Determinación de la expresión de catalasa

Para la cuantificación de la expresión de la enzima CAT se empleó la técnica de WB (ver Materiales y Métodos del capítulo 2), utilizando un anticuerpo primario de conejo anti-CAT (1/1000, Abcam) y un anticuerpo secundario IR-Anti-conejo posteriormente revelando la señal con el scanner infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences). Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

Determinación de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para estimar el daño por peroxidación lipídica, las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron determinadas en homogenatos de células. El fundamento de la técnica se basa en que el MDA, un metabolito final de la peroxidación lipídica y uno de los más abundantes, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un aducto. Este compuesto puede cuantificarse espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 530nm.

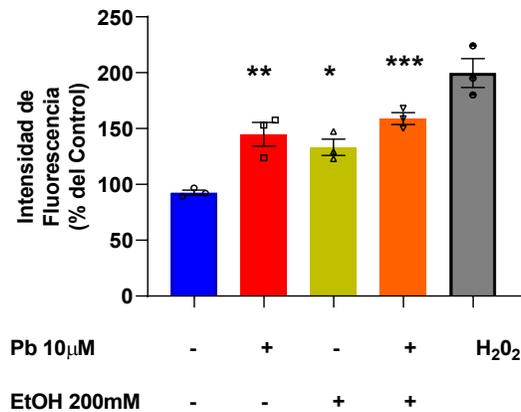
Para ello, las muestras se incubaron a 100 °C durante 60 min en medio ácido que contiene SDS al 0,45% y TBA al 0,6%. Fueron luego centrifugadas y se determinó el producto de reacción a 530 nm en el sobrenadante. Se utilizó 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como estándar para realizar la curva de calibración para TBARS y los resultados se expresaron como nmol MDA/ mg de proteína.

Resultados

Cuantificación de EROs

En la **Figura 44** puede observarse el gráfico correspondiente a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia verde, producto de la oxidación de DCFH₂-DA en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH. El análisis estadístico realizado mediante ANOVA de una vía arrojó diferencias en los grupos respecto al control: $F_{(4, 10)} = 20,76$; $p < 0,0001$. C vs Pb, $p < 0,005$; C vs EtOH, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,001$. Se observó un aumento en la fluorescencia verde de DCF por efecto de la exposición a Pb, EtOH y su combinación indicando la producción aumentada de EROs. En cuanto al grupo expuesto a H₂O₂ 50Mm, éste presentó el aumento esperado de la fluorescencia verde de DCF evidenciando la sensibilidad de la sonda para indicar cambios en la producción de EROs en las condiciones experimentales evaluadas.

A.



B.

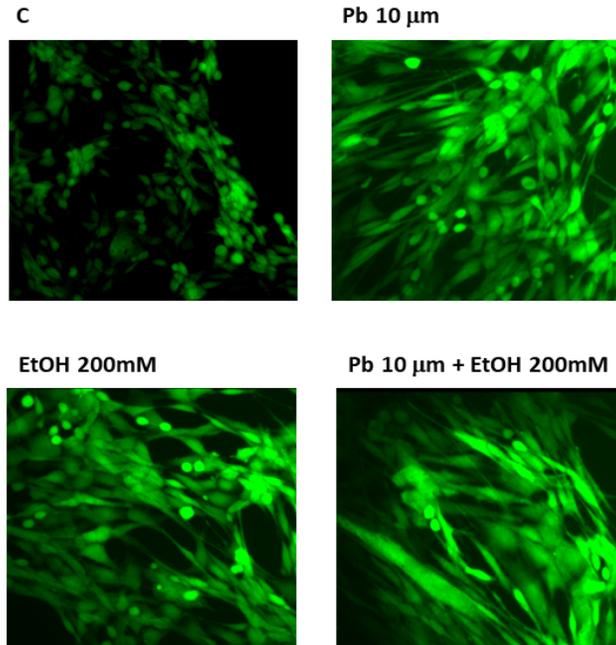


Figura 44. Cuantificación de EROs. A. Se grafican los datos de intensidad de fluorescencia de DCF por campo, expresada como porcentaje del grupo C. * denota $p < 0,05$. ** denota $p < 0,01$. ***denota $p < 0,001$ respecto al grupo control. B. Fotografías representativas de células SH-SY5Y (63X).

Estimación del daño por peroxidación lipídica

En la **Figura 45** se observa graficado el resultado de la determinación TBARS. El ANOVA de una vía y posterior análisis de la prueba de Tukey como *post-hoc* realizado arrojó diferencias respecto al grupo control: $F_{(3,8)} = 36,92$; $p < 0,0001$. C vs Pb, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH, $p < 0,0001$; se observaron asimismo diferencias entre los grupos: Pb vs Pb+EtOH, $p < 0,01$; EtOH vs Pb+EtOH, $p < 0,001$. Estos resultados podrían estar indicando una mayor acumulación de aldehídos tóxicos debido a la inhibición de la combinación entre Pb y EtOH sobre los niveles de ALDH2, lo que implicaría mayores niveles de EROs favoreciendo así el daño por peroxidación lipídica cuando ambos tóxicos están presentes.

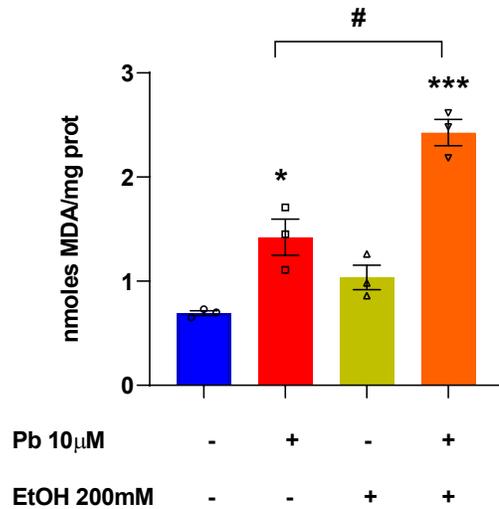


Figura 45. Cuantificación de TBARS. *denota $p < 0,05$, ** denota $p < 0,001$ respecto al grupo control. # denota $p < 0,05$ entre tratamientos.

Actividad enzimática de catalasa

Se puede observar la cuantificación de la actividad de la enzima CAT en la **Figura 46**. El ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como *post-hoc* mostró diferencias significativas, $F_{(3,12)} = 9,646$; $p < 0,05$. La exposición a Pb y EtOH evidenció diferencias respecto al grupo control: C vs Pb+EtOH, $p < 0,001$; y respecto a la exposición a ambos tóxicos por separado: Pb vs Pb+EtOH, $p > 0,05$; EtOH vs Pb+EtOH, $p > 0,05$. Esto demuestra que la interacción entre Pb y EtOH provoca un aumento en la actividad de CAT en células SH-SY5Y, probablemente como mecanismo compensatorio frente a los elevados niveles de EROs y TBARS presentes generando un entorno oxidante.

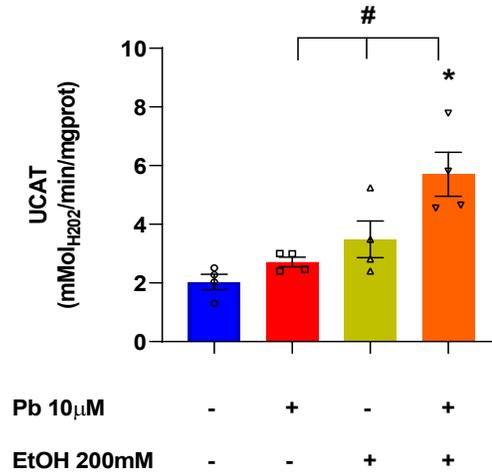


Figura46. Actividad enzimática de Catalasa. * denota $p < 0,05$ respecto al grupo control. # denota $p < 0,05$ respecto de Pb y EtOH.

Expresión de catalasa

La determinación de la expresión de CAT mediante WB (**Figura 47**) se mantuvo en concordancia con los resultados obtenidos para la actividad de CAT. En este caso, el ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey como *post-hoc* mostró diferencias significativas: $F_{(3, 12)} = 7,67$; $p < 0,05$, y se observó el sinergismo entre Pb y EtOH sobre la expresión de CAT: C vs Pb+EtOH, $p < 0,01$.

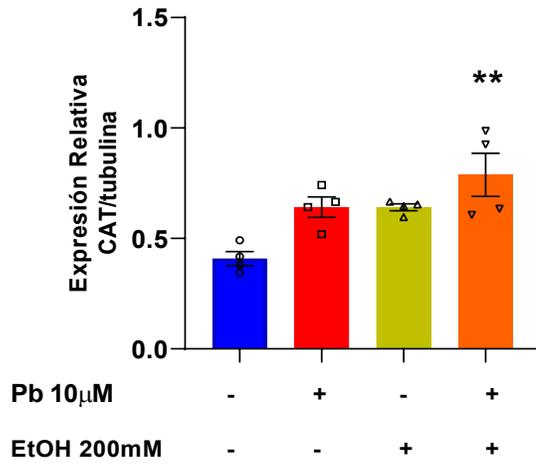
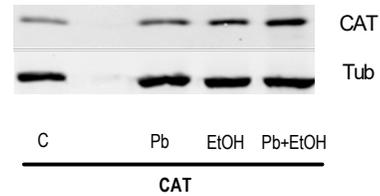
A.**B.**

Figura 47. Expresión de Catalasa. **A.** Gráfico de cuantificación de la expresión de CAT. ANOVA de una vía: **denota $p < 0,01$ en relación al grupo control. **B.** Fotografía representativa del scanner de membrana utilizando el equipo Odyssey. Se muestran las bandas correspondientes a CAT (superior) y a tubulina (inferior) como control de carga durante la corrida electroforética.

Discusión y conclusiones parciales

Es reconocido el rol de la enzima ALDH2 en el balance redox de la célula, particularmente relacionado a su capacidad de detoxificación de aldehídos altamente reactivos. Al respecto, los resultados presentados en este capítulo demuestran un aumento en las concentraciones de MDA en el grupo expuesto a Pb y EtOH con respecto a la exposición a ambos tóxicos por separado. Este incremento en los niveles de MDA se acompaña con elevados niveles de EROs, indicando un desbalance oxidativo celular hacia las especies oxidantes. Si bien estos mecanismos de toxicidad han sido reportados en diferentes sistemas frente a la exposición a Pb, EtOH o su combinación, en el presente trabajo de tesis se da evidencia de que en este contexto, la exposición a Pb y EtOH fue capaz de inhibir la actividad y expresión enzimática de ALDH2, lo que sugeriría que los daños por peroxidación lipídica podrían estar mediados por la acumulación de ACD, 4-HNE y probablemente DOPAL en células dopaminérgicas de neuroblastoma humano SH-SY5Y, poniendo de manifiesto el rol crucial de esta enzima en el balance oxidativo celular y en la remoción de aldehídos tóxicos.

Por otra parte, se observó un incremento en los niveles de CAT, tanto de actividad enzimática como de expresión de la proteína en células SH-SY5Y, que fueron tratadas con Pb y EtOH. Este resultado podría evidenciar un mecanismo compensatorio en estas células que se activaría a modo de defensa frente al creciente nivel de EROs y de aldehídos tóxicos acumulados. En línea con estos resultados también reportamos aumento de la actividad y expresión de CAT en ratas expuestas perinatalmente a Pb, lo que, sumado al deficiente funcionamiento de la enzima ALDH2, podría explicar en parte el elevado consumo de EtOH que presentan estos animales por acumulación de ACD cerebral (Mattalloni y cols, 2013, 2017 y 2019 a y b).

En relación a la generación de estrés oxidativo por parte de Pb y EtOH, numerosas evidencias señalan la capacidad de ambos neurotóxicos (y de su combinación), de inducir un desbalance redox en la célula (Virgolini y cols, 2019). En este caso, y en relación a las EROs, los resultados demuestran que este desbalance puede ser el resultado de una mayor producción de estos compuestos, lo que podría conducir a un aumento en la actividad y expresión de enzimas antioxidantes (en este

caso CAT) así como al exceso de formación de lípidos peroxidados. Podría decirse entonces, que el estrés oxidativo sería un mecanismo de acción común a ambos tóxicos, que se vería potenciado por la inhibición de la actividad y expresión de ALDH2 y los daños ocasionados a nivel de la funcionalidad mitocondrial descriptos en el Capítulo 3.

En este punto, es necesario asimismo discutir estos resultados en el marco de la modulación de los niveles de estrés oxidativo inducidos por Pb por un mecanismo que está relacionado a la desregulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , que por su estado de oxidación muestra similitud con el Pb^{2+} . Se ha reportado que la neurotoxicidad ejercida por Pb podría estar relacionada a la acumulación de Ca^{2+} y desregulación de los múltiples procesos en los que participa este catión puesto que, una vez que el Pb ingresa a las células, se une a los grupos tioles de proteínas y compite con iones esenciales por sus sitios de inserción como por ejemplo los canales iónicos, en particular los Ca-dependientes. Además, Pb tiende a acumularse y a dañar la mitocondria, la cual tiene un rol importante en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} (revisado en Sanders y cols, 2009, Virgolini y Aschner, 2021).

Dado que en estas condiciones experimentales existe daño por peroxidación lipídica e incremento de EROs debido a la acumulación de aldehídos tóxicos, resulta de interés abordar el estudio de los efectos que produciría la activación de ALDH2 en este modelo experimental. Para ello, en el capítulo siguiente de este trabajo de tesis propusimos evaluar los efectos de la activación de ALDH2 utilizando Alda-1.

Capítulo 5

**Efecto de la administración de Alda-1 en células SH-SY5Y
expuestas a Pb y Etanol**

Efecto de la administración de Alda-1 en células SH-SY5Y expuestas a Pb y etanol

Activadores de ALDHs (Aldas)

Los activadores de ALDHs (Aldas) han sido recientemente desarrollados como moléculas que son capaces de aumentar la actividad de las enzimas pertenecientes a la familia ALDH. Si bien aún sigue investigándose el mecanismo de acción de estos compuestos, se ha descrito que potencian la unión enzima/sustrato y estabilizan la estructura tetramérica de las enzimas, incluso de la ALDH2*2 (Perez-Miller y cols, 2010).

En particular, Alda-1 [N- (1,3-benzodioxol-5-ilmetil) -2,6-diclorobenzamida] es un activador de la ALDH2, pudiendo incrementar la actividad enzimática hasta en 11 veces su valor. Cuando se administró Alda-1 en ratas antes de un evento isquémico, redujo el tamaño de la lesión por infarto en un 60%, muy probablemente a través de su efecto inhibitor sobre la formación de aldehídos citotóxicos. Además, en estudios *in vitro*, Alda-1 demostró ser un activador particularmente eficaz de ALDH2*2 (Chen y cols, 2009). No sólo ha sido reportado que Alda-1 aumenta selectivamente la actividad enzimática de ALDH2, sino que también incrementa los niveles de proteína de la enzima (Belmont-Díaz y cols, 2016; Zhao y cols, 2020).

