



**Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**La sobrecarga hepática de colesterol agrava el
daño inducido por la colestasis obstructiva
mediante la inducción de estrés oxidante**

T E S I S

para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Natalia Nuño Lámbarri

Comité tutorial

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. José Carlos Fernández-Checa

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Octubre del 2016

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa en la ciudad de México, México y en el laboratorio de muerte y proliferación celular del Centro Esther Koplowitz en Barcelona, España, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz y el Dr. José Carlos Fernández Checa. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, por medio de los proyectos con clave 166042 e INFR-2013-01-205941, así como PRODEP 913026-14612111).

Proyectos SAF-2011-23031, SAF-2012-34831 del Plan Nacional de I+D, España, Fundació Marató de TV3, La Mutua Madrileña, PI11/0325 (META), apoyo de el Instituto Salud Carlos III, y the support of CIBEREHD; the center grant P50-AA-11999 Research Center for Liver and Pancretic Diseases funded by NIAAA/NIH.

Durante el transcurso del doctorado en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí la beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 234219/288846, en el período 2011-2015, organismo al que agradezco su apoyo.

Los miembros del jurado, designados por Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“La sobrecarga hepática de colesterol agrava el daño inducido por la colestasis obstructiva mediante la inducción de estrés oxidante”**, que presenta con fecha de examen 17 de Octubre de 2016.

MIEMBROS DEL JURADO



PRESIDENTE

Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz
Universidad Autónoma Metropolitana



VOCAL

Varenka Barbero Becerra
Fundación Médica Sur



SECRETARIO

Norberto Chavez Tapia
Fundación Médica Sur



VOCAL

Juan Carlos Pérez Monter
Instituto Nacional de Nutrición

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Ciudad de México, México
legq@xanum.uam.mx

DIRECTOR

Dr. José Carlos Fernández Checa
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Centro Esther Koplowitz.
Barcelona, España
checa229@yahoo.com

ASESORA

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.
Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Ciudad de México, México
mcgr@xanum.uam.mx

El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatídico.
Lo que cuenta es el valor para continuar.

Winston Churchill

AGRADECIMIENTOS

Soy sumamente dichosa de poder contar esta historia, basada en dedicación, aprendizaje y variadas satisfacciones.

Agradezco a todos los que de alguna manera me brindaron su apoyo, compañía, ánimo y alegría, permitiéndome seguir adelante con este proyecto.

Luis, gracias por compartir conmigo tu ímpetu por la ciencia y la manera tan apasionante que tienes de transmitirla, forjando en mi gran parte de la persona que hoy soy.

Conchita, gracias por enseñarme el valor de la disciplina y tenacidad, por ser más que mi profesora un apoyo en todo momento.

Carlos y Carmen, por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme aprender que el trabajo arduo trae grandes recompensas.

A mi familia, que no importando que suceda siempre me brindan su ayuda de la manera más desinteresada, siendo el pilar de mi vida.

Victor, porque cuando apareciste en mi vida todo se volvió más sencillo, encontrando en ti un lugar donde practicar la felicidad.

A mis amigas catalanas, Anna, Nunu, Raquel, Mati y Su, que son la familia que uno elige, gracias por tantas alegrías y por siempre estar presentes en mi vida aún estando tan lejos.

A todos los del laboratorio, por enseñarme el valor del compañerismo y trabajo en equipo, en especial a Mayra y Cristina que más que un apoyo, me brindaron su gran amistad.

Gracias infinitas

RESUMEN

La esteatohepatitis no alcohólica es una de las principales causas de enfermedad hepática. Los factores dietéticos determinan la presentación clínica de la esteatohepatitis y pueden influir en la progresión de enfermedades relacionadas. El colesterol se ha convertido en un factor crítico en esta enfermedad y por lo tanto el consumo de una dieta enriquecida en colesterol puede conducir a su progresión. El objetivo fue investigar el impacto de la sobrecarga hepática de colesterol en la progresión de la colestasis obstructiva en ratones sometidos a cirugía de ligadura del conducto biliar. Los ratones fueron alimentados con una dieta alta en colesterol durante dos días y luego se sometieron a un procedimiento de cirugía; se llevaron a cabo análisis histológicos, bioquímicos, y moleculares para abordar el efecto del colesterol en el daño hepático. Los ratones bajo la dieta fueron más susceptibles al daño. Los resultados revelan que los ratones alimentados con colesterol muestran aumento en la apoptosis y el estrés oxidante, así como una reducción en la proliferación celular. La mortalidad después de la cirugía fue mayor en los ratones alimentados con la dieta HC. El colesterol hepático afecta la reparación de hígado durante la colestasis obstructiva y agrava la enfermedad con consecuencias fatales tempranas; asociando estos efectos fuertemente con el estrés oxidante.

ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis is one of the leading causes of liver disease. Dietary factors determine the clinical presentation of steatohepatitis and can influence the progression of related diseases. Cholesterol has emerged as a critical player in the disease and hence consumption of cholesterol-enriched diets can lead to a progressive form of the disease. The aim was to investigate the impact of liver cholesterol overload on the progression of the obstructive cholestasis in mice subjected to bile duct ligation surgery. Mice were fed with a high cholesterol diet for two days and then were subjected to surgery procedure; histological, biochemical, and molecular analyses were conducted to address the effect of cholesterol in liver damage. Mice under the diet were more susceptible to damage. Results show that cholesterol fed mice exhibited increased apoptosis and oxidative stress as well as reduction in cell proliferation. Mortality following surgery was higher in HC fed mice. Liver cholesterol impairs the repair of liver during obstructive cholestasis and aggravates the disease with early fatal consequences; these effects were strongly associated with oxidative stress.

ÍNDICE

I. Introducción.....	2
II. Justificación.....	7
III. Hipótesis.....	9
IV. Objetivo general.....	9
V. Objetivos particulares.....	9
VI. Material y métodos.....	10
1. Modelos animales.....	11
2. Dieta generadora de esteatosis.....	11
3. Ligadura del conducto biliar (BDL).....	11
4. Estudios bioquímicos en suero.....	13
4.1. Colesterol total.....	13
4.2. Alanino aminotransaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP).....	13
4.3. Ácidos biliares totales (TBA).....	13
4.4. Bilirrubina.....	14
4.4.1. Determinación de la bilirrubina total.....	15
4.4.2. Determinación de la bilirrubina directa.....	15
5. Histología.....	15
5.1. Recolección de tejidos y su conservación.....	15
5.2. Análisis histológico e inmunohistoquímica.....	17
5.2.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E).....	17
5.2.2 Lípidos neutros con la tinción de aceite rojo O.....	18

5.2.3. Determinación de colesterol libre por filipina.....	19
5.2.4. Inmunohistoquímica.....	20
5.2.5. Determinación de ROS in situ.....	23
5.2.6. Determinación de apoptosis por TUNEL.....	24
6. Determinación de colesterol.....	26
7. Determinación de triglicéridos.....	27
8. Cuantificación de GSH.....	28
9. Análisis del contenido de proteínas.....	31
9.1. Homogenado y lisis.....	31
9.2. Cuantificación de la proteína.....	32
9.3. Preparación de las muestras para la electroforesis.....	33
9.4. Western Blot.....	33
9.5. Inmunodetección.....	35
9.6 Revelado y Captura de imágenes.....	37
10. Actividad de Caspasa 3.....	37
11. EMSA quimioluminiscente.....	39
12. Análisis de ácidos biliares.....	43
13. Análisis estadístico.....	43
VII. Resultados.....	44
1. La dieta alta en colesterol induce esteatosis hepática.....	45
2. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño inducido por la BDL e induce una muerte temprana en ratones.....	47

3. La BDL induce apoptosis y estrés oxidante en ratones alimentados con la dieta HC.....	63
4. La BDL en los ratones alimentados con la dieta HC exagera el estrés oxidante..	66
VIII. Discusión.....	71
IX. Conclusión.....	78
X. Referencias.....	80

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la obesidad es un problema mundial afectando tanto a países pobres como a ricos. Aproximadamente 500 millones de adultos en el mundo son obesos y 1.5 billones tienen sobrepeso (1). La obesidad es la principal causa de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) que se caracteriza por el depósito de grasa (ácidos grasos, triglicéridos y colesterol) en más de 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol. Se caracteriza por un amplio espectro de lesiones histopatológicas en el hígado, que van desde la esteatosis simple, en su forma más benigna, hasta la esteatohepatitis (NASH) con estadios variables de fibrosis que puede progresar hasta cirrosis e incluso hepatocarcinoma (2, 3).

La esteatosis ha incrementado su prevalencia en los últimos tiempos debido al cambio en el estilo de vida, en el que ha disminuido la actividad física y ha aumentado el aporte calórico de la dieta, principalmente alta en lípidos, por lo que es considerada la epidemia del siglo XXI. Actualmente en México, las enfermedades hepáticas agudas y crónicas, representan una de las principales causas de mortalidad, reportándose como la quinta causa de defunción en base a datos de la Secretaría de Salud y del INEGI en 2010 (4).