La activación de ALDH2 por Alda-1 es un mecanismo muy estudiado en numerosos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, con el fin de evidenciar el rol de ALDH2 y la acumulación de aldehídos tóxicos en diferentes patologías. Numerosas evidencias muestran que Alda-1 disminuye los efectos deletéreos causados por altos niveles de EROs y mejora los daños en diferentes modelos animales de patologías, como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, dermatitis por radiación y dolor (Gross y cols, 2015). También se ha probado en otros modelos de patologías como la enfermedad de Parkinson, modelos de privación de oxígeno-glucosa cerebral (Guo y cols, 2013), lesión por isquemia-reperfusión cerebral (Fu y cols, 2014), dermatitis inducida por radiación (Ning y cols, 2012), e infarto de miocardio (Sun y cols, 2021). Estas evidencias en diferentes modelos apoyan la idea de que la activación de

ALDH2 por Alda-1 protegería la integridad celular y pone de manifiesto la participación crucial de esta enzima en numerosas patologías, como está ilustrado en la **Figura 6**.

Particularmente, ALDH2 se ha propuesto como enzima clave en la cardioprotección durante los procesos de isquemia-reperfusión. Esta propuesta llevó a la búsqueda de activadores de ALDH2 con el objetivo de desarrollar fármacos cardioprotectores, y Alda-1 fue el primer activador de ALDH2 identificado. A pesar del gran potencial farmacológico de Alda-1, el mecanismo de acción todavía no está completamente dilucidado. Al respecto, un estudio cristalográfico mostró que Alda-1 se une a la entrada del sitio de unión al aldehído (sustrato); por lo tanto, Alda-1 debería ser, en esencia, un inhibidor. Para explicar la activación por Alda-1, se propuso que la unión de esta molécula disminuye el volumen de bolsillo del sitio activo y, como resultado, aumenta la probabilidad de encuentros entre las moléculas implicadas en la catálisis actuando, así como una molécula chaperona estructural de la enzima, lo que algunos autores definen como un parche molecular (Pérez-Miller y cols, 2010). En este estudio se determinó también, que en lugar de unirse cerca del sitio de mutación en la variante inactiva ALDH2*2, Alda-1 se une cerca de la salida del túnel de unión al sustrato, en una posición que se superpone al sitio inhibidor, pero deja los residuos críticos del sitio activo Cys302 y Glu268 libres para funcionar. Es así que la capacidad de Alda-1 para activar ALDH2 depende del tamaño del sustrato, y también puede incrementar las actividades esterasa de ALDH2 y ALDH2*2. Tanto los ensayos enzimáticos como los datos estructurales muestran que la unión de Alda-1 proporciona estabilidad estructural a la enzima ALDH2*2, rescatando una gran fracción de los déficits funcionales asociados con la sustitución del Glu487 crítico por Lys (Pérez-Miller y cols, 2010).

Posteriormente, para esclarecer este hallazgo a nivel estructural, se realizaron experimentos cinéticos con el objetivo de caracterizar el efecto de Alda-1 sobre las propiedades de ALDH2 (parámetros cinéticos, determinación del paso limitante de la velocidad, reactividad de la cisteína catalítica), y sobre el mecanismo cinético (tipo de cinética, secuencia de sustratos entrada y liberación de productos). Los resultados mostraron que Alda-1 modifica dramáticamente las propiedades de ALDH2, puesto que la K_m para NAD^+ disminuyó en 2,4 veces y la eficacia catalítica aumentó 4,4 veces; sin

embargo, el Km para el sustrato aumentó 8,6 veces, disminuyendo así la eficacia catalítica. Las alteraciones en estos parámetros dieron como resultado un comportamiento complejo, donde Alda-1 actúa como inhibidor a bajas concentraciones de aldehído y como activador a altas concentraciones del sustrato. Además, la unión de Alda-1 a ALDH2 hizo que el paso de desacilación fuera menos limitante y disminuyó el pKa de la cisteína catalítica. Así, los patrones de inhibición de NADH indicaron que Alda-1 indujo un cambio en la secuencia de entrada de sustratos y liberación de productos, de acuerdo con la propuesta de que ambos sustratos entren en ALDH2 por el sitio de entrada NAD⁺ (Belmont-Díaz y cols, 2016).

En base a estos antecedentes, cabe destacar que Alda-1 ha sido ensayado en numerosos modelos experimentales como posible molécula para el tratamiento de diversas patologías. Al respecto, Patil y cols, en 2019 determinaron en células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) que recibieron un pre-tratamiento con Alda-1 (20 μM), antes de la exposición hiperóxica frente a los controles no tratados, mostraron niveles más bajos de 4-HNE, una disminución significativa de las expresiones de Bax y citocromo c denotando una reversión del daño mitocondrial, con la actividad y la expresión de ALDH2 parcialmente restauradas y el $\Delta\Psi$ significativamente mejorado. Estos resultados sugieren que, en las células endoteliales vasculares del pulmón, ALDH2 es un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de los daños producidos por injuria aguda en pulmón y que Alda-1 es una posible opción de tratamiento (Patil y cols, 2019).

Evidencias recientes también muestran que Alda-1 mitiga la regulación positiva de EROs inducida por aldosterona, lo cual está en línea con un mecanismo por el cual el compuesto acelera el metabolismo de 4-HNE por ALDH2. Esta acción rompe un círculo vicioso. La peroxidación lipídica produce 4-HNE, que a su vez se une a objetivos mitocondriales y, por lo tanto, conduce a una sobrecarga mitocondrial y una mayor producción de EROs. También está descrito que el 4-HNE inhibe la actividad enzimática de ALDH2, generando una retroalimentación negativa contribuyendo al daño celular. Sin embargo, se han reportado también dos resultados inesperados con respecto al efecto de la administración de Alda-1: estimulación de la síntesis de NO y la liberación de Ca²⁺ (Montiel-Jaen y cols, 2021).

En cuanto a la relación entre la activación de ALDH2 por Alda-1 y el consumo de EtOH, Rivera-Meza y cols realizaron ensayos en ratas bebedoras de la cepa UChB. Para los estudios de adquisición de ingesta de etanol, ratas UChB fueron tratadas con Alda-1 durante 5 días consecutivos 12,5, 25 y 50 mg/kg/día o inyectadas i.p. con solución vehículo. En el día 2, se permitió a los animales elegir entre beber de 2 botellas, conteniendo 10% de EtOH o solo agua, y el consumo de EtOH fue monitoreado durante 28 días consecutivos. Se observó una inhibición significativa del consumo de EtOH por el tratamiento con Alda-1, efecto que se manifestó como dosis dependiente, alcanzando una inhibición máxima del 90% de la adquisición de ingesta de EtOH al en el quinto día de administración de 25 mg /kg / día en comparación con el vehículo (Rivera-Meza y cols, 2019). Durante el mismo período de tratamiento de 5 días, los animales tratados con vehículo mostraron la escalada del consumo de EtOH característico en ratas UChB (Quintanilla y cols, 2011; 2016b). También, fue cuantificada la actividad enzimática de ALDH2 en tejido hepático y cerebral luego de la administración de una dosis única de 25 mg de Alda-1. Se evidenció un aumento de 2,3 veces en la actividad de ALDH2 hepática y un incremento de 3 veces en la actividad cerebral de ALDH2 respecto a los animales vehículo (Rivera-Meza y cols, 2019). Se observó también que el efecto de activación sobre ALDH2 perdura hasta 7-14 días después de discontinuar su administración, sugiriendo que el mecanismo de activación por Alda-1 está más allá de la presencia de la droga (semivida plasmática de 7,3 h, Taneja y cols, 2015). En general, el estudio muestra que la administración de Alda-1 a ratas UChB conduce a un aumento de la actividad de ALDH2 en el hígado y el cerebro, con la consecuente abolición de la adquisición de la ingesta de EtOH en animales sin experiencia y una marcada reducción del mantenimiento de la ingesta de EtOH en animales consumidores. Alda-1 no modificó la tasa de eliminación de EtOH o el consumo de una sustancia gratificante diferente como sacarosa.

Estos efectos de Alda-1 sobre la adquisición de la ingesta de EtOH se encuentran en línea con un estudio anterior del mismo grupo de investigación, que muestra que la sobreexpresión mediante la microinyección de un lentivirus codificante para ALDH2, en el ATV, prácticamente abolió la adquisición de consumo de EtOH en ratas UChB (Karahanian y cols, 2011). Sin embargo, una sobreexpresión tan localizada de ALDH2

fue completamente ineficaz para inhibir el mantenimiento de la ingesta de EtOH en animales que habían consolidado un alto nivel de consumo, lo que sugiere que la ingesta crónica de EtOH depende, además, de la actividad neuronal de otras áreas o mecanismos cerebrales (Karahanian y cols, 2015).

Como ya se ha mencionado, la enzima ALDH2 tiene un rol crítico en el mantenimiento de la integridad celular en numerosos modelos experimentales de diferentes patologías. Debido a esto y a los resultados expuestos en los capítulos anteriores, nos propusimos en este capítulo abordar los efectos que se producen en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH, frente a la activación de ALDH2 utilizando Alda-1. Postulamos que la activación de ALDH2 producirá una reversión de los parámetros que se vieron alterados en el balance oxidativo y la funcionalidad mitocondrial por la exposición a Pb y EtOH.

Materiales y métodos

Obtención de Alda-1

Alda-1 fue sintetizado y generosamente proporcionado por el Dr. Mario Rivera-Meza, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Según el protocolo descrito por Rivera-Meza y cols, una solución de cloruro de 2,6-diclorobenzoílo y trietilamina en tetrahidrofurano anhidro se añadió gota a gota a una solución de 1,3-benzodioxol-5-metilamina en tetrahidrofurano anhidro. La suspensión resultante se dejó reposar durante 1 h con agitación a temperatura ambiente para luego ser transferida a una ampolla de decantación, donde se adicionó NaOH 1N. La fase acuosa se extrajo 3 veces con diclorometano y las fracciones orgánicas se combinaron y lavaron con agua hasta que la fase acuosa mostró un pH neutro. La fase orgánica se secó bajo sulfato de sodio anhidro, se filtró y se administró diclorometano evaporado al vacío. Alda-1 se recristalizó dos veces a partir de soluciones de EtOH, generando cristales blancos en forma de aguja. La estructura de Alda-1 fue confirmada por espectroscopía ¹H- y ¹³C-RMN (Rivera-Meza y cols, 2019).

Tratamiento con Alda-1

En este objetivo, las células SH-SY5Y fueron expuestas a 10 μ M de Pb y 200mM de EtOH como ha sido descrito en experimentos anteriores, y concomitantemente durante 24h tratadas con Alda-1 en una concentración de 20 μ m, con la finalidad de restaurar los niveles de actividad enzimática de ALDH2 que se ven afectados por la exposición a los tóxicos. Luego de transcurrido el tiempo de exposición y tratamiento, las células fueron procesadas de acuerdo con los protocolos antes mencionados para cuantificar:

- Actividad enzimática de ALDH2
- Expresión de ALDH2, mediante IF (anticuerpo primario: 1/1000, mouse antiALDH2, Invitrogen) y mediante WB (anticuerpo primario: 1/1000, rabbit antiALDH2, Abcam) (ver sección Materiales y métodos del Capítulo 2).

- Cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$, ver Materiales y métodos del Capítulo 3)
- Niveles de EROs (ver Materiales y métodos del Capítulo 3).
- Masa mitocondrial (ver Materiales y métodos del Capítulo 3).

Resultados

Efectos del tratamiento con Alda-1 sobre la actividad y expresión de ALDH2

Los efectos de la administración de Alda-1 sobre la actividad de ALDH2 se muestran en la **Figura 48**. De acuerdo a lo esperado, se observó un incremento en la actividad de ALDH2 en todos los grupos respecto a su estado basal (sin Alda-1). El análisis realizado mediante ANOVA de dos vías reveló diferencias entre los grupos expuestos a Pb, EtOH y su combinación respecto al C: $F_{(3, 30)} = 4,922$; $p < 0,005$, en el tratamiento con Alda-1: $F_{(1, 30)} = 221,0$; $p < 0,0001$ y en la interacción entre ambos: $F_{(3, 30)} = 4,742$; $p < 0,05$. Alda-1 fue capaz de incrementar la actividad enzimática de ALDH2 en todos los grupos, incluso el grupo control y resultando en un incremento de hasta 20 veces en el grupo expuesto a Pb y EtOH, respecto a la actividad enzimática inhibida por los tóxicos. Así, el test de Tukey realizado como *post-hoc* reveló que existen diferencias significativas en todos los grupos experimentales tratados con Alda-1 respecto a su estado basal y al control sin tratar.