En diversos estudios murinos se muestra como dietas enriquecidas con colesterol incrementan los niveles de TG y colesterol hepático, induciendo daño celular y tisular (5) (6). En el 2006 el grupo del Dr. Fernández-Checa demostró que el tipo de lípido más que la cantidad del mismo determina la susceptibilidad del hígado graso para progresar a NASH, siendo el colesterol libre y no los FFA o los TG. Su acumulación afecta principalmente a la mitocondria sensibilizando a los hepatocitos a

una segunda agresión como el estrés oxidante mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando de muerte Fas.

A pesar de estos conocimientos, el papel de la acumulación hepática de colesterol en la colestasis no se ha estudiado completamente, por esto es importante averiguar la relevancia de la sobrecarga de colesterol hepático en la iniciación y progresión de las principales enfermedades que afectan al órgano, sobre todo aquellas en las que el colesterol puede desempeñar un papel importante, como la colestasis, una de las enfermedades gastrointestinales más frecuente en todo el mundo, caracterizada por una alteración en el flujo de bilis, lo que conduce a una lesión hepática y en casos graves, insuficiencia del órgano (11).

La colestasis se define como el deterioro agudo o crónico del flujo biliar normal desde el hígado al duodeno. La formación de bilis en los hepatocitos se basa en el transporte osmótico y activo de ácidos biliares en el lumen canalicular, seguido por el movimiento pasivo de agua a través de las uniones estrechas. Varios sistemas de transporte sinusoidal y canalicular están involucrados en la formación de bilis hepatocelular. Por lo tanto, los ácidos biliares se toman a partir del sinusoide en contra del gradiente de concentración, por ejemplo por el polipéptido de cotransporte de taurocolato de sodio, cuya energía se deriva de la ATPasa de sodio/potasio. Proteínas de unión intracelulares coordinan el transporte transcelular y el control del tráfico de elementos del citoesqueleto a la membrana canalicular (16).

La acumulación de ácidos biliares, como consecuencia de la enfermedad, ejercen eventos nocivos en las células que van desde el estrés oxidante, la

inflamación a la apoptosis y la necrosis (12, 13), lo que lleva a la toxicidad hepática aguda, la proliferación de los conductos biliares, y fibrosis que eventualmente progresa a cirrosis e insuficiencia del órgano, condicionado a una disfunción y falla hepática (11); por otra parte se ha reportado que la homeostasis de los ácidos biliares está alterada en los pacientes con hígado graso no alcohólico (15,14), lo que sugiere un posible factor de gravedad en la clínica.

Se ha utilizado la ligadura del conducto biliar (BDL, por sus siglas en ingles, bile duct ligation) en ratones ya que es un modelo bien establecido para tratar la enfermedad obstructiva colestásica representando la mayoría de las complicaciones observadas en los seres humanos, tales como la inflamación, la colestasis, fibrosis e incluso la tumorigénesis, comprometiendo a los hepatocitos y a los colangiocitos (17). Aunque las enfermedades obstructivas frecuentemente pueden resolverse por medio de cirugía, un hígado esteatósico pueden complicar el procedimiento.

La constante exposición de las mitocondrias a los ácidos biliares genera la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), sin embargo el orgánulo permanece funcional gracias a la existencia de un sistema de defensa antioxidante. Cuando el equilibrio entre la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y la producción de defensa antioxidante se rompe, se produce lo que se llama estrés oxidante. A pesar de la constante generación de radicales libres y ERO la evolución ha permitido que los organismos aeróbicos se hayan adaptado a la presencia de estas especies tóxicas y que puedan sobrevivir en ambientes ricos en

oxígeno. Esto requiere un efectivo sistema de defensa contra estas especies. La eliminación de las ERO está asegurada por las enzimas antioxidantes, principalmente superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), glutaredoxinas (Grx), tioredoxinas (Trx), las peroxiredoxinas (Prx), y sulfiredoxinas, GSH peroxidasa (GPx) y la hemoxigenasa (HO), así como los antioxidantes no enzimáticos como la vitamina A, C y E, glutatión (GSH), urato, bilirrubina, ácido lipóico, melatonina, etc.

La disminución de la defensa antioxidante puede generar apoptosis, también conocida como muerte programada, en la cual hay inducción de caspasas, que son las ejecutoras finales de la muerte celular. Se distinguen dos tipos de caspasas; las caspasas iniciadoras (p.ej. caspasa-2, -8, -9 y -10) y las caspasas efectoras (p.ej. caspasa-3, -6 y -7). Las caspasas iniciadoras comienzan la cascada apoptótica y permiten la activación de las caspasas efectoras (18-20).

En esta tesis se ha abordado el impacto que tiene la sobrecarga de colesterol hepático en la colestasis obstructiva, mostrando que la acumulación de colesterol proveniente de la dieta o por modificaciones genéticas, sensibiliza al hígado llevando a la muerte de los ratones.

JUSTIFICACIÓN

Con base a lo anterior, es importante averiguar la relevancia de la sobrecarga de colesterol hepático en la iniciación y progresión de las principales enfermedades que afectan al hígado, sobre todo aquellas en las que el colesterol puede desempeñar un papel importante, como la colestasis, la cual es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuente en el mundo (11). La acumulación de ácidos biliares, como consecuencia de la enfermedad, anuncia eventos celulares nocivos que van desde el estrés oxidante, a la inflamación, apoptosis y necrosis (12, 13), lo que lleva a la toxicidad hepática aguda, la proliferación de los conductos biliares, y fibrosis que eventualmente progresa a cirrosis, condicionado a una disfunción y falla hepática, aún más se ha reportado que la homeostasis de los ácidos biliares está alterada en los pacientes con hígado graso no alcohólico (15), lo que sugiere un posible factor de gravedad en la clínica. Regularmente el consumo de dietas enriquecidas en colesterol podría agravar la NAFLD, particularmente en individuos susceptibles relacionados a riesgo congénito o hábitos dietéticos deficientes (21, 22). En personas hispanas es frecuente el consumo de alimentos altos en colesterol y esto podría explicar la alta prevalencia de hígado graso no alcohólico en esta población (23).

HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

HIPOTESIS

La sobrecarga de colesterol hepático promoverá mayor daño hepatocelular, agravando el daño colestásico generado por la ligadura del ducto biliar.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la sobrecarga de colesterol hepático en el daño colestásico causado a ratones con ligadura del ducto biliar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el daño hepático inducido por la ingesta de la dieta HC por 2 días en los hígados de ratones C57BL/6J .
- Determinar la sobrevivida en ratones sometidos a la dieta HC
- Determinar el estado redox en tejido hepático de ratones alimentados con la dieta HC y sometidos a la ligadura de ducto biliar.
- Determinar la composición de sales biliares en animales sometidos a la dieta HC y a la ligadura del ducto biliar
- Caracteriza el efecto de la ligadura de ducto biliar en ratones transgénicos para SREBP2 (Tg-SREBP-2)

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos animales

Todos los estudios se realizaron en ratones machos para evitar las fluctuaciones hormonales del ciclo estral femenino. Los ratones C57Bl/6 y Tg-SREBP-2 (B6; SJLTg (rPEPCKSREBF2) 788Reh / J) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos con temperatura y humedad controlada en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, con acceso libre al agua y la dieta durante todo el estudio en las instalaciones de cuidado de animales de la Universidad Autónoma Metropolitana y la Escuela de Medicina de la Universitat de Barcelona.

2. Dieta generadora de esteatosis

Se usó una dieta hipercolesterolémica (HC), suplementada con 2% de colesterol purificado y 0.5% colato de sodio (Dyets Inc.). Los animales control fueron alimentados con una dieta regular Chow.

3. Ligadura del conducto biliar (BDL)

La ligadura del conducto biliar es un modelo estándar para la investigación de colestasis. Los ácidos biliares, que se sintetizan a partir del colesterol en el hígado, se encuentran principalmente en un sistema cerrado, la circulación enterohepática. Cuando se obstruye el conducto biliar, los ácidos biliares entran en la sangre sistémica y el metabolismo de los ácidos biliares es en gran medida perturbado.

Todas las cirugías fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad.

- El ratón se colocó en una colchoneta de espuma de poliestireno para la inducción de la anestesia a través de una boquilla adecuada con 2% de isoflurano (Abbott Laboratories # B506) y 2 litros de flujo de oxígeno/min para un ratón de 25 g de peso corporal.
- La piel fue desinfectada con etanol al 70%.
- Se realizó una incisión de la piel y el músculo en la línea media abdominal (alrededor de 3 cm de largo) para exponer el conducto biliar.
- Se insertaron dos agujas en la colchoneta de poliestireno a nivel del extremo inferior de la incisión abdominal en ambos lados del animal, utilizándose dos clips (como retractores) para mantener abierta la cavidad peritoneal, exponiendo así el conducto biliar.
- El conducto biliar común se ligó cerca del hilio hepático, por debajo de la bifurcación, con seda quirúrgica 4-0 (Ethicon) para que no hubiera flujo de bilis. Dejando la vesícula biliar intacta.
- El músculo abdominal se suturó con seda quirúrgica 5-0 y la piel se cerró con grapas quirúrgicas.
- Después de cerrar el área abdominal, la piel circundante a la sutura se limpió con betadina.
- Los controles se sometieron a una cirugía simulada, realizada de manera similar pero sin ligar el conducto biliar.
- A todos los animales se les permitió recuperarse en una manta térmica.