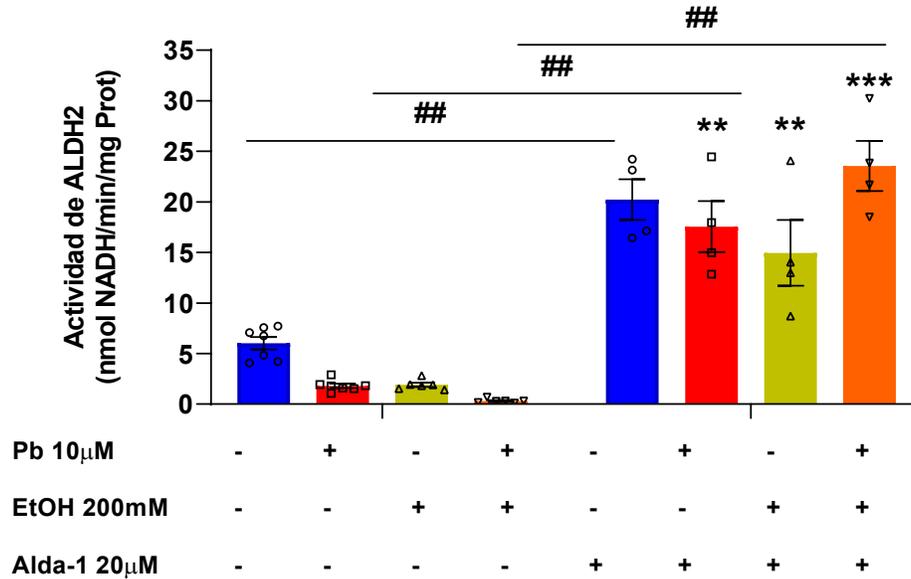
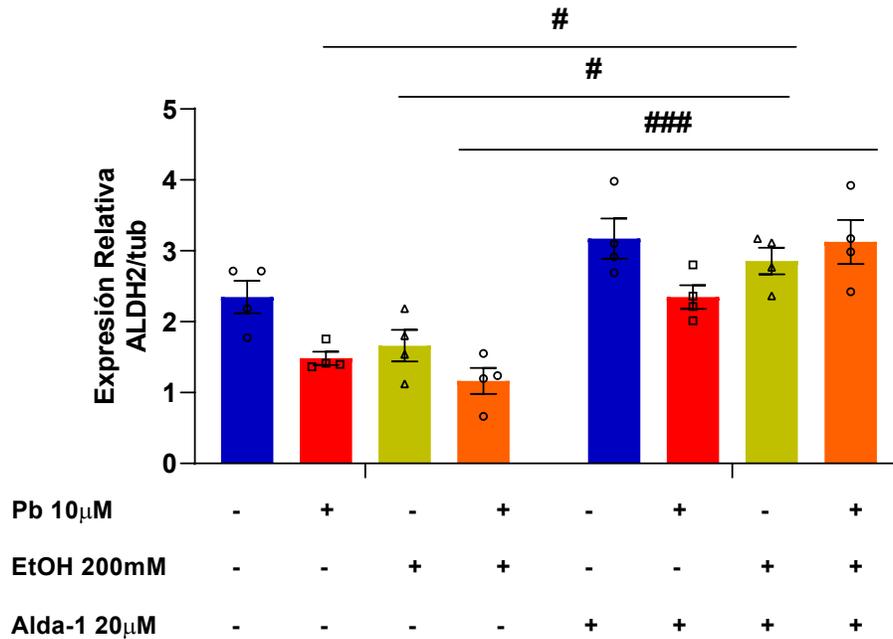


Figura 48. Actividad enzimática de ALDH2 en respuesta al tratamiento con Alda-1 **denota $p < 0,01$, *** denota $p < 0,001$ respecto al grupo C basal. #denota $p < 0,05$, ### denota $p < 0,01$ respecto al tratamiento con Alda-1.

El efecto de Alda-1 en la expresión de ALDH2, fue cuantificado mediante WB e IFI. Los resultados se grafican en las **Figuras 49 y 50** respectivamente.

El análisis mediante ANOVA de dos vías de la cuantificación por WB reveló diferencias entre el estado basal y la exposición a Alda-1 y la interacción entre ambos factores. $F_{(3, 24)} \text{ interacción} = 2,89$; $p < 0,05$; $F_{(1, 24)} \text{ Alda-1} = 61,28$; $p < 0,0001$; $F_{(3, 24)} \text{ Pb+EtOH} = 5,308$; $p < 0,005$. Esto evidencia que el tratamiento con Alda-1 fue capaz de aumentar también la expresión de la enzima ALDH2, revirtiendo el efecto ocasionado por la exposición a Pb y EtOH, retornando los niveles de enzima a valores similares a los del grupo C. El test de Tukey realizado como *post-hoc* arrojó diferencias: Pb vs Pb +Alda-1, $p < 0,01$; EtOH vs EtOH+Alda, $p < 0,05$; Pb + EtOH vs Pb + EtOH+Alda-1, $p < 0,001$. Sin embargo, Alda-1 no tuvo efecto significativo sobre la expresión de ALDH2 en el grupo control: C vs. C + Alda-1, $p > 0,05$.

A.



B.

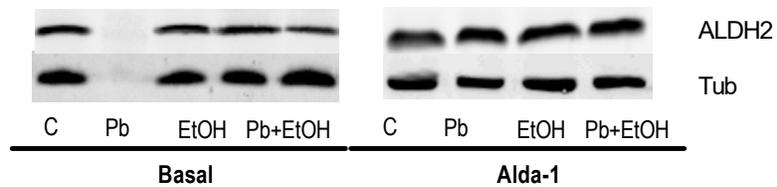
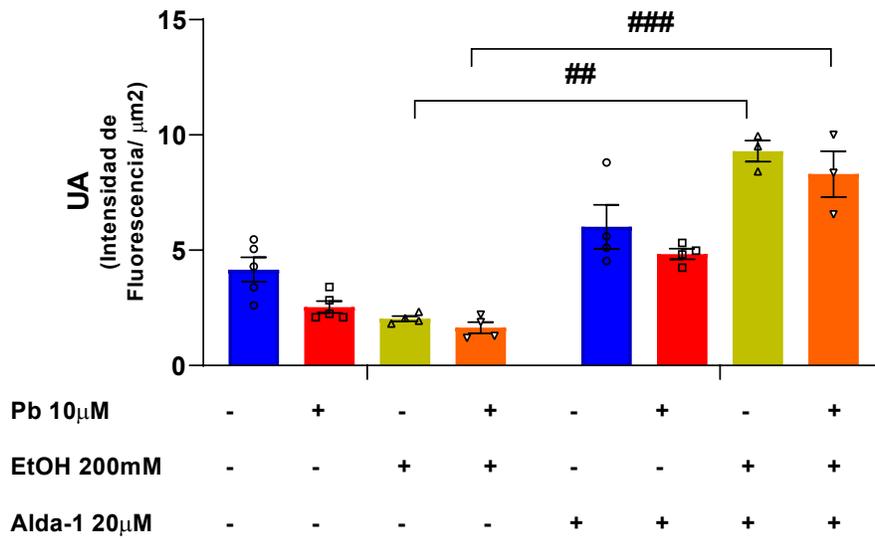


Figura 49. Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre la expresión de ALDH2. **A.** Cuantificación de la intensidad de las bandas de WB expresada como relación ALDH2/Tubulina. Los datos se presentan como la media \pm SEM. # denota $p < 0,05$, ### denota $p < 0,01$ respecto de la exposición a Pb y EtOH. **B** Imagen representativa del ensayo de WB para cuantificar niveles de proteína de ALDH2. Tubulina fue usada como control de carga.

El análisis mediante ANOVA de dos vías con posterior test de Tukey de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia reveló diferencias estadísticamente significativas entre el estado basal (exposición a Pb y EtOH), en el tratamiento con a Alda-1 y en la interacción entre ambos factores: $F_{(3, 24)} \text{ Interacción} = 14,08$; $p < 0,0001$; $F_{(1, 24)} \text{ Alda-1} = 143,2$; $p < 0,0001$; $F_{(3, 24)} \text{ Pb+EtOH} = 5,16$; $p < 0,05$. Este resultado está en concordancia con el obtenido mediante WB, ya que se observa que el tratamiento con Alda-1 fue capaz de

aumentar también la expresión proteica de ALDH2, revirtiendo el efecto ocasionado por la exposición a Pb y EtOH y retornando los niveles de enzima a valores similares e incluso mayores (C vs EtOH+Alda-1, $p < 0,05$; C vs Pb+EtOH+Alda-1, $p < 0,05$) a los del grupo control. También puede observarse un cambio de morfología celular luego del tratamiento con Alda.1 en comparación con las células expuestas a Pb, EtOH o su combinación (ver Figura 27 en el Capítulo 2).

A.



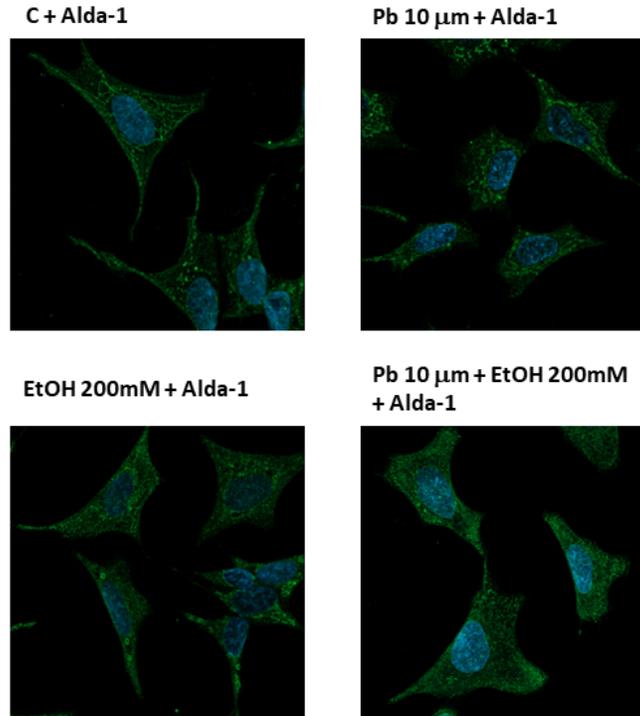
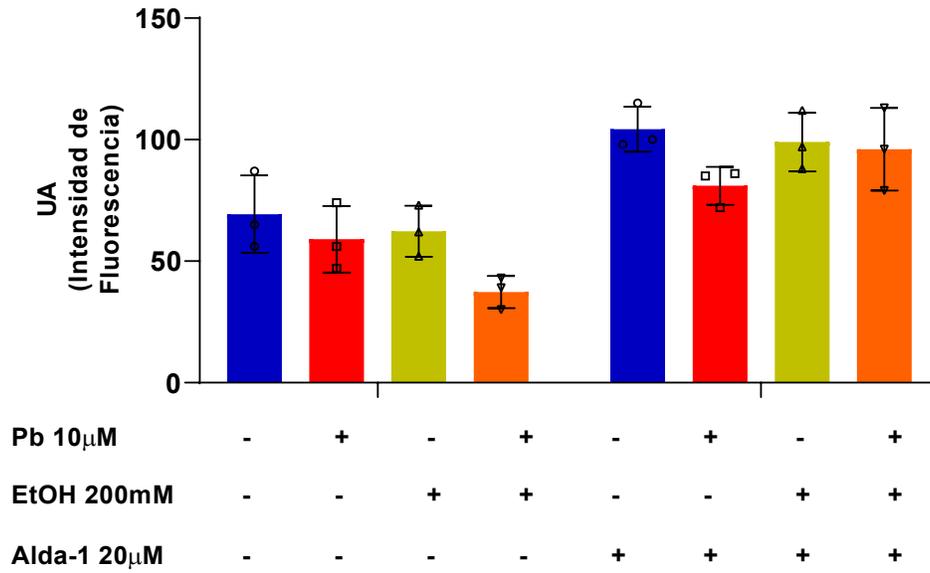
B.

Figura 50. Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre la expresión de ALDH2 cuantificada por IFI. A. Cuantificación de la intensidad fluorescencia, expresada como relación intensidad por μm^2 . ## denota $p < 0,05$, ###denota $p < 0,01$ respecto del basal. **B.** Imágenes representativas de IFI para ALDH2, 63X.

Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre la masa mitocondrial

Se observó un aumento en la cuantificación de la fluorescencia de Mitotracker Green FM por el tratamiento con Alda-1: $F_{(1,16)} = 58,93$; $p < 0,0001$; respecto del estado basal de exposición a ambos tóxicos, $F_{(3,16)} = 3,552$; $p < 0,05$; pero no se evidenció una interacción entre ambos factores: $F_{(3,16)} = 2,349$, $p > 0,1$; impidiendo la realización del análisis *post-hoc*.

A.



B.

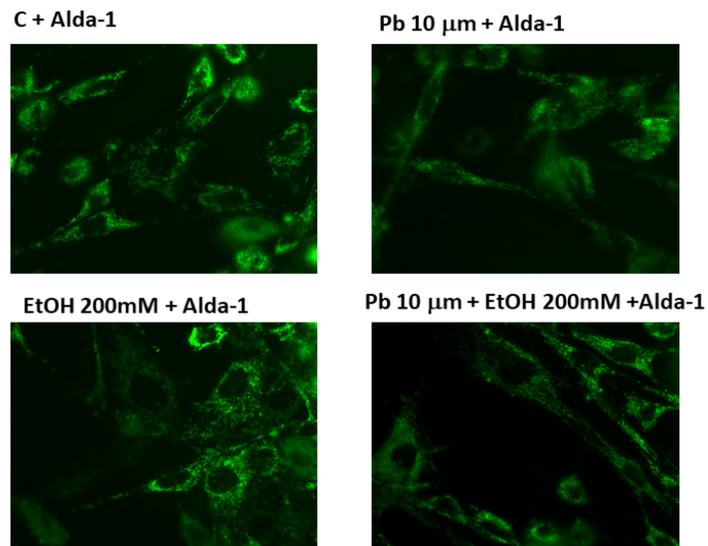
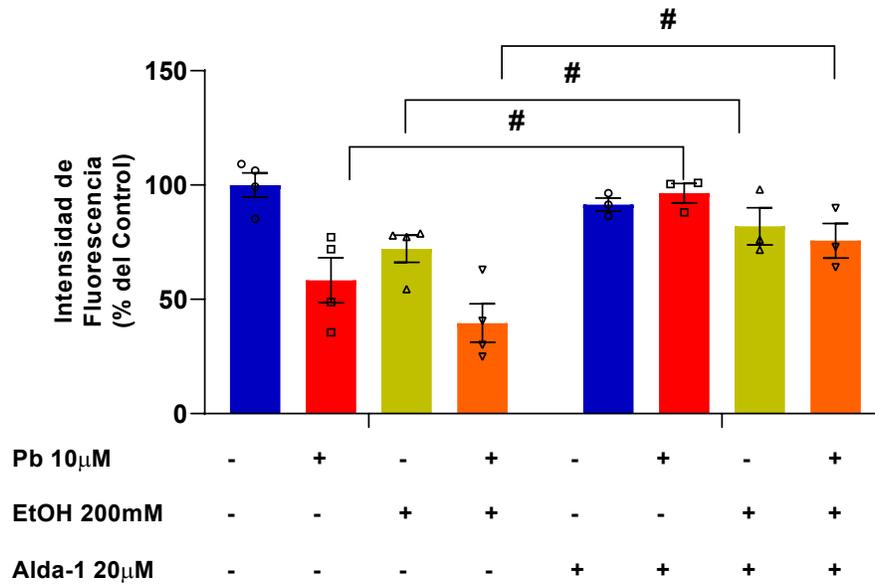


Figura 51. Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre la masa mitocondrial. A. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Mitotracker Green FM por campo. B. Fotografías representativas de cada condición (63X).

Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

Mediante la cuantificación de la relación entre la fluorescencia verde y roja de JC1 se pudo evidenciar una mejora significativa del $\Delta\Psi$ evaluado luego del tratamiento con Alda-1 en células SH-SY5Y expuestas a Pb y EtOH (**Figura 52 A y B**). El análisis mediante ANOVA de dos vías reveló diferencias estadísticamente significativas por la exposición a los tóxicos: $F_{(3, 20)} = 11,11$; $p < 0,001$; por el tratamiento con Alda-1: $F_{(1, 20)} = 14,65$; $p < 0,001$ y la interacción entre ambos factores fue también significativa: $F_{(3, 20)} = 7,662$; $p < 0,005$. Se evidencia que el tratamiento con Alda-1 logró revertir el daño causado por la exposición a Pb, EtOH o su combinación sobre $\Delta\Psi$. El test de Tukey realizado como *post-hoc* reveló diferencias significativas: Pb vs Pb+Alda-1, $p < 0,05$; EtOH vs EtOH+Alda-1, $p < 0,05$; Pb+EtOH vs Pb+EtOH+Alda-1, $p < 0,05$.

A.



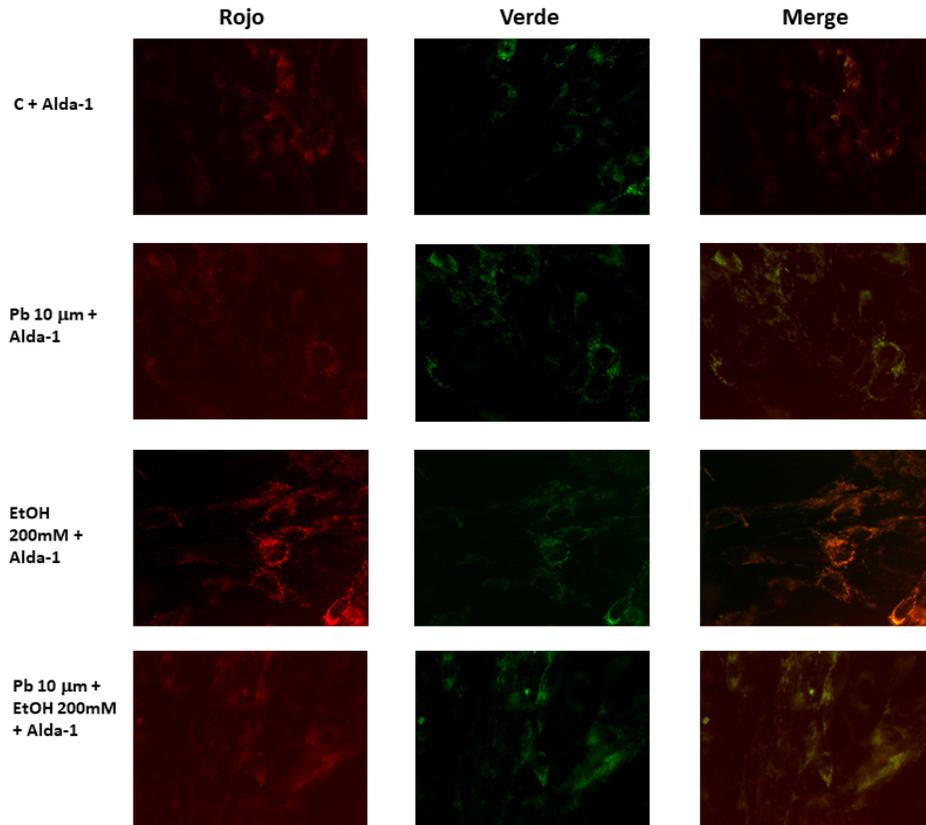
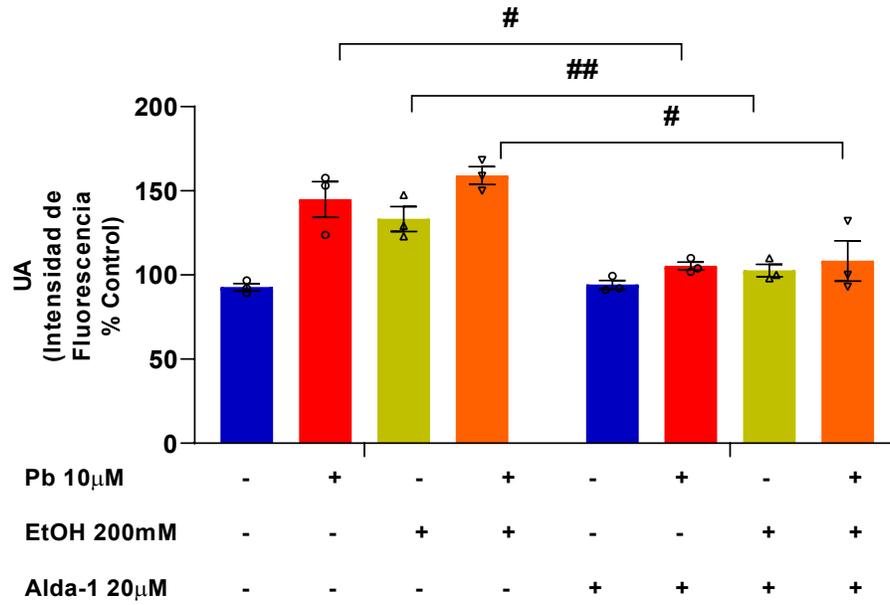
B.

Figura 52. Cuantificación de la fluorescencia de JC1. A. Gráfico del cociente entre la fluorescencia roja y verde de JC1, los valores se expresan como la media \pm SEM y como porcentaje del control, # denota $p < 0,05$ respecto de la exposición sin tratamiento con Alda-1. B. Fotografías representativas de cada condición, 63X

Efecto del tratamiento con Alda-1 sobre los niveles de EROs

El ANOVA de dos vías realizado mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a la exposición: $F_{(3, 16)} = 13,01$; $p < 0,05$; al tratamiento con Alda-1: $F_{(1, 16)} = 38,57$; $p < 0,0001$; y la interacción entre ambos factores: $F_{(3, 16)} = 5,461$; $p < 0,05$. El test de Tukey utilizado como *post-hoc* arrojó diferencias, evidenciando una disminución de los niveles de EROs en todos los grupos experimentales por el tratamiento con Alda-1, excepto en el grupo control ($p > 0,05$): Pb vs Pb+Alda-1, $p < 0,05$; EtOH vs EtOH+Alda-1, $p < 0,01$; Pb + EtOH vs Pb+EtOH+Alda-1, $p < 0,05$; **(Figura 53)**.

A.



B.

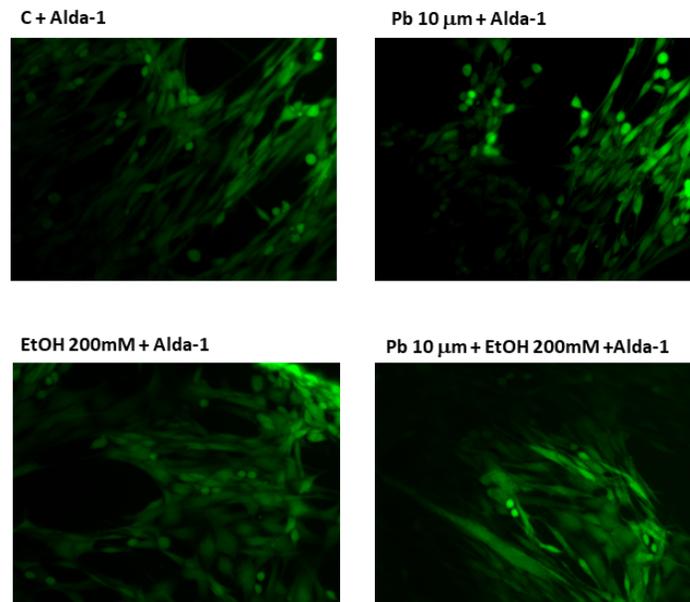


Figura 53. Cuantificación de los niveles de EROs mediante fluorescencia. A. Gráfico de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de DCF por campo, expresado como porcentaje del control. Se grafica la media \pm SEM. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto a la exposición a Pb y EtOH. B. Imágenes representativas de cada condición (63X).

Discusión y conclusiones parciales

En este trabajo de tesis hemos demostrado que el tratamiento con Alda-1 durante 24 h pudo revertir el daño ocasionado por la exposición a Pb y EtOH sobre la actividad de ALDH2. El aumento fue significativamente mayor (hasta 20 veces) en el grupo expuesto a Pb y EtOH, lo que podría indicar una diferencia conformacional de la enzima por interacción de ambos tóxicos, ya que se ha reportado que Alda-1 induce cambios alostéricos y estabiliza la unión tetramérica.

Interesantemente, también evidenciamos un aumento en la expresión de la enzima, determinando los niveles aumentados de proteína mediante WB e IFI en comparación con el estado basal de exposición a Pb y EtOH. Estos resultados podrían indicar una disminución en la acumulación de aldehídos tóxicos, como los ya mencionados ACD, 4-HNE y MDA, promoviendo su oxidación gracias a la restauración de la funcionalidad y los niveles de proteína de ALDH2. La cuantificación de aductos derivados del 4-HNE sería una estrategia interesante para evaluar en nuestro modelo experimental el impacto de Alda-1 sobre el desbalance redox, como así también en la respiración mitocondrial. Sin embargo, la disminución de los niveles de EROs por el tratamiento con Alda-1 dan evidencia del rol clave de ALDH2 en los mecanismos que mantienen el balance redox de la célula, y ponen de manifiesto el rol crucial de Alda-1 como una molécula con un gran potencial terapéutico, lo cual podría ser el mecanismo por el cual ALDH2 protegería a las células del daño oxidante. Además, observamos mediante las imágenes obtenidas por microscopía confocal un cambio en la morfología celular luego del tratamiento con Alda-1 en comparación al control sin tratamiento, y a los grupos expuestos a Pb. Al respecto, si bien ha sido documentado mediante la observación en microscopio de campo claro (20X) que la exposición a Pb (5 y 10 μM durante 48hs) de células SH-SY5Y provocó una pérdida de neuritas, una disminución del número de células y una modificación de la morfología (Chetty y cols, 2005), no ha sido reportado el efecto causado por la exposición a Pb+EtOH, ni bajo condiciones de tratamiento con Alda-1 sobre la morfología celular, lo cual sería interesante para continuar desarrollando en nuestro modelo experimental para continuar

caracterizando los mecanismos mediante los cuales la activación de ALDH2 revierte los daños ocasionados por la exposición a Pb.

En relación a los parámetros de funcionalidad mitocondrial que pudimos evaluar, determinamos que el tratamiento con Alda-1 revirtió el efecto generado por la exposición a Pb, EtOH o su combinación en el $\Delta\Psi$, lo que podría traducirse en una mejoría en la estabilidad de la CTE en la organela y su funcionalidad. A este respecto, en estudios realizados en cardiomiocitos, Alda-1 parece tener un impacto positivo en la respiración mitocondrial, aumentando la producción de ATP y restaurando el $\Delta\Psi$, por lo que los autores postulan que la ALDH2 activada por Alda-1 puede haber restaurado eficazmente la integridad mitocondrial y la función bioenergética y, en consecuencia, la homeostasis energética y la producción de energía cardíaca (Pang y cols, 2017).

En concordancia con lo mencionado anteriormente, Wimborne y cols, en 2020, evidenciaron un aumento de EROs y 4-HNE en hígado de animales tratados con acetaminofeno y demostraron que la activación de ALDH2, mediante la administración de Alda-1 fue capaz de revertir los daños a nivel del $\Delta\Psi$ y la formación de aductos derivados de 4-HNE, mitigando así los efectos hepatotóxicos del acetaminofeno (Wimborne y cols, 2020).

Así hemos podido demostrar que la activación de ALDH2 mediante Alda-1 revierte el daño oxidativo y la funcionalidad mitocondrial, causada por la exposición a Pb, EtOH o su combinación en células SH-SY5Y, mediante un mecanismo que involucra directamente a la enzima ALDH2 evidenciando su rol como enzima antioxidante y neuroprotectora.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo de tesis se abordaron diferentes perspectivas de los mecanismos de toxicidad resultantes de la exposición a Pb, un conocido neurotóxico del desarrollo, y a EtOH, una droga legal de amplio uso y abuso en la población con numerosos efectos adversos reportados a niveles del SNC.

Tanto en los estudios *in vivo* como *in vitro* pudo demostrarse que la interacción de ambos tóxicos a nivel neuronal disminuye la actividad y expresión de la proteína de ALDH2, una oxidoreductasa de localización mitocondrial cuya función es esencial para la integridad celular y mitocondrial, puesto que metaboliza aldehídos tóxicos, incluyendo el ACD producto de la degradación oxidativa del EtOH.

Estos efectos sobre la actividad enzimática fueron revertidos tanto por la administración de NAD⁺, cofactor esencial de ALDH2 y numerosas enzimas mitocondriales; como de Alda-1, un activador de ALDH2, que también fue capaz de aumentar la expresión de la enzima.

En cuanto a los mecanismos moleculares de la interacción Pb-EtOH, se demostró el aumento de producción de EROs a nivel celular, con un marcado aumento en los efectos generados por el daño peroxidativo a lípidos de membrana, representados por un aumento en los niveles de MDA. Como evento secundario de toxicidad, encontramos eventos compatibles con un estado de disfunción mitocondrial, como una capacidad de reserva mitocondrial disminuida, con compromiso de la capacidad respiratoria máxima y disminución del $\Delta\Psi$. A su vez, demostramos una disminución en la masa mitocondrial total por interacción de Pb y EtOH. Estos cambios obedecen a un estado de disfunción mitocondrial que antecede a los procesos de muerte celular en un contexto de aumento de la producción de EROs y compromiso de la fosforilación oxidativa. En cuanto a la viabilidad celular, si bien no se evidencian diferencias significativas entre los grupos, un 20% de las células se encuentran no viables en respuesta al tratamiento con 10 μM de Pb y 200 mM de EtOH, luego manifestarse en etapas posteriores como eventos de muerte celular programada.

En relación a los efectos sobre la funcionalidad dopaminérgica en células SH-SY5Y, se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de ALDH2 puede potenciar la toxicidad de DA. A este respecto, se ha mencionado anteriormente que el EtOH es una droga de abuso que induce un aumento de la liberación de DA en la vía mesolímbica de mamíferos superiores. Así, es posible postular que en estas células que poseen características catecolaminérgicas el tratamiento con EtOH y Pb interrumpirá el metabolismo de DA por la inhibición que ambos ejercen sobre la enzima ALDH2, propiciando así la acumulación de DOPAL cuya formación se vería aumentada por el exceso de DA y degradación disminuida por el bloqueo de la enzima. En este mismo sentido el ACD generado a partir del exceso de EtOH verá también favorecida su acumulación, sometiendo a las células a un cóctel de aldehídos tóxicos, lo cual sumado a la disfunción mitocondrial y al desbalance redox verá afectada su capacidad de normal funcionamiento.