4. Estudios bioquímicos en suero

En el momento del sacrificio, los ratones se narcotizaron con una dosis letal de 100 mg/kg de pentobarbital sódico. La sangre se colectó de la vena cava superior con puntas de pipeta heparinizadas con el fin de evitar la hemólisis. La sangre se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm a 4°C y el suero se recogió de la fase superior evitando la contaminación con la fase inferior.

4.1. Colesterol total:

Los niveles de colesterol total en suero se midieron por métodos automatizados usando tiras reactivas Reflovet Plus (Roche, Mannheim, Alemania).

4.2. Alanino aminotransaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP):

La ALT y la AST se encuentran en el suero, ambas se miden clínicamente para determinar la salud del hígado. Su presencia incrementada en el suero indica daño hepatocelular, mientras que el aumento de los niveles de ALP en suero se deben a enfermedades del tracto biliar, permitiendo junto con la AST y la ALT el reconocimiento de estados colestásicos. Los niveles de ALT, AST y ALP en suero se determinaron por el método automatizado Reflovet Plus (Roche).

4.3. Ácidos biliares totales (TBA):

Los ácidos biliares totales se metabolizan en el hígado y por lo tanto, sirven como un marcador para la función hepática normal y anormal, incrementándose en enfermedades hepáticas. El principio del ensayo es que en la presencia de Tio-NAD, la enzima deshidrogenasa 3- α -hidroxiesteroide (3- α -HSD) convierte los ácidos

biliares a esteroides 3-ceto y ThioNADH. En presencia de un exceso de NADH, la ciclación de la enzima se produce de manera eficiente y la formación de Tio-NADH se determina midiendo el cambio específico de la absorbancia a 405 nm.

Reactivos:

Reactivo	Composición
R1	Buffer de Thio-NAD >0.1mM
R2	Buffer de 3- α -HSD >2kU/L, NADH >0.1mM
Calibrador	Buffer de ácidos cólicos conjugados

Tabla. 1 Reactivos de ácidos biliares totales

- Pipetear 270 μ L de R1 en una cubeta, a la que se añade 4 μ L de muestra.
- Incubar a 37°C durante 3 minutos y blanquear la absorbancia a 405nm.
- Pipetear 90 μ L de R2 en la cubeta.
- Mezclar e inmediatamente leer la absorbancia a 405nm durante 2 minutos.

4.4. Bilirrubina:

Las bilirrubinas se midieron empleando el estuche comercial (Dya Sys, Diagnostic Systems). El principio de la determinación es que la bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado para formar un colorante azoico que es de color rojo cuando hay un ambiente neutro y azul en soluciones alcalinas. Mientras que los glucurónidos de bilirrubina solubles reaccionan "directamente", la bilirrubina libre "indirecta" reacciona sólo en presencia de un acelerador.

Reactivos:

Reactivo	Compuesto	Concentración
R1	Ácido Sulfanílico	29mmol/L

	HCL	170mmol/L
R2	Nitrito de Sodio	29mmol/L
R3	Cafeína	130mmol/L
	Benzoato de Sodio	156mmol/L
	Acetato de Sodio	460mmol/L
R4	Solución II de Fehling's	
	Tartrato de Potasio de Sodio	930mmol/L
	Hidróxido de Sodio	1.9mol/L

Tabla. 2 Reactivos y concentraciones utilizados para medir bilirrubina.

4.4.1. Determinación de la bilirrubina total:

- Poner 50µL de R2, 200µL de R1, 1000µL de R3 y 200µL de la muestra.
- Mezclar y dejar reposar de 10 a 60 minutos a 15 - 25°C.
- Añadir 1000µL de R4.
- Mezclar bien y después de 5 a 30 minutos medir la absorbancia de la muestra frente al blanco.

4.4.2. Determinación de la bilirrubina directa:

- Poner 50µL de R2, 200µL de R1, 2000µL de solución de NaCl y 200µL de la muestra.
- Mezclar inmediatamente y dejar reposar a 15 - 25°C.
- Exactamente 5 minutos después de la adición de suero medir la absorbancia frente al blanco.

5. Histología

5.1. Recolección de tejidos y su conservación:

Los tejidos fueron recolectados rápidamente después de la extracción de

sangre:

- Se congelaron en hielo seco para secciones congeladas o en un criomolde con un gel de corte óptimo de temperatura (OCT, Tissue-Tech #4583).
- Adicionalmente parte del tejido se fijó en formalina (10% paraformaldehído) (Sigma, HT501128) durante 48 horas y se incluyeron en parafina para las secciones de micrótopo. Los tejidos congelados se cortaron con un criostato (Microm, HM550) a 7µm, a una temperatura aproximada de -20°C. Las secciones se colocaron en portaobjetos superfrost (Fisher 12-550-15). Los tejidos fijados con formalina se incluyeron en parafina en un inclusor de parafina automatizado (Citadel 1000, Shandon) siguiendo el siguiente protocolo:
 - 1 hora en H₂O dos veces.
 - 1 hora en etanol al 70% dos veces.
 - 1 hora en etanol al 90% dos veces.
 - 1 hora en etanol al 100% dos veces.
 - 1 hora en xilol dos veces.
 - 2 horas en parafina dos veces.
- Una vez los tejidos están inmersos en parafina, se hacen los bloques de parafina para mejorar el proceso de corte en el micrótopo (Leica, RM2155). Las secciones de 7µm se utilizaron para la tinción de hematoxilina y eosina y cortes de 5µm se usaron para inmunohistoquímica. Las secciones se colocaron en portaobjetos tratados con HistoGrip.

5.2. Análisis histológico e inmunohistoquímica

5.2.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E):

La tinción de H&E es la más utilizada en la histología. Tiene la capacidad de demostrar una amplia gama de componentes normales y anormales de las células y tejidos, es una tinción relativamente simple de llevar a cabo en secciones de parafina o congeladas. La hematoxilina tiene un pH básico por lo cual tiene afinidad a estructuras ácidas tales como los núcleos, denominados como estructuras basófilas. La eosina actúa como un ácido tiñendo estructuras básicas, que se denominan como estructuras acidófilas.

Protocolo:

- Derretir la parafina en una estufa a 100°C.
- Lavar la parafina 10 minutos en xilol.
- Hidratación de las muestras: Rehidratar las muestras con una serie de etanol diluido (100%- 90%- 70%- 30%) hasta agua destilada. Las secciones hidratadas permitirán que los reactivos acuosos penetren al tejido.
- Tinción de hematoxilina: 4 minutos de solución de hematoxilina de Harris (Sigma, HHS32). Los núcleos y las estructuras ácidas aparecerán teñidas de color rojizo-púrpura.
- Lavar la hematoxilina extra con abundante agua.
- Diferenciación: elimina la tinción de fondo de la hematoxilina y mejora el contraste. Enjuagar con alcohol-HCl 96% (480 mL alcohol absoluto + 20 ml de HCl 12N) hasta que aparezca una mancha rojiza.

- Enjuagar con agua amoniacal (agua destilada con 3-4 gotas de solución amoniacal 25%) hasta que la coloración se vuelve azul de nuevo.
- Lavar con agua por 2 minutos.
- Tinción de eosina: enjuagar las secciones en eosina alcohólica (Sigma, HT110132) durante 90 segundos. Este paso teñirá muchos elementos no nucleares en diferentes tonos de rosa.
- Deshidratación de la muestra: lavar las muestras en alcohol para eliminar todo rastro de agua (70% - 90% - 100% de alcohol).
- La tinción de eosina se lava con agua por lo tanto mientras más se mantengan las muestras en etanol al 70% menos eosina permanecerá.
- Lavar en xilol por 5 minutos.
- Montaje de los cortes: utilizar el medio de montaje DPX para histología (Fluka, 44581). Añadir una pequeña gota de DPX a la muestra. Con cuidado, colocar un cubreobjetos sobre la gota, evitando las burbujas de aire. Elimine cualquier exceso de montaje con una toalla de papel
- Las muestras se pueden observar con un microscopio de transmisión de luz.

5.2.2. Determinación de lípidos neutros con la tinción de aceite rojo O:

El aceite rojo O es un colorante soluble en grasa que se utiliza para la tinción de lípidos neutros como los TGs. Tiene la apariencia de un polvo de color rojo con máximo de absorción a 518nm. Esta tinción se realizó en secciones congeladas de hígado para determinar macroesteatosis hepática.

- Solución Stock de aceite rojo O: 0.5 g de aceite rojo O (Sigma, O0625) en 100 ml

de isopropanol. Agitar la solución durante la noche en un recipiente tapado para evitar la evaporación del isopropanol.

- Solución de Trabajo de aceite rojo O: 60 ml de la solución stock con 40 ml de agua destilada. Agitar y dejar reposar durante varios días hasta que el aceite rojo O se haya disuelto completamente. Siempre filtrarlo en papel antes de usarlo.