Cabe destacar que las enzimas ALDHs están involucradas en el balance redox y en procesos de detoxificación, por ser consideradas “secuestradoras de aldehídos”, particularmente durante la peroxidación lipídica. Es así que esta superfamilia representa una clase de enzimas que contribuyen al manejo del estrés oxidativo/electrofilico en los organismos vivos, por lo que una reducción en su funcionalidad se relaciona con numerosas patologías. En este trabajo de tesis hemos aportado evidencias que extienden este concepto a efectos sub-umbrales producidos por un contaminante y/o una droga de abuso, relacionado a las teorías de las bases ambientales de las enfermedades neurológicas.

Interesantemente, Alda-1 fue capaz de revertir los efectos que se generaron por la exposición a 10 μ M de Pb y 200mM de EtOH sobre el $\Delta\Psi$ y la producción de EROs. Es así que la neuroprotección resultante de la reducción de EROs y de la recuperación del $\Delta\Psi$, inducida por el activador Alda-1, indicarían que ALDH2 juega un rol clave en el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial y el balance redox del organismo. Lo que aún no se ha dilucidado es si la deficiencia de ALDH2 produce disfunción mitocondrial y por lo tanto incremento en la generación de EROs, como lo postula el trabajo realizado por Wakabayashi (Wakabayashi y cols, 2020), o si, por el contrario, la inadecuada funcionalidad de los complejos mitocondriales (en particular el Complejo

I) trae como consecuencia la inhibición de la enzima por la baja disponibilidad de su cofactor debido a la alteración de la relación NADH/NAD⁺, lo que podría generar un desbalance redox y dañar la mitocondria, puesto que esta organela es tanto un blanco celular como una fuente de EROs tóxicas. Más aún, las células que contienen DA están sujetas a estrés oxidativo debido al ciclado redox de las catecolaminas a aldehídos reactivos tales como DOPAL, MDA y 4-HNE, conduciendo a un incremento en la generación de EROs como está bien descrito para modelos animales de parkinsonismo (Chiu y cols, 2015).

Este escenario podría encontrar un paralelismo con la exposición concomitante a los dos neurotóxicos bajo estudio, Pb y EtOH, los cuales hemos demostrado producen una inhibición de ALDH2 en células SH-SY5Y. Estas células, además de poseer toda la maquinaria necesaria para sintetizar y metabolizar DA, han demostrado ser muy sensibles a sustancias tóxicas para las neuronas dopaminérgicas, por ejemplo, SAL y demás isoquinolinas (Maruyama y cols, 2000). Al respecto, se ha demostrado que Alda-1 también incrementa la actividad de ALDH1A1, una isoforma citosólica que comparte una gran homología con ALDH2 (Kotraiah y cols, 2013); más aún, su sobreexpresión redujo la citotoxicidad por daño oxidativo en células SH-SY5Y (Zhang y cols, 2010). Es así que en base a estas y otras evidencias se propone a Alda-1 como una estrategia terapéutica para la co-exposición a Pb y EtOH, dado el rol crítico de ALDH2 en el metabolismo de EtOH y a su susceptibilidad a ser inhibida por ambos neurotóxicos como ha sido demostrado en este trabajo de tesis. Si bien la acumulación de otros aldehídos no ha sido medida directamente (solo inferida por la medición de TBARS), estos resultados aportan evidencias robustas al rol crítico de la enzima ALDH2 en numerosos trastornos y patologías ocasionadas por su inhibición y abren nuevas avenidas a terapias destinadas a reducir los niveles de aldehídos tóxicos.

Así, en tanto que los abordajes con terapia antioxidante para la exposición a Pb actualmente despiertan menos expectativas por la falta de eficacia debida a la ubicuidad de los efectos observados, se espera que nuevos blancos moleculares sean considerados, tales como los activadores de ALDH2 como Alda-1 propuestos en esta tesis, aunque futuros experimentos son necesarios para explicar su mecanismo de acción en mayor detalle. Estos abordajes trascienden a los efectos descritos sobre el

desbalance redox, alcanzando también a la disfunción mitocondrial por la importancia de esta organela en el mantenimiento del balance energético, así como su vulnerabilidad a la formación de aductos de las numerosas proteínas que la conforman. En conjunto, preservando la funcionalidad de las enzimas involucradas en la formación y degradación de aldehídos tóxicos, así como de nuevos compuestos antioxidantes se podrá prevenir el desarrollo y la progresión de las alteraciones neurológicas descritas en seres humanos y mamíferos superiores, por la intoxicación con Pb y consumo excesivo de EtOH.

En relación a estas evidencias, en un modelo animal de exposición perinatal a bajas dosis de Pb, demostramos que la huella que imprime en áreas límbicas (CPF, Estriado dorsal y NAc) el contacto con este metal, condiciona el comportamiento frente al consumo voluntario de EtOH durante el período adolescente. Esta alteración en la respuesta a EtOH manifiesta un estado de vulnerabilidad de los individuos que han sufrido exposición a Pb durante el desarrollo temprano frente al uso y abuso de drogas con potencial poder adictivo.

A este respecto, demostramos que CIAN, un inhibidor farmacológico de ALDH2, administrada *in situ* en cerebro indujo un aumento en el consumo de EtOH tanto en animales C como aquellos que han sido expuestos a Pb, demostrando el rol clave de ALDH2 en el comportamiento de consumo de EtOH. En este contexto, se puede postular que la acumulación de ACD en áreas mesolímbicas relacionadas a la recompensa, sería responsable del escalonamiento del consumo de EtOH debido a su capacidad reforzante. Dado que EtOH es considerado por muchos autores como una pro-droga y que los efectos del mismo estarían mediados exclusivamente por ACD, podemos decir que en los animales que fueron expuestos a Pb durante el desarrollo se acumula ACD en cerebro, que desencadenaría el aumento escalonado de la adquisición de la conducta de consumo voluntario de EtOH debido a sus propiedades reforzantes. A su vez, considerando que ACD es altamente reactivo y capaz de formar aductos con diferentes macromoléculas, entre ellas el neurotransmisor DA, con la consecuente formación de SAL, se favorecería aún más la liberación de este neurotransmisor en áreas límbicas debido al EtOH. Estos resultados aportan evidencias que demuestran el rol principal del

metabolismo oxidativo del EtOH en los efectos motivacionales y de búsqueda de la droga.

El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales la enzima ALDH2 es inhibida por la exposición a Pb, EtOH o su combinación resulta clave para prevenir la acumulación de ACD en el contexto de los AUDs o de enfermedades neurodegenerativas que involucran otros aldehídos tóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

A continuación, se referencian en orden alfabético los trabajos científicos citados a lo largo de la tesis.

- Adonaylo, V. N., & Oteiza, P. I. (1999). Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, *135*(2–3), 77–85. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00051-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00051-7)
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro *Methods Enzymol.* *105*(1947), 121–126.
- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., & Siddiqui, M. K. J. (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environment*, *346*(1–3), 48–55.
- Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C., & Naassila, M. (2013). Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, *67*, 521–531.
- Albano, E. (2002). Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *32*(2), 110–114.
- Alnouti, Y., & Klaassen, C. D. (2008). *Tissue Distribution , Ontogeny , and Regulation of Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Enzymes mRNA by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Mice.* *101*(1), 51–64.
- Anderson, D. W., Schray, R. C., Duester, G., & Schneider, J. S. (2011). Functional significance of aldehyde dehydrogenase ALDH1A1 to the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, *1408*, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.051>
- Aragon, C. M. G., Stotland, L. M., & Amit, Z. (1991). *Studies on Ethanol-Brain Catalase Interaction: Evidence for Central Ethanol Oxidation.* *15*(2).
- Araújo, D., Martins, D. B. G., & Borba, M. (2016). Chapter 10: Oxidative Stress and Disease. *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2 (185-199).*
- Arenas-jal, M., & García-montoya, E. (2020). Therapeutic potential of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). *European Journal of Pharmacology*, *173158*.
- Bai, L., Liu, R., Wang, R., Xin, Y., Wu, Z., Ba, Y., Zhang, H., Cheng, X., Zhou, G., & Huang, H. (2021). Ecotoxicology and Environmental Safety Attenuation of Pb-induced A β generation and autophagic dysfunction via activation of SIRT1 : Neuroprotective properties of resveratrol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *222*, 112511.
- Baranowska-Bosiacka, I., Struzyńska, L., Gutowska, I., Machalińska, A., Kolasa, A., Kłos, P., Czapski, G. A., Kurzawski, M., Prokopowicz, A., Marchlewicz, M., Safranow, K., Machaliński, B., Wiszniewska, B., & Chlubek, D. (2013). Perinatal exposure to lead induces morphological, ultrastructural and molecular alterations in the hippocampus. *Toxicology*, *303*, 187–200.
- Bell, R. G., & Smith, H. W. (1949). Preliminary report on clinical trials of antabuse. *Canadian Medical Association Journal*, *60*(3), 286–288.

- Bell, R. L., Hauser, S. R., Liang, T., Sari, Y., Maldonado-Devincci, A., & Rodd, Z. A. (2017). Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders. *Neuropharmacology*, *122*, 201–243.
- Bellinger, D. C., & Bellinger, A. M. (2006). Childhood lead poisoning: The torturous path from science to policy. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(4), 853–857.
- Belmont-Díaz, J. A., Yoval-Sánchez, B., Calleja-Castañeda, L. F., Pardo Vázquez, J. P., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2016). Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *The FEBS Journal*, *283*(19), 3637–3650.
- Berríos-Cárcamo, P., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschit, M., Vasiliou, V., Zapata-Torres, G., & Rivera-Meza, M. (2017). Racemic salsolinol and its enantiomers act as agonists of the μ -opioid receptor by activating the Gi protein-adenylate cyclase pathway. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*(January), 1–11.
- Biedler, J. L., & Schachner, M. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*, *38*(February), 3751–3757.
- Birková, A., Hubková, B., Čížmárová, B., & Bolerázska, B. (2021). Current View on the Mechanisms of Alcohol-Mediated Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18).
- Bokara, K. K., Brown, E., McCormick, R., Yallapragada, P. R., Rajanna, S., & Bettaiya, R. (2008). Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. *BioMetals*, *21*(1), 9–16.
- Braun, T., Bober, E., Singh, S., Agarwal, D. P., & Goedde, H. W. (1987). Evidence for a signal peptide at the amino-terminal end of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *FEBS Letters*, *215*(2), 233–236.
- Breitzig, M., Bhimineni, C., Lockey, R., & Kolliputi, N. (2016). *4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress?* *2*, 537–543. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00101.2016>
- Brien, J. F., Peachey, J. E., Rogers, B. J., & Loomis, C. W. (1978). A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *14*(2), 133–141.
- Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X., Kotchoni, S. O., Wood, A. J., Kirch, H.-H., Kopečný, D., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*, *237*(1), 189–210.
- Brooks, P. J., & Theruvathu, J. A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *35*(3), 187–193.
- Caito, S., & Aschner, M. (2017). Developmental Neurotoxicity of Lead. *Advances in Neurobiology*, *18*, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2_1
- Cederbaum, A I. (1981). The effect of cyanamide on acetaldehyde oxidation by isolated rat liver mitochondria and on the inhibition of pyruvate oxidation by acetaldehyde. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *5*(1), 38–44.
- Cederbaum, Arthur I, Lu, Y., & Wu, D. (2009). Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, *83*(6), 519–548.

- Cezard, C., Demarquilly, C., Boniface, M., & Haguenoer, J. M. (1992). Influence of the degree of exposure to lead on relations between alcohol consumption and the biological indices of lead exposure: Epidemiological study in a lead acid battery factory. *British Journal of Industrial Medicine*, 49(9), 645–647.
- Chen, C., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M., Thomas, D., & Mochly-Rosen, D. (2009). An Activator of Mutant and Wildtype Aldehyde Dehydrogenase Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science*, 321(5895), 1493–1495.
- Chen, C. H., Joshi, A. U., & Mochly-Rosen, D. (2016). The role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in neuropathology and neurodegeneration. *Acta Neurologica Taiwanica*, 25(4), 111–123.
- Chen, C., Joshi, A. U., & Mochly-rosen, D. (2016). *The Role of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) in Neuropathology and Neurodegeneration*. 25(4), 111–123.
- Chetty, C. S., Vemuri, M. C., Campbell, K., & Suresh, C. (2005). Lead-induced cell death of human neuroblastoma cells involves GSH deprivation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10(3), 413–423.
- Cheung, Y.-T., Lau, W. K.-W., Yu, M.-S., Lai, C. S.-W., Yeung, S.-C., So, K.-F., & Chang, R. C.-C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127–135.
- Chiarugi, A., Dölle, C., Felici, R., & Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews. Cancer*, 12(11), 741–752.
- Chiu, C. C., Yeh, T. H., Lai, S. C., Wu-Chou, Y. H., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D., Huang, Y. C., Chen, Y. J., Chen, C. L., Chang, Y. M., Wang, H. L., & Lu, C. S. (2015). Neuroprotective effects of aldehyde dehydrogenase 2 activation in rotenone-induced cellular and animal models of parkinsonism. *Experimental Neurology*, 263, 244–253.
- Cocheme, H. M., & Murphy, M. P. (2008). Complex I Is the Major Site of Mitochondrial Superoxide Production by Paraquat *The Journal Of Biological Chemistry* 283(4), 1786–1798.
- Correa, M., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2000). *Lead Acetate Potentiates Brain Catalase Activity and Enhances Ethanol-Induced Locomotion in Mice*. 66(1), 137–142.
- Cory-Slechta, D. A., Virgolini, M. B., Thiruchelvam, M., Weston, D. D., & Bauter, M. R. (2004). Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 112(6), 717–730.
- Deckers-Hebestreit, G., & Altendorf, K. (1992). The Fo complex of the proton-translocating F-type ATPase of Escherichia coli. *The Journal of Experimental Biology*, 172, 451–459.
- Deehan, G. A. J., Brodie, M. S., & Rodd, Z. A. (2013). What is in that drink: the biological actions of ethanol, acetaldehyde, and salsolinol. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 13, 163–184.
- Deitrich, R. A. (2004). Acetaldehyde: déjà vu du jour. *Journal of Studies on Alcohol*, 65(5), 557–572.
- Deza-Ponzio, R., Herrera, M. L., Bellini, M. J., Virgolini, M. B., & Hereñú, C. B. (2018). Aldehyde dehydrogenase 2 in the spotlight: The link between mitochondria and neurodegeneration. *NeuroToxicology*, 68, 19–24.