Protocolo:

- Enjuague con agua destilada 5 minutos, tres veces.
- Introducir en isopropanol al 60% por 10 segundos.
- Sumergir en la solución de trabajo de aceite rojo O 30 minutos.
- Retire el exceso de aceite rojo con un enjuague de isopropanol al 60% por 5 minutos, dos veces.
- Lavar con agua destilada 5 minutos, 4 veces.
- Contrateñir con hematoxilina 5 minutos.
- Lavar con agua destilada 5 minutos, 3 veces.
- Montaje: usar un medio de montaje acuoso (Aquatex, Merck, # 108562) con cuidado, colocar un cubreobjetos sobre medio de montaje, evitando burbujas de aire.
- Dejar secar las muestras.
- Las muestras pueden ser observadas con microscopía de luz transmitida.

5.2.3. Determinación de colesterol libre por filipina:

La filipina se aisló en el año 1955 a partir de un actinomicete, *Streptomyces filipinensis*, que fue descubierto en una muestra de suelo recogida en las Islas Filipinas, de ahí el nombre de Filipina. La filipina ha sido ampliamente utilizada como

una sonda para la ubicación de esteroides en las membranas biológicas. Su interacción con el colesterol altera el espectro de absorción y fluorescencia de la filipina permitiendo su visualización con un microscopio de fluorescencia con una capacidad de excitación a 340-380nm y emisión a 385-470nm. Es una herramienta para la identificación histoquímica de colesterol no esterificado tanto in vivo como in vitro.

Protocolo:

- Lavar las secciones con PBS 2 veces durante 5 minutos, en un recipiente de 50 ml.
- Fijar las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con formalina al 10%.
- Lavar con PBS 3 veces durante 5 minutos.
- Tinción con filipina: preparar 50 ml de PBS con 0.2 mg/ml de filipina (Sigma, F-9765) incubar durante la toda la noche a 4 ° C protegido de la luz. (Para una solución de 50 ml, pesar 10 mg de filipina y disolverla en 200µL de DMSO. Una vez disuelto, añadirlo a los 50 ml de PBS).
- Lavar con PBS 3 veces durante 5 minutos.
- Montar con abundante medio fluorescente (Dako # S3023) deslizando el cubreobjetos. Dejar secar durante unas horas protegido de la luz.
- Ver al microscopio utilizando la luz UV para visualizar la tinción.

5.2.4. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se refiere al proceso de detección de antígenos (por

ejemplo, proteínas) en las células de una sección de tejido mediante la explotación del principio de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos en los tejidos biológicos. En los estudios realizados en esta tesis se tiñeron con este método contra ki67. La tinción se realizó en secciones de hígado parafinado utilizando el kit Bio SB (BSB0218).

La proteína Ki-67 (también conocido como MKI67) es un marcador celular para la proliferación. Está estrictamente asociada con la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. La proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G0).

Reactivos: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente (RT) antes de usarlos. Todas las incubaciones estarán en RT también.

- Buffer de lavado: PBS (20 mM NaH_2PO_4 ; NaCl 150 mM, pH 7,0) Mantener a 4°C.

- Buffer de citrato: citrato de sodio 2%, pH 6,0.

- Buffer para diluir el anticuerpo primario: 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2 a 7.6 y 1% de BSA (diluyente de anticuerpo Dako, S0809).

Protocolo:

- Desparafinar y rehidratar las secciones de tejido.
- Desenmascarado del antígeno: este tratamiento deshará las uniones hechas

por la acción de formalina durante la fijación.

- Colocar los portaobjetos en un recipiente que tolere altas temperaturas.
 - Cubrir los portaobjetos con el buffer de citrato.
 - Calentar 15 minutos a 120°C.
 - Dejar que se enfríe durante 20 minutos
-
- Bloqueo de la peroxidasa endógena: La actividad de la peroxidasa endógena es cualquier actividad que resulta en la degradación de H₂O₂. Esta actividad es una propiedad de las catalasas en el hígado. Dado que este protocolo tiene un método de detección basado en la peroxidasa de rábano (HRP), es necesario bloquear la actividad peroxidasa endógena para reducir la tinción de fondo.
 - Aplicar una solución de bloqueo de la peroxidasa en la parte superior de las secciones de hígado durante 10 minutos.
 - Lavar 5 minutos con PBS tres veces.
-
- Incubación del anticuerpo primario: diluir el anticuerpo primario en el buffer de dilución.
 - Aplicar 50µL de anticuerpo para cada muestra.
 - Incubar 30-50 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
 - Lavar 5 minutos en PBS tres veces.
-
- Polímero marcador de peroxidasa:

- Eliminar el exceso de PBS y limpiar las laminillas.
- Aplicar suficiente polímero para cubrir la muestra.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente una cámara húmeda.
- Lavar 5 minutos en PBS tres veces.
- El sustrato cromógeno:
 - Eliminar el exceso de PBS y limpiar las laminillas.
 - Aplicar suficiente cromógeno.
 - Incubar durante 10 minutos hasta que se revele.
 - Enjuagar suavemente con agua destilada.
 - Recoger los residuos del sustrato-cromógeno en un contenedor de materiales peligrosos para su eliminación adecuada.
- Contra tinción con hematoxilina:
 - Aplicar unas gotas de hematoxilina en exceso en la parte superior de las muestras con una pipeta Pasteur de plástico.
 - Incubar 30 segundos a 2 minutos a temperatura ambiente.
 - Enjuagar suavemente con agua destilada.
- Montaje:
 - Montar y cubrir con cubreobjetos en medio de montaje Aquatex (Millipore) de base acuosa.

5.2.5. Determinación de ROS in situ.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son una serie de moléculas reactivas y radicales libres derivados del oxígeno molecular. Las ROS se determinaron por diclorofluoresceína (DCFH) una sonda no fluorescente permeable

en células, que se desesterifica intracelularmente y se convierte a la altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína por oxidación de ROS, en particular los peróxidos (H_2O_2); y con dihidroetidio (DHE), para la determinación del anión superóxido radical (O^2) mediante la detección de fluorescencia del etidio.

- Las secciones de hígado fueron cortadas en un criostato, a 8 micras de grosor y se incubaron inmediatamente durante 15 minutos en la oscuridad, a temperatura ambiente, ya sea con DCFH (5 μ M), o con DHE, (50 μ M).
- Las muestras se observaron utilizando un microscopio confocal (Carl Zeiss, LSM 780 multifotónico, Jena, Alemania) a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 520nm para DCFH y longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 570nm para DHE respectivamente.

5.2.6. Determinación de apoptosis por TUNEL

Si existen células que ya no se necesitan, estas se suicidan, a lo cual se llama apoptosis, también conocida como muerte celular programada, llevando a la fragmentación del ADN, la contracción del citoplasma, cambios de la membrana y la muerte celular sin lisis o daños a las células vecinas. La tinción de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, por sus siglas en inglés) se realizó en secciones de hígado parafinado utilizando el estuche comercial de Trevigen (4810-30-K).

Protocolo:

- Se desparafinan las secciones con 2 cambios de xileno durante 5 minutos cada uno, y se hidratan con 2 cambios de EtOH al 100% durante 3 minutos

cada uno, después con EtOH al 95% durante 1 minuto.

- Lavar 2 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno.
- Usar 50µL de proteinasa K para cada muestra e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuagar las secciones con 2 cambios de agua desionizada, 2 minutos cada uno.
- Sumergir los portaobjetos en la solución de enfriamiento rápido durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuagar en PBS 1X durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Sumergir las laminillas en el buffer TdT 1X durante 5 minutos.
- Cubrir las muestras con 50µL de la mezcla de reacción de marcaje e incubar a 37°C durante una hora en una cámara húmeda.
- Sumergir las muestras en buffer de paro TDT 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción de marcaje.
- Lavar las muestras 2 veces en agua desionizada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Cubrir las muestras con 50µL de la solución Strep-HRP e incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Lavar las muestras 2 veces en PBS 1X durante 2 minutos cada uno.
- Sumergir las muestras en varios cambios de agua desionizada durante 2 minutos.
- Procesar para la contratinción y cubrir con medio de montaje basado xileno.

6. Determinación de colesterol

Para determinar el colesterol total en homogenados de hígado de ratón, se utilizó el reactivo O-phthaldehido (OPA).

Protocolo:

- Estándares de colesterol: preparar 1mg solución stock/ml de colesterol (Sigma Aldrich) en isopropanol. Preparar 7 puntos estándar 0-5-10-20-40-80-100µg. Estos estándares se tratarán junto con las muestras y se someterán a la extracción de lípidos y la saponificación.
- Utilizar 10 mg de proteína total en un volumen final de 200µL (Ajustar el volumen con PBS). Utilizar dos tubos por muestra para la cuantificación.
- Añadir 200µL de EtOH-KOH33% (100% EtOH y 1/10 33% KOH).
- Vortexear 1 minuto.
- Saponificación: incubar 30 minutos a 60°C y dejar que las muestras se enfríen.
- Extracción de lípidos:
 - Añadir 200µL de H₂O miliQ.
 - Añadir 400µL de hexano grado HPLC.
 - Mantener siempre la relación de extracción de la muestra: EtOH-KOH: H₂O: hexano (1: 1: 1: 2).
 - Vortexear 1 minuto y esperar 1 minuto, repetir tres veces.
 - Centrifugar 2 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente.
 - Recolectar 200µL de la capa superior de hexano que contiene el colesterol y

transferir en un nuevo tubo. (Eficiencia de extracción de lípidos: 200µL recuperar / 400µL hexano).

- Secar el hexano en un Speed Vac por 45 minutos.

- Añadir 2 ml del reactivo OPA (0,5 mg de OPA/mL ácido acético). (SIGMA 1378)
- Vortexear y esperar durante 1 minuto.
- Añadir 1 ml de ácido sulfúrico.
- Vortexear y leer a 550nm en el espectrofotómetro (es estable durante 90 minutos).

7. Determinación de triglicéridos

Los métodos para la determinación de TG generalmente implican hidrólisis enzimática o alcalina, los TG se hidrolizan primero por la lipoproteína lipasa, en glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por la adenosina 5'-trifosfato (ATP) que forma el glicerol-1-fosfato (G-1-P) y adenosina 5'-difosfato (ADP) la reacción es catalizada por la glicerol quinasa (GK).

El G-1-P se oxida por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a fosfato dihidroxiacetona (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La peroxidasa (POD) cataliza el acoplamiento del H₂O₂ con la 4-aminoantipirina (4-AAP) y el sodio N-etil-N- (3-sulfopropil) m-anisidina (ESPA) para producir un colorante quinoneimina que muestra un máximo de absorbancia a 540nm. El aumento en la absorbancia a 540nm es directamente proporcional a la concentración de TG de la muestra.

Reactivo de glicerol libre y reactivo de TG: Se reconstituyeron los reactivos de glicerol libre y TG con 40ml y 10 ml de agua respectivamente. Después de la adición de agua, se taparon los viales, e inmediatamente se mezclaron varias veces por inversión. Se debe proteger los reactivos de la luz mediante el almacenamiento en botellas de color ámbar.

- Se homogenizan 100mg de hígado en 0.5mL de PBS, después se centrifuga a 13,000rpm y se recoge el sobrenadante evitando la contaminación del sedimento y la fase lipídica superior.
- Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3,000rpm para obtener el suero.
- Se atemperaron los reactivos de glicerol libre y TG.
- Se añadieron 800µl del reactivo de glicerol y 10µl de la muestra, dejándolos a 37°C por 5 minutos, después se añaden 200µl del reactivo de TG y se incuban a 37°C por 5 minutos.
- Se leyeron las muestras a 540nm.

8. Cuantificación de GSH

El GSH es un tripéptido no esencial que se sintetiza en el cuerpo a partir de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. Es un antioxidante que previene el daño a los componentes celulares importantes causados por el estrés oxidante. Por lo tanto su abundancia en las mitocondrias protege este orgánulo y a la célula del daño inducido por ROS.

Para la cuantificación total de glutatión (GSH y GSH oxidado (GSSG)) se

utilizó el método de reciclaje enzimático, utilizando GSH reductasa (GR) (Sigma Aldrich).

El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, reactivo de Ellman. Sigma Aldrich) y produce un color amarillo detectable TNB (5- ácido tionitrobenzoico). El disulfuro mixto, GSTNB (GSH vinculado a TNB) que se produce de forma concomitante, se reduce por GR para reciclar el GSH y producir más TNB.

La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclado, que a su vez es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. La medición de la absorbancia de TNB a 412nm proporciona una estimación precisa del GSH total en la muestra.

Preparación de las muestras:

Se analizaron los niveles de GSH en homogenado total de hígado de ratón.

- Las muestras se resuspendieron en Homobuffer con una dilución 1:20 en PBS
- La muestra diluida se resuspende 1:1 con TCA-PBS al 10%, vortexear y centrifugar a 12000rpm por 5 minutos a 4°C.
- Se colectan 100µL del sobrenadante y se lee como se describe a continuación.

ENSAYO ELLMAN

Buffers:

BUFFER ELLMAN		REACTIVO ELLMAN	
<i>Compuesto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concentración</i>
KH ₂ PO ₄ (Fluka)	0.5 M	DTNB (Sigma Aldrich)	10mM
pH 8.0		NaHCO ₃ (Sigma Aldrich)	0.1M

Tabla. 3 Buffer Ellman y reactivo Ellman. El buffer Ellman puede ser almacenado a 4°C y el reactivo Ellman puede alicuotarse y almacenarse a -20°C.

Protocolo:

- Preparar un stock 1mM de GSH (Sigma Aldrich) en PBS.
- Preparar una curva estándar de GSH en PBS: 0 – 10 – 20 – 30 – 40 - 50 y 60M en un volumen final de 4 ml.
- Mezclar en un tubo: 2 ml de buffer Ellman, 1mL de estándar y 30µL del reactivo Ellman.
- Realizar el ensayo por duplicado.
- Mezclar bien y esperar 3 minutos antes de leerlo.
- Leer en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU800) a una absorbancia de 412nm.

Los valores obtenidos se multiplicarán por 198 (coeficiente de extinción del espectrofotómetro) y representarán la concentración real de los estándares de GSH preparados que también van a ser utilizados en el ensayo de reciclaje. Vamos a utilizar estos datos para normalizar la absorbancia obtenida en el ensayo de reciclaje para los estándares de GSH.

Ensayo de reciclaje:

Buffers:

0.5M NaPO ₄ a pH 7.4		BUFFER DE RECICLAJE pH 7.4	
<i>Compound</i>	<i>Concentration</i>	<i>Compound</i>	<i>Concentration</i>
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	95 ml, 1N	EDTA	1mM
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	405ml, 1N	DTNB	0.1mM
H ₂ O mQ	500ml	NADPH	0.15 mM
		NaPO ₄	50mM

Tabla. 4 Buffers para el ensayo de reciclaje. El buffer de reciclaje debe prepararse en fresco y tiene que protegerse de la luz. Todos los reactivos fueron comprados en Sigma Aldrich.

Protocolo:

- Preparar el buffer de reciclaje, protegerlo de la luz y calentarlo a 37°C.
- Enzima: preparar el GR a una concentración de 10 U/mL en agua miliQ. Será estable unas semanas a 4°C. Mezclar en un tubo: 2,5mL de buffer de reciclaje a 37°C, 100µL de muestra / estándar y 100µL de GR.
- Mezclar por inversión.
- Leer durante 40 segundos en el espectrofotómetro a una absorbancia de 412nm.
- Las concentraciones de GSH se determinarán en referencia a las muestras de la curva estándar, normalizada por el ensayo de Ellman y por concentración de la proteína.

9. Análisis del contenido de proteínas

9.1. Homogenado y lisis:

Protocolo:

- Homogeneizar 100mg de hígado en 0.5mL de T-PER (Thermo Scientific).
- Incubar las muestras 15 minutos a 4°C agitarlas con vortex regularmente
- Centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C.
- Recoger el sobrenadante evitando la contaminación del sedimento y la fase lipídica superior.

9.2. Cuantificación de la proteína:

Los homogeneizados y lisados fueron cuantificados para la concentración de proteína utilizando el ensayo de proteínas de Bradford. El ensayo de Bradford es un método de determinación de proteínas que implica la unión del Azul Brillante de Coomassie G-250 a aminoácidos principalmente básicos y aromáticos de las proteínas, a una absorbancia de 595nm. Hay ciertas interacciones químicas entre las proteínas o entre el colorante que pueden interferir con el ensayo. En nuestro caso, es importante diluir siempre el buffer de lisis al menos 4 veces.

Protocolo:

- Preparar diferentes puntos estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para la curva estándar: 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 y 0,5 mg/ml en PBS.
- Diluir las muestras en PBS para que entren dentro de la curva estándar (homogenado de hígado dilución 1/75).
- Realizar el ensayo en una placa de 96 pozos por triplicado.
- Añadir 4µL de la muestra diluida a cada pozo.
- Utilizando una pipeta multicanal añadir 200µL del colorante concentrado para ensayo de proteínas previamente diluido (1 parte de colorante en 4 partes de agua destilada) (Bio-Rad)

- Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las muestras no deben incubarse más de 1 hora.
- Ajustar el lector espectrofotométrico de placas a 595nm. Medir la absorbancia de los estándares, el blanco, y las muestras.
- Las muestras se interpolan en la curva estándar de BSA para obtener la concentración final. Tener en cuenta la dilución de las muestras.

9.3. Preparación de las muestras para la electroforesis

Para ser capaz de separar las proteínas en un gel de poliacrilamida, las muestras se mezclan con un buffer de carga para asegurar la estabilidad y peso de la proteína cuando se cargan en los pocillos.

Protocolo:

- Llevar todas las muestras a la misma concentración con el fin de cargar 20-50µg de proteína por pocillo en un volumen de 15-40µL. Ajustar el volumen con buffer de lisis.
- Añadir 1/3 del volumen del buffer de carga 2x (Bio-Rad) con 0.05% de β-mercaptoetanol y vortexear.
- Hervir las muestras 5 minutos a 95°C.
- Dejar que las muestras se enfríen.
- Vortexear y centrifugar. Como marcador estándar de proteína para electroforesis se utilizó Novex sharp (Invitrogen, LC5800).