- Disalvo, L., Aab, C., Pereyras, S., Pattín, J., Apezteguía, M., Iannicelli, J. C., Girardelli, A., & Varea, A. (2009). Blood lead levels in children from the city of La Plata, Argentina. Relationship with iron deficiency and lead exposure risk factors. *Revista Chilena de Pediatría*, *82*(1), 63–64.
- Doerrier, C., Garcia-Souza, L. F., Krumschnabel, G., Wohlfarter, Y., Mészáros, A. T., & Gnaiger, E. (2018). High-resolution fluoro respirometry and oxphos protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1782).
- Dranka, B. P., Hill, B. G., & Darley-Usmar, V. M. (2010). Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, *48*(7), 905–914.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, *82*(1), 47–95.
- Eisner, V., Picard, M., & Hajnóczky, G. (2018). Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nature Cell Biology*, *20*(7), 755–765.
- Eriksson, C. J. (2001). The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *25*(5 Suppl ISBRA), 15S–32S.
- Eriksson, C. J., & Sippel, H. W. (1977). The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-I. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochemical Pharmacology*, *26*(3), 241–247.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, *11*(1), 81–128.
- Estonius, M., Danielsson, O., Karlsson, C., Persson, H., Jörnvall, H., & Höög, J. O. (1993). Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases. Assessment of mRNA species in mammalian tissues. *European Journal of Biochemistry*, *215*(2), 497–503.
- Evinova, A., Cizmarova, B., Hatokova, Z., & Racay, P. (2020). High-Resolution Respirometry in Assessment of Mitochondrial Function in Neuroblastoma SH-SY5Y Intact Cells. *Journal of Membrane Biology*, *253*(2), 129–136.
- Flora, G. J. S., Khanna, V. K., & Seth, P. K. (1999). Changes in neurotransmitter receptors and neurobehavioral variables in rats co-exposed to lead and ethanol. *Toxicology Letters*, *109*(1–2), 43–49.
- Flora, S. J., & Tandon, S. K. (1987). Effect of combined exposure to lead and ethanol on some biochemical indices in the rat. *Biochemical Pharmacology*, *36*(4), 537–541.
- Flora, S. J.S., Gautam, P., & Dwivedi, N. (2012). Dose-dependent effects of ethanol on lead-induced oxidative stress in rats. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, *31*(1), 61–73.
- Flora, Swaran Jeet Singh, Saxena, G., & Mehta, A. (2007). Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: Role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *322*(1), 108–116.
- Florang, V. R., Rees, J. N., Brogden, N. K., Anderson, D. G., Hurley, T. D., & Doorn, J. A. (2007). Inhibition of

- the oxidative metabolism of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a reactive intermediate of dopamine metabolism, by 4-hydroxy-2-nonenal. *NeuroToxicology* 28, 76–82.
- French, S. W., Mayer, R. J., Bardag-Gorce, F., Ingelman-Sundberg, M., Rouach, H., Neve And, E., & Higashitsuji, H. (2001). The ubiquitin-proteasome 26s pathway in liver cell protein turnover: effect of ethanol and drugs. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 25(5 Suppl ISBRA), 225S-229S.
- Fritz, K. S., Galligan, J. J., Hirschey, M. D., Verdin, E., & Petersen, D. R. (2012). Mitochondrial Acetylome Analysis in a Mouse Model of Alcohol- Induced Liver Injury Utilizing SIRT3 Knockout Mice. *J Proteome Res.* 11(3): 1633–1643.
- Fu, S.-H., Zhang, H.-F., Yang, Z.-B., Li, T.-B., Liu, B., Lou, Z., Ma, Q.-L., Luo, X.-J., & Peng, J. (2014). Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(1), 87–94.
- Fukuto, J. M., Gulati, P., & Nagasawa, H. T. (1994). Involvement of nitroxyl (HNO) in the cyanamide-induced vasorelaxation of rabbit aorta. *Biochemical Pharmacology*, 47(5), 922–924.
- Galter, D., Carmine, A., Buervenich, S., Duester, G., & Olson, L. (2003). Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *European Journal of Biochemistry*, 270(6), 1316–1326.
- Gąssowska, M., Baranowska-Bosiacka, I., Moczyłowska, J., Frontczak-Baniewicz, M., Gewartowska, M., Strużyńska, L., Gutowska, I., Chlubek, D., & Adamczyk, A. (2016). Perinatal exposure to lead (Pb) induces ultrastructural and molecular alterations in synapses of rat offspring. *Toxicology*. 373, 13–29.
- Giedd, J. N. (2008). The teen brain: insights from neuroimaging. *The Journal of Adolescent Health : Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, 42(4), 335–343.
- Gnaiger, E. (2014). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. In *Mitochondrial Physiology Network*. <http://wiki.oroboros.at/>
- Grünblatt, E., & Riederer, P. (2016). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 123(2), 83–90.
- Grant, B. F., Stinson, F. S., & Harford, T. C. (2001). Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up. *Journal of Substance Abuse*, 13(4), 493–504.
- Gross, E. R., Zambelli, V. O., Small, B. A., Ferreira, J. C. B., Chen, C. H., & Mochly-Rosen, D. (2015). A personalized medicine approach for Asian Americans with the aldehyde dehydrogenase 2*2 variant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(September), 107–127.
- Guerri, C., & Pascual, M. (2010). Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 44(1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.10.003>
- Gump, B. B., Stewart, P., Reihman, J., Lonky, E., Darvill, T., Parsons, P. J., & Granger, D. A. (2008). Low-level prenatal and postnatal blood lead exposure and adrenocortical responses to acute stress in

- children. *Environmental Health Perspectives*, 116(2), 249–255.
- Guo, J., Liu, A., Zang, P., Dong, W., Ying, L., Wang, W., Xu, P., & Song, X. (2013). ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. *Cell Research* 2, 915–930.
- Gupta, P. K. (2016). Toxic effects of metals. *Fundamentals of Toxicology*, 203–213.
- Gurer-Orhan, H., Sabir, H. U., & Ozgüneş, H. (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195(2–3), 147–154.
- Haider, S., Saleem, S., Tabassum, S., Khaliq, S., Shamim, S., Batool, Z., Parveen, T., Inam, Q. U. A., & Haleem, D. J. (2013). Alteration in plasma corticosterone levels following long term oral administration of lead produces depression like symptoms in rats. *Metabolic Brain Disease*, 28(1), 85–92.
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 505–513.
- Handler, J. A., & Thurman, R. G. (1990). Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 265(3), 1510–1515.
- Hansen C., Buteler R., Procopovich E., Pagan G, Blas Diaz, Gait N., Virgolini M., Mezzano M., Britos S., Fulginiti S.(1999). Niveles de plomo en sangre en niños de la ciudad de Córdoba. *Medicina* 59: 167-170
- Hase, B., Werner-Grüne, S., Deckers-Hebestreit, G., & Strotmann, H. (1996). Site-directed mutagenesis of two conserved charged amino acids in the N-terminal region of alpha subunit of E. coli-F(0)F(1). *FEBS Letters*, 382(1–2), 171–174.
- Hassinen, I. E., Härkönen, M. H., & Ylikahri, R. H. (1974). Metabolic effects of acetaldehyde in the intact rat brain cortex and its subcellular fractions. *Brain Research*, 70(2), 301–312.
- Heit, C., Dong, H., Chen, Y., Thompson, D. C., Deitrich, R. A., & Vasiliou, V. K. (2013). The role of CYP2E1 in alcohol metabolism and sensitivity in the central nervous system. *Sub-Cellular Biochemistry*, 67, 235–247.
- Hempel, J., & Lindahl, R. (1989). Class III aldehyde dehydrogenase from rat liver: super-family relationship to classes I and II and functional interpretations. *Progress in Clinical and Biological Research*, 290, 3–17.
- Hernberg, S. (2000). Lead poisoning in a historical perspective. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 244–254.
- Hingson, R. W., Heeren, T., & Winter, M. R. (2006). Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 160(7), 739–746.
- Hipólito, L., Martí-Prats, L., Sánchez-Catalán, M. J., Polache, A., & Granero, L. (2011). Induction of conditioned place preference and dopamine release by salsolinol in posterior VTA of rats: Involvement of μ -opioid receptors. *Neurochemistry International*, 59(5), 559–562.
- Hong, Y., Nie, H., Wu, D., Wei, X., Ding, X., & Ying, W. (2014). NAD⁺ treatment prevents rotenone-induced

- apoptosis and necrosis of differentiated PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 560, 46–50.
- Husain, K., Scott, B. R., Reddy, S. K., & Somani, S. M. (2001). Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*, 25(2), 89–97.
- 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.
- Isse, T., Oyama, T., & Matsuno, K. (2005). Aldehyde dehydrogenase 2 activity affects symptoms produced by an intraperitoneal acetaldehyde injection , but not acetaldehyde lethality *The Journal of Toxicological Sciences*. 30(4), 315–328.
- Jamal, M., Ameno, K., Kumihashi, M., Ameno, S., Kubota, T., Wang, W., & Ijiri, I. (2003). Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.
- Jurczuk, M., Moniuszko-Jakoniuk, J., & Brzóska, M. M. (2006). Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology*, 219(1–3), 11–21.
- Jusko, T. A., Jr, C. R. H., Lanphear, B. P., Cory-slechta, D. A., Parsons, P. J., & Canfield, R. L. (2008). Research | Children ’ s Health Blood Lead Concentrations < 10 µg / dL and Child Intelligence at 6 Years of Age *Enviromental Health Perspectives*. 116(2), 243–248.
- Karahanian, E., Quintanilla, E., Tampier, L., Rivera-meza, M., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., & Bustamante, D. (2011). Ethanol as a Prodrug : Brain Metabolism of Ethanol Mediates its Reinforcing Effects. *ACER*.35(4), 606–612.
- Karahanian, E., Rivera-Meza, M., Tampier, L., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2015). Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addiction Biology*. (20)336-344
- Kawalek, J. C., Howard, K. D., Farrell, D. E., Derr, J., Cope, C. V, Jackson, J. D., & Myers, M. J. (2003). Effect of oral administration of low doses of pentobarbital on the induction of cytochrome P450 isoforms and cytochrome P450-mediated reactions in immature Beagles. *American Journal of Veterinary Research*, 64(9), 1167–1175.
- Kazi, T. G., Shah, F., Afridi, H. I., Mughal, M. A., Naeemullah, Arain, S. S., & Arain, M. B. (2013). Evaluation of lead levels in biological samples of mentally retarded children in different stages using advanced extraction method. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 858–864.
- Khwanthana Grataitonga, P. D. (2012). *Retinoic Acid Attenuates Cell Death and Reduces Tyrosine Hydroxylase Expression in Ethanol-Treated Human*. 2(5), 204–210.
- Kim, J. M., Stewart, R., Shin, I. S., Jung, J. S., & Yoon, J. S. (2004). Assessment of association between mitochondrial aldehyde dehydrogenase polymorphism and Alzheimer’s disease in an older Korean population. *Neurobiology of Aging*, 25(3), 295–301.

- Kim, S., Hyun, J., Kim, H., Kim, Y., Kim, E., Jang, J., & Kim, K. (2011). Effects of lead exposure on nitric oxide-associated gene expression in the olfactory bulb of mice. *Biological Trace Element Research*, *142*(3), 683–692.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(1), 221–229.
- Kondo, Y., Fuke, C., Higa, A., & Kukita, I. (2013). [Cyanamide-ethanol reaction induced shock: report of a case and literature review]. *The Japanese journal of toxicology*, *26*(4), 295–299.
- Koob, G. F. (2014). Neurocircuitry of alcohol addiction: Synthesis from animal models. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 125). Elsevier B.V.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., & Petersen, D. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors : a Comprehensive Review of the Pharmacology , Mechanism of Action , Substrate Specificity , and Clinical Application. *Pharmacological Reviews* *64*(3), 520–539.
- Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., Hyytiä, P., & Dawe, G. S. (2015). Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. *Pharmacological Reviews*, *67*(4), 872–1004.
- Kotraiah, V., Pallares, D., Toema, D., Kong, D., & Beausoleil, E. (2013). Identification of aldehyde dehydrogenase 1A1 modulators using virtual screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* *28*, 489–494.
- Kumar, V., Tripathi, V. K., Jahan, S., Agrawal, M., Pandey, A., Khanna, V. K., & Pant, A. B. (2015). Lead Intoxication Synergies of the Ethanol-Induced Toxic Responses in Neuronal Cells--PC12. *Molecular Neurobiology*, *52*(3), 1504–1520.
- Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Gandor, C., Kurano, S., & Fiechter, A. (1990). Growth kinetics of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 3. Selection and characterization of an anchorage-independent subline and medium improvement. *Journal of Biotechnology*. *16*(3–4), 245–258.
- Lai, C. L., Li, Y. P., Liu, C. M., Hsieh, H. S., & Yin, S. J. (2013). Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by cimetidine and assessment of its effects on ethanol metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, *202*(1–3), 275–282.
- Larson, H. N., Zhou, J., Chen, Z., Stamler, J. S., & Hurley, T. D. (2007) Structural and Functional Consequences of Coenzyme Binding to the Inactive Asian Variant of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase: Roles of Residues 475 and 487.. *J Biol Chem*. *282*(17), 12940–12950.
- Lee, S. (2013). Post-Translational Modification of Proteins in Toxicological Research : Focus on Lysine Acylation. *Toxicol Res*. *29*(2), 81–86.
- Lipsky, J. J., Shen, M. L., & Naylor, S. (2001). In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chemico-Biological Interactions*, *130–132*(1–3), 93–102.
- Little, H. J. (1991). Mechanisms that may underlie the behavioural effects of ethanol. *Progress in*