9.4. Western Blot:

En esta tesis se utilizaron geles de electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE, para separar las proteínas de hígado. Esta técnica permite la separación de

proteínas en función de su movilidad electroforética, en función de la longitud de la cadena del polipéptido y su carga. El SDS es un detergente aniónico que linealiza proteínas y les confiere una carga negativa. La unión de SDS a la cadena polipeptídica imparte una distribución uniforme de la carga por unidad de masa, resultando así en un fraccionamiento por tamaño aproximado durante la electroforesis. Después del SDS-PAGE, las proteínas separadas en el gel se electrotransfirieron en una membrana de nitrocelulosa y se detectaron específicamente en la superficie de la membrana con anticuerpos.

Buffers:

- Buffer de corrida: dependiendo del tamaño de la proteína a detectar se utilizó:
 - 20x XT Buffer de corrida MES (Bio-Rad), para correr las proteínas de bajo peso molecular. Disuelto en agua destilada.
 - 20x XT Buffer de corrida MOPS (Bio-Rad), para correr las proteínas de alto peso molecular. Disuelto en agua destilada.
 - Buffer de transferencia: se preparó el buffer y se enfrió a 4°C.
 - 10x T G/buffer: Tris/glicina buffer (Bio-Rad). Para 1L: 100 ml de buffer T/G, 200 ml de metanol y 700 ml de agua destilada.
 - TBST: Buffer Tris Salino, con Tween 20, pH 8,0 (Sigma Aldrich). Complementamos con 5 ml de TWEEN 20 al 20% (Bio-rad) por litro para alcanzar el 0,1%. Este buffer se utiliza para lavar, bloquear y la incubación de las membranas con los anticuerpos.
- Transferencia:
- Iniciar la electroforesis a 50v hasta que las muestras estén juntas en el frente de corrida y luego aumentar el voltaje a 100V hasta que la proteína de interés haya

recorrido un fragmento del gel (revisar el marcador estándar para un peso molecular aproximado).

- Apilar en el siguiente orden formando un sándwich, asegurándose de que no queden burbujas entre las capas: Casette (negro) – Esponja - papel filtro (Whatman)

- Gel- membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham) - papel filtro (Whatman) - Esponja- Casette (rojo).

- Coloque el sándwich en el aparato de transferencia con el lado negro del sandwich hacia el lado negro del aparato.

- Electrotransferencia: de 40-60 minutos a 50V en el hielo, dependiendo de la proteína de interés.

- Bloqueo: para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, las áreas vacías de membrana se bloquearon durante 1 hora con 5% de BSA (Sigma Aldrich) TBST o 5% de leche a temperatura ambiente en un pequeño recipiente en un agitador orbital.

9.5. Inmunodetección

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en movimiento. Las diluciones de los anticuerpos se especifican en la siguiente tabla.

Protein	Antibody	Epitope mapping	Company & Catalog #
Cyclin D1	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-295 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-753
Cyclin A	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-432 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-751
CDK2	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-298 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-748
CDK4	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-303 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-749
p27	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-197 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-776
p21	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-164 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-756
Bcl2	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-205	Santa Cruz Biotechnology sc-783
BclxL	Mouse monoclonal	Amino acids 165-190 at the C-terminus	Santa Cruz Biotechnology sc-8392
Mcl1 (Myeloid cell leukemia-1)	Rabbit polyclonal	Internal region	Santa Cruz Biotechnology sc-819
Bax	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-171 representing all but the C-terminal	Santa Cruz Biotechnology sc-6236
γGST (γ-glutamylcysteine synthetase)	Rabbit polyclonal	Amino acids 338-637 mapping at the C-terminus	Santa Cruz Biotechnology sc-22755
Gpx4 (glutathione peroxidase 4)	Rabbit polyclonal	C-Terminus	Life Span BioScience LS-C56834
Gpx1/2 (glutathione peroxidase 1/2)	Mouse monoclonal	Amino acids 50-201 mapping at the C-terminus	Santa Cruz Biotechnology sc-133160
GST (glutathione S-transferase)	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-218 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-292368
SOD 1 (superoxide dismutase-1)	Rabbit polyclonal	Amino acids 1-154 representing full length	Santa Cruz Biotechnology sc-11407
SOD 2 (superoxide dismutase-2)	Rabbit polyclonal	Amino acids 1 and 90	Gen Tex GTX-116093
HO1 (Heme Oxygenase 1)	Rabbit polyclonal	Amino acids 184-288 mapping at the C-terminus	Santa Cruz Biotechnology sc-10789
NQO1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1)	Rabbit polyclonal	Amino acids 185-274 mapping at the C-terminus	Santa Cruz Biotechnology sc-25591

Tabla.5 Los anticuerpos primarios utilizados. p, fosfo. Rb, conejo. M, ratón. G, cabra. SCBT, Biotecnología Santa Cruz.

Después de la incubación durante toda la noche:

- Lavar al menos 3 veces durante 10 minutos con TBST para lavar uniones inespecíficas.
- Incubar las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes diluir en TBST (Tabla 6).

Anticuerpo	Dilución	Compañía & Catalogo
anti-cabra-HRP	1:8000	Santa Cruz Biotechnology sc-235
anti-ratón-HRP	1:8000	GE Healthcare NA931V
anti-conejo-HRP	1:8000	GE Healthcare NA934V

Tabla 6. Anticuerpos Secundarios y diluciones.

- Lavar al menos 3 veces durante 10 minutos con TBST.

9.6 Revelado y Captura de imágenes:

Las membranas se revelaron con el substrato para Western Blot Pierce ECL (Thermo Scientific), incubando durante 1 minuto con la mezcla de los reactivos a una proporción de 1:1. Las imágenes fueron capturadas con el fotodocumentador de imágenes LAS4000 (GE Healthcare) y analizadas con el software Image J.

10. Actividad de Caspasa 3 (BD Pharmigen #556485)

El kit utilizado está diseñado para medir la actividad de la caspasa 3, un marcador temprano de las células que experimentan apoptosis. Contiene un sustrato de caspas 3 fluorogénico (Ac-DEVD-AMC), que es un sustrato tetrapéptido fluorogénico sintético (PM = 675 Daltones; pureza $\geq 98\%$) que se utiliza para identificar y cuantificar la actividad de la caspasa 3 en lisados de células apoptóticas. La caspasa 3 corta el tetrapéptido entre D y AMC, liberando el AMC fluorescente que

se puede cuantificar en los lisados celulares por espectrofluorimetría ultravioleta (UV) usando una longitud de onda de excitación de 380nm y un rango de longitud de onda de emisión de 420-460nm.

Reactivos:

- Sustrato fluorogénico, Ac-DEVD-AMC para caspasa 3, 1mg de péptido liofilizado. Antes de usar, reconstituir 1mg del péptido en 1ml de DMSO. Alicuotar y almacenar a -20°C , evitando ciclos de congelación y descongelación.
- PBS (10X): Diluir a 1X con H_2O destilada estéril antes de su uso. Ajustar el pH a 7.5. Almacenar el buffer a 4°C .
- Buffer de Lisis Celular (1X): mM Tris-HCl 10; 10mM NaH_2PO_4 / NaHPO_4 (pH 7.5); NaCl 130mM; 1% Triton®-X-100; MM Nappi 10 (pirofosfato de sodio). Almacenar a 4°C .
- HEPES: Hepes 40 (pH 7,5); 20% de glicerol; 4mM DTT. Diluir a 1X con H_2O destilada estéril. Para el almacenamiento a largo plazo, se almacenan a 4°C .
- Hacer el lisado del tejido con el buffer de lisis y dejarlo en hielo por 30 minutos.
- Para cada reacción añadir 5 μl de Ac-DEVD-AMC a cada pozo que contiene 0.2 ml de HEPES 1X.
- Añadir 20 μl del lisado a cada pozo.
- Incubar la mezcla de reacción por 1 hora a 37°C .

- Medir la cantidad de AMC liberado de Ac-DEVD-AMC usando un lector de placas con una longitud de onda de excitación de 380nm y una de emisión con un rango de 420-460nm.

11. EMSA quimioluminiscente (Thermo Scientific #20148)

Reacciones de Unión

Componentes	Cantidad final	Reacción
Agua ultra pura	-----	Hasta 20µL
10X Buffer de unión (A)	1X	2µL
1µg/µL Poly (dIdC) (E)	50ng/µL	1µL
Opcional: Glicerol al 50% (F)		
Opcional: NP-40 al 1% (G)		
Opcional: KCl 1M (H)		
Opcional: MgCl ₂ 100mM (I)		
Opcional: EDTA 200mM (J)		
ADN blanco no marcado	4pmol	
Extracto de Proteína ¶¶	Dependiente del sistema	
ADN blanco marcado con Biotina	20fmol	1µL
Volumen total		20µL

Tabla.7 Reactivos del EMSA

- Elaborar y Pre correr el Gel
 - Preparar un gel de poliacrilamida en TBE 0.5X al 4-6%.
 - Colocar el gel en la unidad de electroforesis. Llenar la cámara con 0.5X TBE por encima de los pozos. Pre correr el gel durante 30-60 minutos. Aplicar 100v para un gel de 8 x 8 x 0.1cm.

- Preparar y realizar las reacciones de unión

No vortexear el ADN control o el extracto EBNA

- Descongelar todos los reactivos y colocarlos en hielo. No calentar el extracto EBNA, incluyendo descongelación en la mano.
 - Preparar las reacciones de unión de acuerdo con la tabla. No vortexear los tubos en ningún momento.
 - Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
 - Añadir 5µL del buffer de carga 5X a cada reacción de unión de 20µL, pipeteando arriba y abajo varias veces para mezclar. No vortexear.
-
- Reacción de unión para la electroforesis
 - Lavar los pozos y cargar 20µL.
 - Ajustar a 100v y correr las muestras hasta que el colorante azul de bromofenol haya migrado aproximadamente $\frac{3}{4}$ abajo de la longitud del gel.
-
- Reacciones de unión de electroforesis
 - Remojar la membrana de nylon en TBE 0.5X durante 10 minutos.
 - Hacer sandwich el gel, la membrana de nylon y el papel filtro en una unidad de transferencia electroforética. Usar el TBE 0.5X frío a $\approx 10^{\circ}\text{C}$ con un baño de agua circulante. Usar pinzas muy limpias y guantes sin talco.

Nota: evitar el uso de esponjas que se hayan utilizado en transferencias de Western

Blot.

- Trasferir a 380mA (\approx 100V) durante 30 minutos.
- Colocar la membrana con el lado azul de bromofenol en una toalla de papel.
No dejar que la membrana se seque.

- Hacer el Crosslink del ADN en la membrana
 - Hacer el Crosslink durante 10-15 minutos con la membrana boca arriba en un transiluminador equipado con bombillas de 312nm.
 -

- Detectar por quimioluminiscencia el ADN marcado con biotina
 - Calentar suavemente el buffer de bloqueo y el buffer de lavado 4X a 37-50°C en un baño de agua hasta que se disuelvan todas las partículas. El buffer de equilibrio de sustrato puede ser utilizado entre 4°C y temperatura ambiente.
 - Para bloquear la membrana agregar 20 ml de buffer de bloqueo e incubar durante 15 minutos con agitación suave.
 - Preparar la solución conjugado/bloqueo añadiendo 66.7 μ L del buffer conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano a 20ml de buffer de bloqueo (1:300 dilución).
 - Decantar el buffer de bloqueo de la membrana y sustituirla por la solución de conjugado/bloqueo, se incuba durante 15 minutos con agitación suave.

- Preparar la solución de lavado 1X añadiendo 40ml de buffer de lavado 4X a 120ml de agua desionizada.
- Lavar brevemente con 20ml de solución de lavado 1X.
- Lavar la membrana cuatro veces durante 5 minutos cada uno en 20ml de buffer de lavado 1X con agitación suave.
- Añadir 30ml de buffer de equilibrio. Incubar la membrana durante 5 minutos con agitación suave.
- Preparar las soluciones de trabajo, añadiendo 6ml de Luminol a 6ml de la solución de peroxidasa estable.

Nota: La exposición a la luz intensa puede dañar la solución de trabajo.

- Retirar la membrana del buffer de equilibrio, poniendo cuidadosamente un borde de la membrana sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de buffer. Colocar la membrana en un recipiente limpio.
- Verter la solución de trabajo de sustrato sobre la membrana de modo que cubra completamente la superficie. Incubar la membrana durante 5 minutos sin agitación.
- Retirar la membrana y poner un borde de la membrana sobre una toalla de papel durante 2-5 segundos para eliminar el exceso de buffer. No permitir que la membrana se seque.
- Envolver la membrana en una envoltura de plástico, evitando burbujas y arrugas.
- Exponer la membrana a una cámara CCD debidamente equipada.

12. Análisis de ácidos biliares

El análisis de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 mm). Las condiciones cromatográficas fueron: disolventes metanol y agua, con acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,01%, pH 4,6, con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min; La cromatografía se comenzó a 80:20 (v/v) de metanol/agua, y la proporción de metanol se aumentó linealmente hasta 97% durante 9 min. El estándar de los ácidos biliares (pureza > 95%) se adquirió en Sigma-Aldrich. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico (24, 25).

13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM. La significación estadística de los valores medios se evaluó mediante la t de Student y ANOVA seguido de un post-test de Tukey. La estadística se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6. Se definió como estadísticamente significativo una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. La dieta alta en colesterol induce esteatosis hepática

Los animales fueron alimentados con una dieta hipercolesterolémica (HC) durante dos días. Los ratones bajo la dieta HC macroscópicamente mostraron el característico color pálido del hígado con esteatosis (Fig. R-1B); adicionalmente la tinción de filipina reveló un alto contenido de colesterol libre (Fig. R-1D) y la tinción de aceite rojo O de lípidos neutros (Fig. R-1F), estos resultados fueron bioquímicamente corroborados mediante la determinación del contenido de colesterol total (Fig. R-1G) y TG (Fig. R-1H).

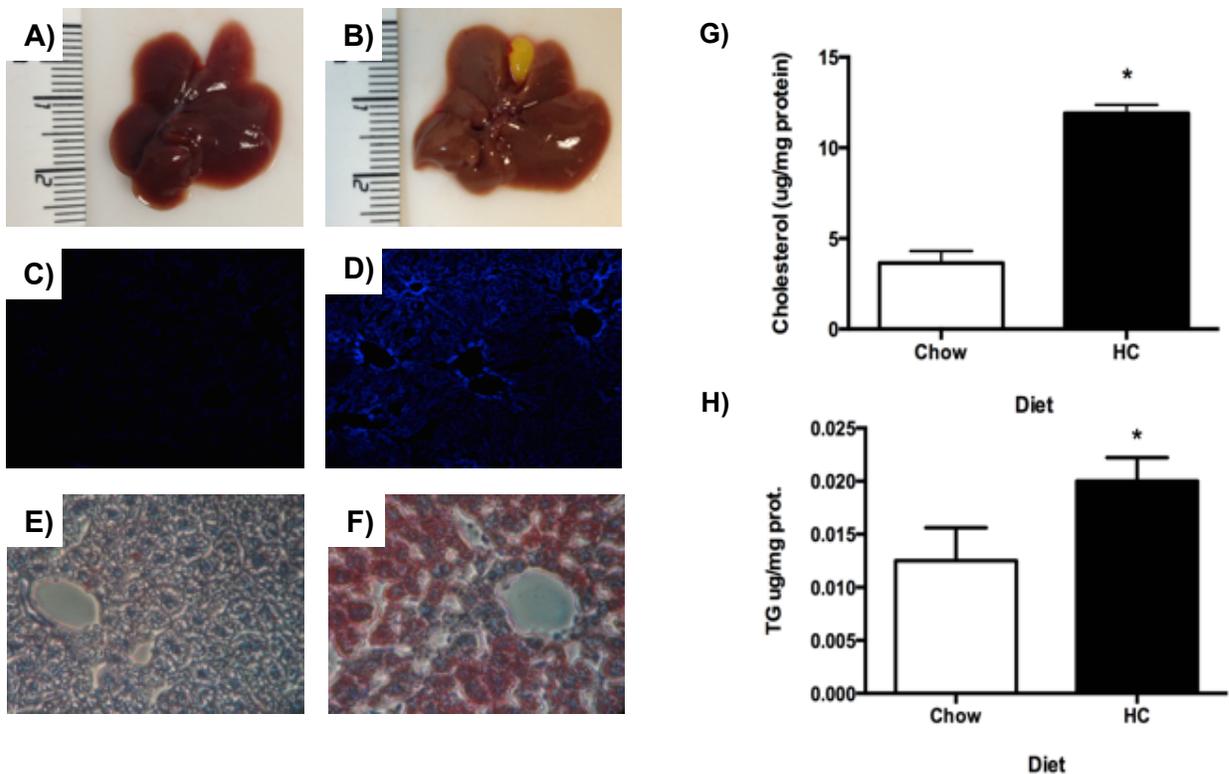


Figura R-1. La dieta hipercolesterolémica induce esteatosis hepática. Inspección macroscópica del hígado. A) Dieta estándar control (Chow); B) Dieta alta en colesterol (HC). Determinación del colesterol libre con filipina, C) Sección hepática del animal Chow; D) Sección hepática del animal HC. Determinación de lípidos neutros mediante aceite rojo O (ORO), E) Sección hepática del animal Chow; F) Sección hepática del animal HC.

Determinación Bioquímica de G) colesterol total de tejido hepático; H) contenido de triglicéridos (TG). Cada columna representa el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a una * $p \leq 0.01$ vs Chow. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Aumento original de 200X.

Con la finalidad de corroborar que los hepatocitos sobrecargan colesterol, se aislaron hepatocitos y se realizó la determinación de colesterol y TG (Fig. R-2), confirmando que son efectivamente los hepatocitos los que sobrecargan los lípidos.