- Neurobiology*, 36(3), 171–194.
- Liu, L.-K., & Tanner, J. J. (2019). Crystal Structure of Aldehyde Dehydrogenase 16 Reveals Trans-Hierarchical Structural Similarity and a New Dimer. *Journal of Molecular Biology*, 431(3), 524–541.
- Liu, L., Wang, P., Liu, X., He, D., Liang, C., & Yu, Y. (2014). Exogenous NAD⁺ supplementation protects H9c2 cardiac myoblasts against hypoxia/reoxygenation injury via Sirt1-p53 pathway. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 28(2), 180–189.
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), 13063–13068.
- Luczak, S. E., Elvine-Kreis, B., Shea, S. H., Carr, L. G., & Wall, T. L. (2002). Genetic risk for alcoholism relates to level of response to alcohol in Asian-American men and women. *Journal of Studies on Alcohol*, 63(1), 74–82.
- Ma, L., Liu, J. Y., Dong, J. X., Xiao, Q., Zhao, J., & Jiang, F. L. (2017). Toxicity of Pb²⁺ on rat liver mitochondria induced by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Toxicology Research*, 6(6), 822–830.
- Ma, X., Luo, Q., Zhu, H., Liu, X., Dong, Z., Zhang, K., Zou, Y., Wu, J., Ge, J., & Sun, A. (2018). Aldehyde dehydrogenase 2 activation ameliorates CCl₄-induced chronic liver fibrosis in mice by up-regulating Nrf2/HO-1 antioxidant pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(8), 1–6.
- Mali, V. R., Deshpande, M., Pan, G., Thandavarayan, R. A., & Palaniyandi, S. S. (2016). Impaired ALDH2 activity decreases the mitochondrial respiration in H9C2 cardiomyocytes. *Cellular Signalling*, 28(2), 1–6.
- Manzo-Avalos, S., & Saavedra-Molina, A. (2010). Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(12), 4281–4304.
- Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., & Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *MetabToxicol*, 4(6):697-720
- Marchner, H., & Tottmar, O. (1976). Inhibition of the acetaldehyde dehydrogenases in rat liver by a cyanamide derivative present in a commercial standard diet for small animals. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 39(3), 331–343.
- Martinez S.A, Simonella L. , Hansen C., Rivolta S., Cancela L.M., Virgolini M.B. (2013) Blood lead levels enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Cordoba, Argentina, after the band of leaded gasolina. *Hum Exp Toxicol* 32:449-463.
- Martins, E., Varea, A., & Hernández, K. (2016). Blood lead levels in children aged between 1 and 6 years old in La Plata, Argentina. Identification of risk factors for lead exposure. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 114(6), 543–548.
- Maruyama, W., Sango, K., Iwasa, K., & Minami, C. (2000). Isoquinolines , cause different types of cell death

- in SH-SY5Y cells: apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetrahydropapaverolines. *Neuroscience Letters* 291, 89–92.
- Mathec, A., Schirnding, Y. von, Montgomery, M., & Röllin, H. (2021). Lead Poisoning in South African Children: The Hazard is at Home. *Reviews on Environmental Health*, 19(3–4), 347–362.
- Matsuhashi, T., Karbowski, M., Liu, X., Usukura, J., Wozniak, M., & Wakabayashi, T. (1998). Complete suppression of ethanol-induced formation of megamitochondria by 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-OH-TEMPO). *Free Radical Biology & Medicine*, 24(1), 139–147.
- Mattalloni, M.S., Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2017). Developmental lead exposure induces opposite effects on ethanol intake and locomotion in response to central vs. systemic cyanamide administration. *Alcohol*, 58.
- Mattalloni, Mara S., De Giovanni, L. N., Molina, J. C., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2013). Participation of catalase in voluntary ethanol consumption in perinatally low-level lead-exposed rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.
- Mattalloni, Mara Soledad, Albrecht, P. A., Salinas-Luypaert, C., Deza-Ponzio, R., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., Cancela, L. M., Rivera-Meza, M., & Virgolini, M. B. (2019). Silencing brain catalase expression reduces ethanol intake in developmentally-lead-exposed rats. *NeuroToxicology*, 70, 180–186.
- Mattalloni, Mara Soledad, Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., Fernandez-Hubeid, L. E., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2019). Brain ethanol-metabolizing enzymes are differentially expressed in lead-exposed animals after voluntary ethanol consumption: Pharmacological approaches. *NeuroToxicology*, 75, 174–185.
- Melis, M., Enrico, P., Peana, A. T., & Diana, M. (2007). Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *European Journal of Neuroscience*. 26, 2824–2833
- Mitchell, P. (2011). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(12), 1507–1538.
- Montiel-Jaen, M. G., Monsalvo-Villegas, A., & Ávila, G. (2021). Modulating ALDH2 reveals a differential dependence on ROS for hypertrophy and SR Ca²⁺ release in aldosterone-treated cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 536, 7–13.
- Moon, K.-H., Kim, B.-J., & Song, B. J. (2005). Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *FEBS Letters*, 579(27), 6115–6120.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., & Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*, 6(12), 1541–1551.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.

- Nannelli, G., Terzuoli, E., Giorgio, V., Donnini, S., Lupetti, P., Giachetti, A., Bernardi, P., & Ziche, M. (2018). ALDH2 Activity Reduces Mitochondrial Oxygen Reserve Capacity in Endothelial Cells and Induces Senescence Properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2018):1-13
- Nation, J. R., Baker, D. M., Taylor, B., & Clark, D. E. (1986). Dietary Lead Increases Ethanol Consumption in the Rat. *Behavioral Neuroscience*, 100(4), 525–530.
- Neal, A. P., & Guilarte, T. R. (2010). Molecular neurobiology of lead (Pb(2+)): effects on synaptic function. *Molecular Neurobiology*, 42(3), 151–160.
- Ning, S., Budas, G. R., Churchill, E. N., Chen, C.-H., Knox, S. J., & Mochly-Rosen, D. (2012). Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice. *Radiation Research*, 178(1), 69–74.
- Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13856–13868.
- Obach, R., Valenti, C., Valles, J., Valles, J. M., & Domenech, J. (1986). Bioavailability of cyanamide in fasted and unfasted rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 7(3), 273–280.
- Observatorio Argentino de Drogas. Sedronar. (2018). *Estudio epidemiológico en población de educación secundaria*. https://www.argentina.gov.ar/sites/default/files/2020/11/13_media.pdf
- Ong, J. R., Bamodu, O. A., Khang, N. V., Lin, Y.-K., Yeh, C.-T., Lee, W.-H., & Cherng, Y.-G. (2021). SUMO-Activating Enzyme Subunit 1 (SAE1) Is a Promising Diagnostic Cancer Metabolism Biomarker of Hepatocellular Carcinoma. *Cells*, 10(1)
- Pang, J., Wang, J., Zhang, Y., Xu, F., & Chen, Y. (2017). Targeting acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in heart failure—Recent insights and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 1933–1941.
- Pankiewicz, K. W., Petrelli, R., Singh, R., & Felczak, K. (2015). Nicotinamide Adenine Dinucleotide Based Therapeutics, Update. *Current Medicinal Chemistry*, 22(34), 3991–4028.
- Patil, S. S., Hernández-Cuervo, H., Fukumoto, J., Narala, V. R., Saji, S., Borra, M., Alleyn, M., Lin, M., Soundararajan, R., Lockey, R., Kolliputi, N., & Galam, L. (2019). Alda-1 attenuates hyperoxia-induced mitochondrial dysfunction in lung vascular endothelial cells. *Aging*, 11(12), 3909–3918.
- Patrick, L. (2006). Lead toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*, 11(1), 2–22.
- Pautassi, R. M., Bravo, A. J., Acguas, E., & Pilatti, A. (2020). Editorial: Is Early Onset of Alcohol Use Associated With Later Alcohol Use? In *Frontiers in behavioral neuroscience* (Vol. 14, p. 133).
- Pautassi, R. M., Sanders, S., Miller, S., Spear, N., & Molina, J. C. (2006). Early ethanol's anxiolytic effects assessed through an unconditional stimulus revaluation procedure. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(3), 448–459.
- Peana, A. T., Rosas, M., Porru, S., & Acguas, E. (2016). From Ethanol to Salsolinol: Role of Ethanol Metabolites in the Effects of Ethanol. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10, 137–146.
- Perez-Miller, S. J., & Hurley, T. D. (2003). *Coenzyme Isomerization Is Integral to Catalysis in Aldehyde*

Dehydrogenase Biochemistry 42, 7100-7109

- Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C., Mochly-rosen, D., & Hurley, T. D. (2010). Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 159–164.
- Pettersson, H., & Tottmar, O. (1982). Aldehyde Dehydrogenases in Rat Brain. Subcellular Distribution and Properties. *Journal of Neurochemkfy Raven Press*. (38)477-487
- Pruñonosa, J., Obach, R., & Vallès, J. M. (1986). Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 377, 253–260.
- Quertemont, E. (2004). Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Mol Psychiatry* (9) 570-581
- Quertemont, Etienne, & Tambour, S. (2004). Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. In *Trends in Pharmacological Sciences*..25 N°3. 130-134
- Quintanilla, E., Tampier, L., Rivera-meza, M., Karahanian, E., Morales, P., Herrera-marschitz, M., & Bustamante, D. (2011). *Ethanol as a Prodrug : Brain Metabolism of Ethanol Mediates its Reinforcing Effects*. 35(4), 606–612.
- Quintanilla, M. E., Rivera-Meza, M., Berrios-Cárcamo, P. A., Bustamante, D., Buscaglia, M., Morales, P., Karahanian, E., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2014). Salsolinol, free of isosalsolinol, exerts ethanol-like motivational/sensitization effects leading to increases in ethanol intake. *Alcohol*, 48(6), 551–559
- Raskin, N. H. (1975). Editorial: Alcoholism or acetaldehydism? *The New England Journal of Medicine*, 292(8), 422–423.
- Rivera-meza, M., Vásquez, D., Elena, M., Lagos, D., Rojas, B., Herrera-marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Neuropharmacology 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.
- Riveros-Rosas, H., González-Segura, L., Julián-Sánchez, A., Díaz-Sánchez, Á. G., & Muñoz-Clares, R. A. (2013). Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*, 202(1–3), 51–61.
- Robin, M.-A., Sauvage, I., Grandperret, T., Descatoire, V., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2005). Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 579(30), 6895–6902.
- Rodd-Henricks, Z. A., Melendez, R. I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W. J., & Li, T. (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 72, 55–64.
- Rodd, Z. A., Bell, R. L., Zharag, Y., Murphy, J. M., Goldstein, A., Zaffaroni, A., Li, T. K., & McBride, W. J. (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(2), 330–338.
- Rossi, E. (2008). Low level environmental lead exposure--a continuing challenge. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 29(2), 63–70.
- Sanders, A. P., Mazzella, M. J., Malin, A. J., Hair, G. M., Busgang, S. A., Saland, J. M., & Curtin, P. (2019). Combined exposure to lead, cadmium, mercury, and arsenic and kidney health in adolescents age 12-19 in NHANES 2009-2014. *Environment International*, 131, 104993.
- Sandhir, R., & Gill, K. D. (1995). Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biological Trace Element Research*, 48(1), 91–97.
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–1783.
- Scheer, M. A., Schneider, K. J., Finnigan, R. L., Maloney, E. P., Wells, M. A., & Clemens, D. L. (2016). The Involvement of Acetaldehyde in Ethanol-Induced Cell Cycle Impairment. *Biomolecules*. (6) 1–11.
- Sheikh, S., Ni, L., Hurley, T. D., Weiner, H., Sheikh, S., Ni, L., Hurley, T. D., & Weiner, H. (1997). The Potential Roles of the Conserved Amino Acids in Human Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase The Potential Roles of the Conserved Amino Acids in Human Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem*, 272:18817-18822.
- Shen, M. L., Johnson, K. L., Mays, D. C., Lipsky, J. J., & Naylor, S. (2001). Determination of in vivo adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. 61(5), 537–545.
- Shirota, F. N., DeMaster, E. G., Kwon, C. H., & Nagasawa, H. T. (1987). Metabolism of cyanamide to cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase (ALDH) by rat liver microsomes. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement*, 1, 219–223.
- Shortall, K., Djeghader, A., Magner, E., & Soulimane, T. (2021). Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 659550.
- Sládek, N. E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 7–23.
- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews*, 89(2), 649–705.
- Spear, L. P. (2014). Adolescents and alcohol: Acute sensitivities, enhanced intake, and later consequences. *Neurotoxicology and Teratology*, 41, 51–59.
- Stagos, D., Chen, Y., Cantore, M., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2010). Corneal aldehyde dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Research Bulletin*, 81(2–3), 211–218.
- Sultani, G., Samsudeen, A. F., Osborne, B., & Turner, N. (2017). NAD+: A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(10), 1–9.
- Sun, X., Gao, R., Li, W., Zhao, Y., Yang, H., Chen, H., Jiang, H., Dong, Z., Hu, J., Liu, J., Zou, Y., Sun, A., & Ge, J. (2021). Alda-1 treatment promotes the therapeutic effect of mitochondrial transplantation for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Bioactive Materials*, 6(7), 2058–2069.

- Surkan, P. J., Zhang, A., Trachtenberg, F., Daniel, D. B., McKinlay, S., & Bellinger, D. C. (2007). Neuropsychological function in children with blood lead levels <10 µg/dL. *NeuroToxicology*, *28*(6), 1170–1177.
- Svanas, G. W., & Weiner, H. (1985). Aldehyde dehydrogenase activity as the rate-limiting factor for acetaldehyde metabolism in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *236*(1), 36–46.
- Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Ullrich, V., Mülsch, A., Schulz, E., Keaney, J. F. J., Stamler, J. S., & Münzel, T. (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, *113*(3), 482–489.
- Tabakoff, B., Anderson, R. A., & Ritzmann, R. F. (1976). Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochemical Pharmacology*, *25*(11), 1305–1309.
- Tamai, H., Yokoyama, A., Okuyama, K., Takahashi, H., Maruyama, K., Suzuki, Y., & Ishii, H. (2000). Comparison of cyanamide and disulfiram in effects on liver function. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *24*(4 Suppl), 97S-99S.
- Tambour, S., Closon, C., Tirelli, E., & Quertemont, E. (2007). Effects of cyanamide and acetaldehyde accumulation on the locomotor stimulant and sedative effects of ethanol in mice. *Behavioural Pharmacology*, *18*(8), 777–784.
- Tapia-Rojas, C., Carvajal, F. J., Mira, R. G., Arce, C., Lerma-Cabrera, J. M., Orellana, J. A., Cerpa, W., & Quintanilla, R. A. (2018). Adolescent Binge Alcohol Exposure Affects the Brain Function Through Mitochondrial Impairment. *Molecular Neurobiology*, *55*(5), 4473–4491.
- Thurman, R. G., Bradford, B. U., Iimuro, Y., Frankenberg, M. V., Knecht, K. T., Connor, H. D., Adachi, Y., Wall, C., Arteel, G. E., Raleigh, J. A., Forman, D. T., & Mason, R. P. (1999). Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *4*, e42-6.
- Tinkov, A. A., Nguyen, T. T., Santamaria, A., Bowman, A. B., Buha Djordjevic, A., Paoliello, M. M. B., Skalny, A. V., & Aschner, M. (2021). Sirtuins as molecular targets, mediators, and protective agents in metal-induced toxicity. *Archives of Toxicology*, *95*(7), 2263–2278.
- Tissue Expression of ALDH2—Summary—The Human Protein Atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111275-ALDH2>
- Toxicology, C. D. K.-C. & D. T. T. B. S. of P. 9_E (Casarett & D. (n.d.). *Toxicology The Basic Science of Poisons 9 Edition (Casarett & Doull's Toxicology)*.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84.
- Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2009). Ethanol-induced social facilitation in adolescent rats: role of endogenous activity at mu opioid receptors. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *33*(6), 991–1000
- Vasilioiu, V., Thompson, D. C., & Petersen, D. R. (2018). Aldehyde Dehydrogenases. In *Comprehensive*

- Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vols. 10–15, Issue March 2017). Elsevier.
- Vasiliou, V, Bairoch, A., Tipton, K. F., & Nebert, D. W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, 9(4), 421–434.
- Vasiliou, Vasilis, & Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics*, 2(2), 138.
- Vasiliou, Vasilis, Pappa, A., & Estey, T. (2004). Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism. *Drug Metabolism Reviews*.36(2), 279–299.
- Vasiliou, Vasilis, Thompson, D. C., Smith, C., Fujita, M., & Chen, Y. (2013). Aldehyde dehydrogenases: From eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*. 202(1–3), 2–10.
- Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Huerta-Romero, R., & Ríos, C. (2001). Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 247–251.
- Virgolini, M B, Cancela, L. M., & Fulginiti, S. (1999). Behavioral responses to ethanol in rats perinatally exposed to low lead levels. *Neurotoxicology and Teratology*, 21(5), 551–557.
- Virgolini, Miriam B., Volosin, M., Fulginiti, A. S., & Cancela, L. M. (2004). Amphetamine and stress responses in developmentally lead-exposed rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(2), 291–303.
- Virgolini, Miriam B, & Aschner, M. (2021). Molecular Mechanisms Of Lead Neurotoxicity. *Advances in Neurotoxicology*, 5, 159–213.
- Virgolini, Miriam B, Cancela, L. M., & Fulginiti, S. (1999). Behavioral Responses to Ethanol in Rats Perinatally Exposed to Low Lead Levels. *Neurotoxicology and teratology* 21(5), 551–557.
- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *The New England Journal of Medicine*, 374(4).
- Wakabayashi, Y., Tamura, Y., Kouzaki, K., Kikuchi, N., Hiranuma, K., Menuki, K., Tajima, T., Yamanaka, Y., Sakai, A., Nakayama, K. I., Kawamoto, T., Kitagawa, K., & Nakazato, K. (2020). Acetaldehyde dehydrogenase 2 deficiency increases mitochondrial reactive oxygen species emission and induces mitochondrial protease Omi/HtrA2 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 318(4), R677–R690.
- Wang, B., Wang, J., Zhou, S., Tan, S., He, X., Yang, Z., Xie, Y. C., Li, S., Zheng, C., & Ma, X. (2008). The association of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) polymorphism with susceptibility to late-onset Alzheimer’s disease in Chinese. *Journal of the Neurological Sciences*, 268(1–2), 172–175.
- Wang, X., Li, H., & Ding, S. (2014). The effects of NAD⁺ on apoptotic neuronal death and mitochondrial biogenesis and function after glutamate excitotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20449–20468.
- White, L. D., Cory-Slechta, D. A., Gilbert, M. E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N. H., Virgolini, M.,

- Rossi-George, A., Lasley, S. M., Qian, Y. C., & Basha, M. R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *225*(1), 1–27.
- Wimborne, H. J., Hu, J., Takemoto, K., Nguyen, N. T., Jaeschke, H., Lemasters, J. J., & Zhong, Z. (2020). Aldehyde dehydrogenase-2 activation decreases acetaminophen hepatotoxicity by prevention of mitochondrial depolarization. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *396*(December 2019), 1–11.
- Winterbourn, C. C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*(2), 730–738.
- Wittig, I., Carozzo, R., Santorelli, F. M., & Schägger, H. (2006). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1757*(9–10), 1066–1072.
- Xiao, C., Gu, Y., Zhou, C.-Y., Wang, L., Zhang, M.-M., & Ruan, D.-Y. (2006). Pb²⁺ impairs GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal slices: a possible involvement of presynaptic calcium channels. *Brain Research*, *1088*(1), 93–100.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 10.
- Yan, T., & Zhao, Y. (2020). Redox Biology Acetaldehyde induces phosphorylation of dynamin-related protein 1 and mitochondrial dysfunction via elevating intracellular ROS and Ca²⁺ levels. *Redox Biology*, *28*(August 2019), 101381.
- Yan, T., Zhao, Y., & Zhang, X. (2016). Acetaldehyde Induces Cytotoxicity of SH-SY5Y Cells via Inhibition of Akt Activation and Induction of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Vol. 2016.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. J., & Yoshida, M. (1998). F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell*, *93*(7), 1117–1124.
- Yoshimura, A., Kimura, M., Nakayama, H., Matsui, T., Okudaira, F., Akazawa, S., Ohkawara, M., Cho, T., Kono, Y., Hashimoto, K., Kumagai, M., Sahashi, Y., Roh, S., & Higuchi, S. (2014). Efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol dependence assessed with a multicenter randomized controlled trial. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *38*(2), 572–578.
- Yu, S. Y., Mizinga, K. M., Nonavinakere, V. K., & Soliman, K. F. A. (1996). Decreased endurance to cold water swimming and delayed sexual maturity in the rat following neonatal lead exposure. *Toxicology Letters*, *85*(3), 135–141.
- Zakhari, S., & Li, T. K. (2007). Determinants of alcohol use and abuse: impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*, *46*(6), 2032–2039.
- Zhang, M., Shoeb, M., Goswamy, J., Liu, P., Xiao, T. L., Hogan, D., Campbell, G. A., & Ansari, N. H. (2010). Overexpression of aldehyde dehydrogenase 1A1 reduces oxidation-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(3), 686–694.
- Zhang, X., Ye, Y.-L., Wang, Y.-N., Liu, F.-F., Liu, X.-X., Hu, B.-L., Zou, M., & Zhu, J.-H. (2015). Aldehyde dehydrogenase 2 genetic variations may increase susceptibility to Parkinson's disease in Han Chinese population. *Neurobiology of Aging*, *36*(9), 2660.e9–2660.e13.

- Zhao, L., Fu, K., Li, X., Zhang, R., Wang, W., Xu, F., Ji, X., Chen, Y., & Li, C. (2020). Aldehyde dehydrogenase 2 protects cardiomyocytes against lipotoxicity via the AKT/glycogen synthase kinase 3 beta pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(2), 360–365.
- Zhao, Y., & Wang, C. (2015). Glu504Lys Single Nucleotide Polymorphism of Aldehyde Dehydrogenase 2 Gene and the Risk of Human Diseases. *BioMed Research International*, 2015, 13–15.
- Zimatkin, S. M., & Buben, A. I. (2007). Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol and Alcoholism*. (6) 532-539
- Zimatkin, S. M., Liopo, A. V., Satanovskaya, V. I., Bardina, L. R., & Deitrich, R. A. (2001). Relationship of Brain Ethanol Metabolism to the Hypnotic Effect of Ethanol. II: Studies in Selectively Bred Rats and Mice *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*. 9(2)-928-988.
- 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*.(9) 1500-1515
- Zimatkin, S.M.y Lindros, K.O. (1989) A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol related behaviour. *Alcohol*. 6:4 321-325.
- Zimatkin, S.M.y Lindros, K.O. (1990). Features of the brain aldehyde oxidizing system in rats with various alcohol resistance. 3 20:222.
- Zimatkin SM.(1991) Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J Neurochem* 56:1–11.
- Zimatkin, S.M., Deitrich, R.A. (1995). Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*: 19:5 1300-1306
- Zimatkin, S.M., Deitrich, R.A. (1997). Ethanol metabolism in rat brain. *Addict. Biol.* 2, 387–399.
- Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., Deitrich, R.A.(1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 1623–1627.
- Zindel, L. R., Ph, R., Kranzler, H. R., & D, M. (2013). Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorders: Seventy-Five Years of Progress. *Journal Of Studies On Alcohol And Drugs / Supplement No.* 17 79-88

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos publicados con resultados de esta tesis:

Mattalloni M.S*.; **Deza-Ponzio, R.***; Albrecht, P.A.; Fernandez Hubeid, L.E.; Cancela, L.M.; Virgolini, M.B. "Brain ethanol-metabolizing enzymes are differentially expressed in lead-exposed animals after voluntary ethanol consumption: pharmacological approaches". *NeuroToxicology*. 75:174-185, **2019**. **igual contribución*

Artículos de revisión

Romina Deza-Ponzio*, Macarena Lorena Herrera*, María José Bellini, Miriam Beatriz Virgolini and Claudia Beatriz Hereñú. Aldehyde Dehydrogenase 2 in the spotlight: the link between mitochondria and neurodegeneration. Review. **2018**. *NeuroToxicology*, Elsevier. ISSN: 0161-813X. FI (2018): 3.263. ** igual contribución*

Miriam B. Virgolini, Mara S. Mattalloni, Paula A. Albrecht, **Romina Deza-Ponzio** and Liliana M. Cancela. Modulation of Ethanol-Metabolizing Enzymes by Developmental Lead Exposure: Effects in Voluntary Ethanol Consumption. Review. **2017**. *Frontiers Behavioral Neuroscience*. FI (2016): 3,392.

Trabajos publicados en colaboración:

Herrera, ML; **Deza-Ponzio, R**; Ghersi, M; Artur de la Villarmois, E; Virgolini, MB; Perez, MF; Molina, VA; Bellini, MJ; Hereñú, CB. Early cognitive impairment behind nigro-striatal circuit neurotoxicity: are astrocytes involved? **2020**. *ASN Neuro*. SAGE Publications Inc. (12:1-17) DOI: 10.1177/1759091420925977. ISSN: 1759-0914. ISSN: 1759-0914. FI: 4.707

Mattalloni, M.S.; Albrecht, P.A; Salinas-Luypaert, C.; **Deza-Ponzio, R.**; Quintanilla, M.E.; Herrera-Marschitz, M.; Cancela, L.M.; Rivera-Meza, M.; Virgolini, M.B. Silencing brain catalase expression reduces ethanol intake in developmentally-lead-exposed rats. **2019** *NeuroToxicology*. Elsevier. (70:180-186). ISSN: 0161-813X FI (2018): 3.263.

Bustos PS, **Deza-Ponzio R**, Páez Pl, Cabrera JI, Albesa I, Virgolini MB, Ortega MG. Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent

protective activity and microbial synergism of Luteolin. **2018** – Food and Chemical Toxicology, Elsevier. (118:294-302) ISSN: 0278-6915 FI (2018): 3.775.

Mattalloni, M.S.; **Deza-Ponzio, R**; Albrecht, P.A.; Cancela, L.M., and Virgolini, M.B. Developmental lead exposure induces opposite effects on ethanol intake and locomotion in response to central vs. systemic cyanamide administration. 2017. Alcohol Journal, Elsevier. (58:1-11). ISSN 0741-8329 FI (2015): 2.440

Bustos PS, **Deza-Ponzio R**, Páez Pl, Cabrera JI, Albesa I, Virgolini MB, Ortega MG. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity.” 2016. ETAP, Environ Toxicol Pharm, Elsevier. (48:253-264). FI (2017): 2.77

Capítulos de libro

Miriam B. Virgolini, Mara S. Mattalloni, **Romina Deza-Ponzio**, Paula A. Albrecht and Liliana M. Cancela. Lead exposure and ethanol intake: oxidative stress as a converging mechanism of action. Capítulo de libro. **2018**. Chapter 53. The Neuroscience of Alcohol: Mechanisms and Treatment. Editorial: Academic Press. Elsevier. ISBN: 9780128131268.

ABSTRACT

In the present work, we evaluated the interaction between lead (Pb), an environmental pollutant known for its neurotoxicity mainly during development, and ethanol (alcohol, EtOH), a drug of abuse widely consumed worldwide.

In the framework of the hypothesis in which the oxidative metabolism of EtOH will be altered upon exposure to both neurotoxicants, we proposed to evaluate the role of the enzyme aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), a mitochondrial oxidoreductase, in Pb and EtOH toxicity mechanisms in two different experimental models: Wistar rats and SH-SY5Y human neuroblastoma cell culture.

In the first chapter of this thesis, we were able to reproduce the experimental model in Wistar rats previously reported by our group, where rats exposed perinatally to 220ppm of Pb show higher voluntary consumption of EtOH than their control counterparts. Furthermore, using cyanamide, a pharmacological inhibitor of ALDH2, we were able to highlight the role of acetaldehyde (ACD), the first metabolite of EtOH and main substrate of ALDH2. Upon accumulation in the CNS by in situ injections of cyanamide, ACD exerts reinforcing properties and the animals (both controls and Pb) enhanced voluntary ethanol consumption, supporting the key role of ALDH2 in the neurobehavioral effects of Pb and EtOH interaction. In this regard, in brain areas involved in the reward circuit, it was demonstrated a decreased ALDH2 protein expression in the prefrontal cortex, nucleus accumbens, and dorsal striatum of animals perinatally exposed to Pb; effect boosted by cyanamide administration.

To investigate the molecular mechanisms of this interaction, an in vitro model was used. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were exposed to 10ppm Pb, 200 mM EtOH or their combination for 24h. In the first instance, we assessed ALDH2 enzymatic activity, showing potentiation of the inhibitory effect in the group exposed to Pb and EtOH, compared with both toxicants separately, and we also observed a decrease in the protein expression of ALDH2 (determined by western blot and immunofluorescence).

In a second objective, we focused on determining parameters of mitochondrial functionality in cells exposed to Pb and EtOH, showing a reduced mitochondrial mass, with a decrease in maximum respiratory and mitochondrial spare capacity, and an increase in extra-mitochondrial oxygen consumption. Moreover, we evidenced a decrease in mitochondrial membrane potential.

On the other hand, we evaluated the oxidative balance in these cells, evidencing an increase in reactive oxygen species (ROS) production. Also, Pb and EtOH exposure produced lipid peroxidation damage (assessed by T-BARS quantification) and an increase in catalase activity and protein expression, possibly as a compensatory mechanism against the increase in ROS.

Interestingly, using an ALDH2 activator, Alda-1, we were able to reverse the increase in ROS and the decrease in mitochondrial membrane potential. Alda-1 was able to activate ALDH2 (up to 20 times) in the group exposed to Pb and EtOH compared to control, which reveals the antioxidant and neuroprotective role of this enzyme and the potential of activators such as Alda-1 as therapeutic approaches against several pathologies.

The work included in this thesis provides new insights about the interaction between Pb and EtOH, being ALDH2 inhibition, mitochondrial damage, and oxidative stress a common mechanism. Also, data support the idea that early exposure to an environmental contaminant, even at low doses, predisposes at a later age to differential reactivity to challenging events, increasing, in this case, vulnerability to acquiring addictive behaviors, including excessive EtOH intake.