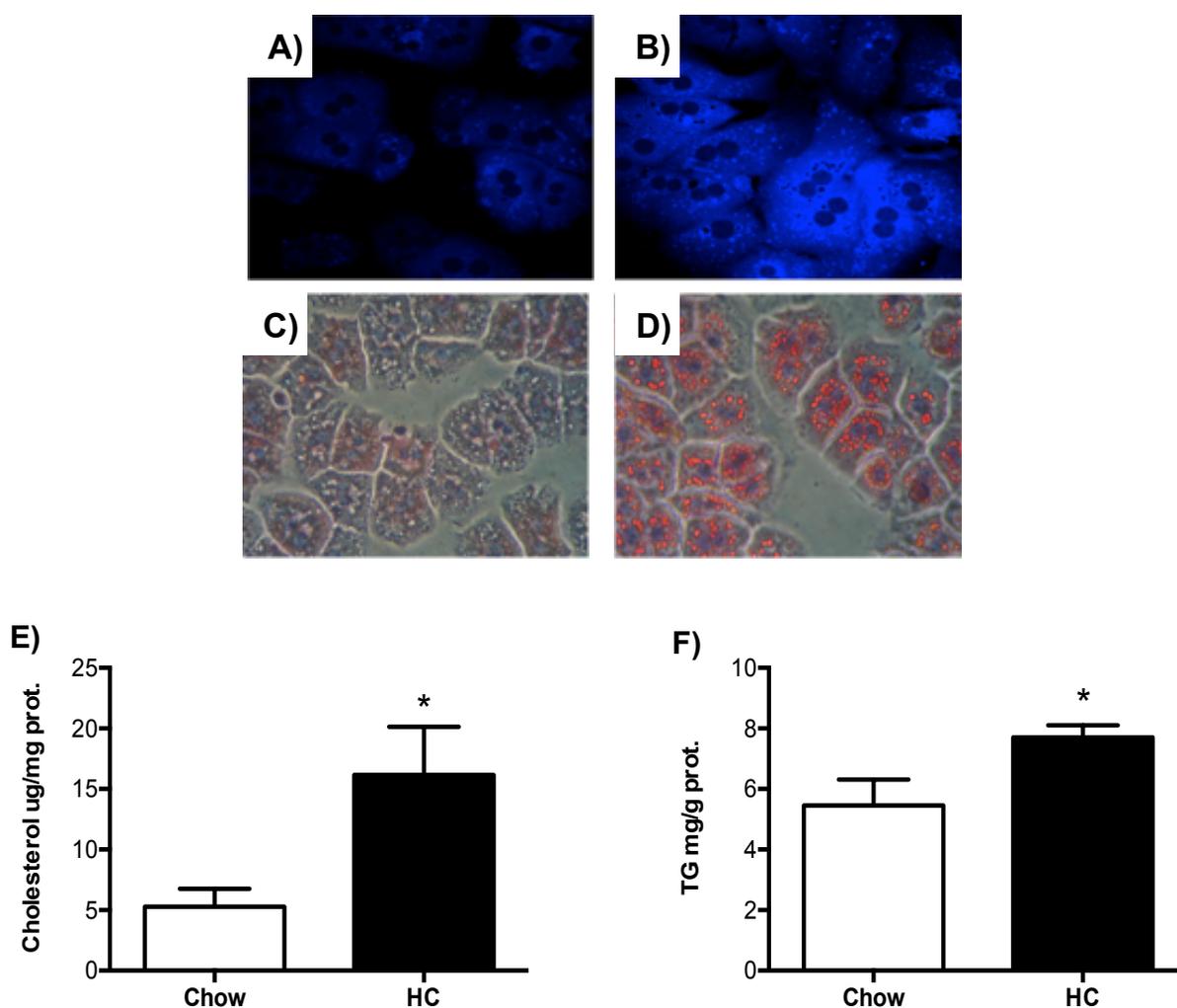


Figura R-2. Una dieta hipercolesterolémica induce la sobrecarga de colesterol libre y lípidos neutros en los hepatocitos. Los hepatocitos fueron aislados de animales alimentados con la dieta control (Chow) ó la dieta alta en colesterol (HC). A-B) Determinación

de colesterol libre por filipina, C-D) Determinación de lípidos neutros mediante aceite rojo O (ORO), Determinación Bioquímica de E) colesterol total; y F) contenido de triglicéridos (TG). Las diferencias se consideraron significativas a una * $p \leq 0.01$ vs Chow. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Aumento original de 200X.

El fenotipo esteatósico se asoció con el daño hepático, a juzgar por la AST y la ALT (Fig. R-3A-B), sin embargo el comportamiento de los animales fue normal sin signos de enfermedad.

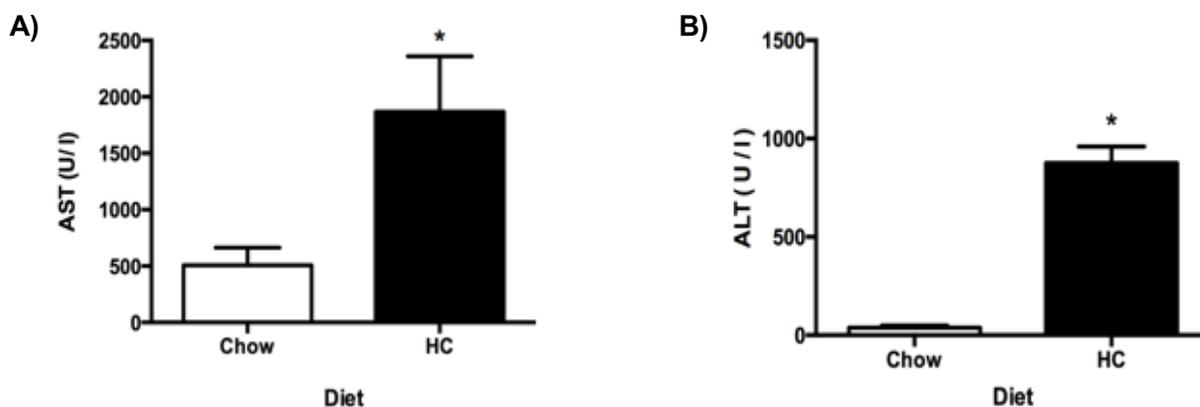


Figura 3. El colesterol induce daño hepático. Pruebas de daño hepático. I) Aspartato aminotransferasa (AST); J) Alanino aminotransferasa (ALT). Cada columna representa el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a una * $p \leq 0.01$ vs Chow.

2. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño inducido por la BDL e induce una muerte temprana en ratones.

Se procedió a realizar la cirugía BDL en ambos grupos de animales, observando que los ratones HC mueren entre 66 a 155 horas después de la cirugía (aproximadamente 3-4 días), mientras que los animales alimentados con la dieta Chow sobrevivieron en buenas condiciones después de 7 días de la cirugía (Fig. R-4A).

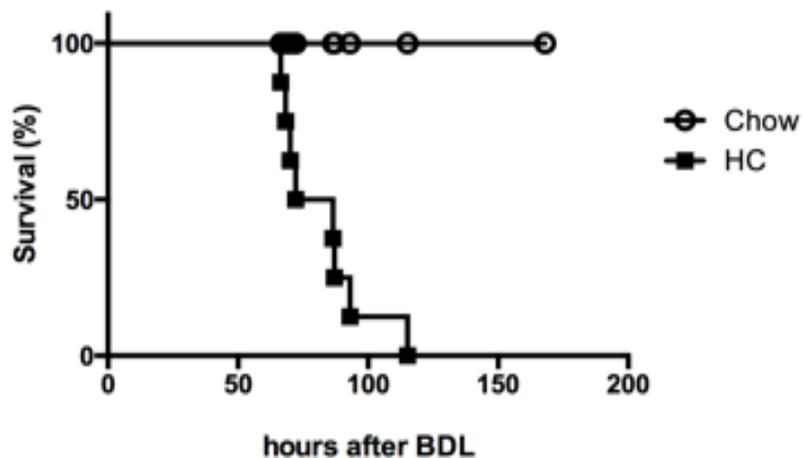


Figura R-4. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño hepático inducido por la BDL. A) Gráfica de supervivencia después de la BDL.

Es bien sabido que la ligadura del conducto biliar es un buen modelo para la colestasis obstructiva aguda, e incluso para la cirrosis, la supervivencia de los animales puede llegar hasta 6 semanas [6, 7]. Debido a que los animales HC mueren a los 3 días después de la cirugía, decidimos caracterizar la enfermedad a los 1, 2 y 3 días y tratamos de averiguar la razón de la muerte prematura de los ratones de HC.

Las inspecciones macroscópicas del hígado no revelaron diferencias significativas entre los grupos; sin embargo se observó estasis del conducto biliar en los animales HC, así como una vesícula biliar verdosa, en comparación con los animales Chow, que tenían una vesícula biliar más oscura (Fig. R-5B). El contenido de colesterol, medido por Filipina estuvo considerablemente presente en los animales HC, tal como se esperaba, en el día 3 el contenido de colesterol fue menos difuso en el tejido, observando manchas con alta fluorescencia, mientras que en los animales Chow el contenido de colesterol en el hígado no tuvo cambios significativos después de la BDL.

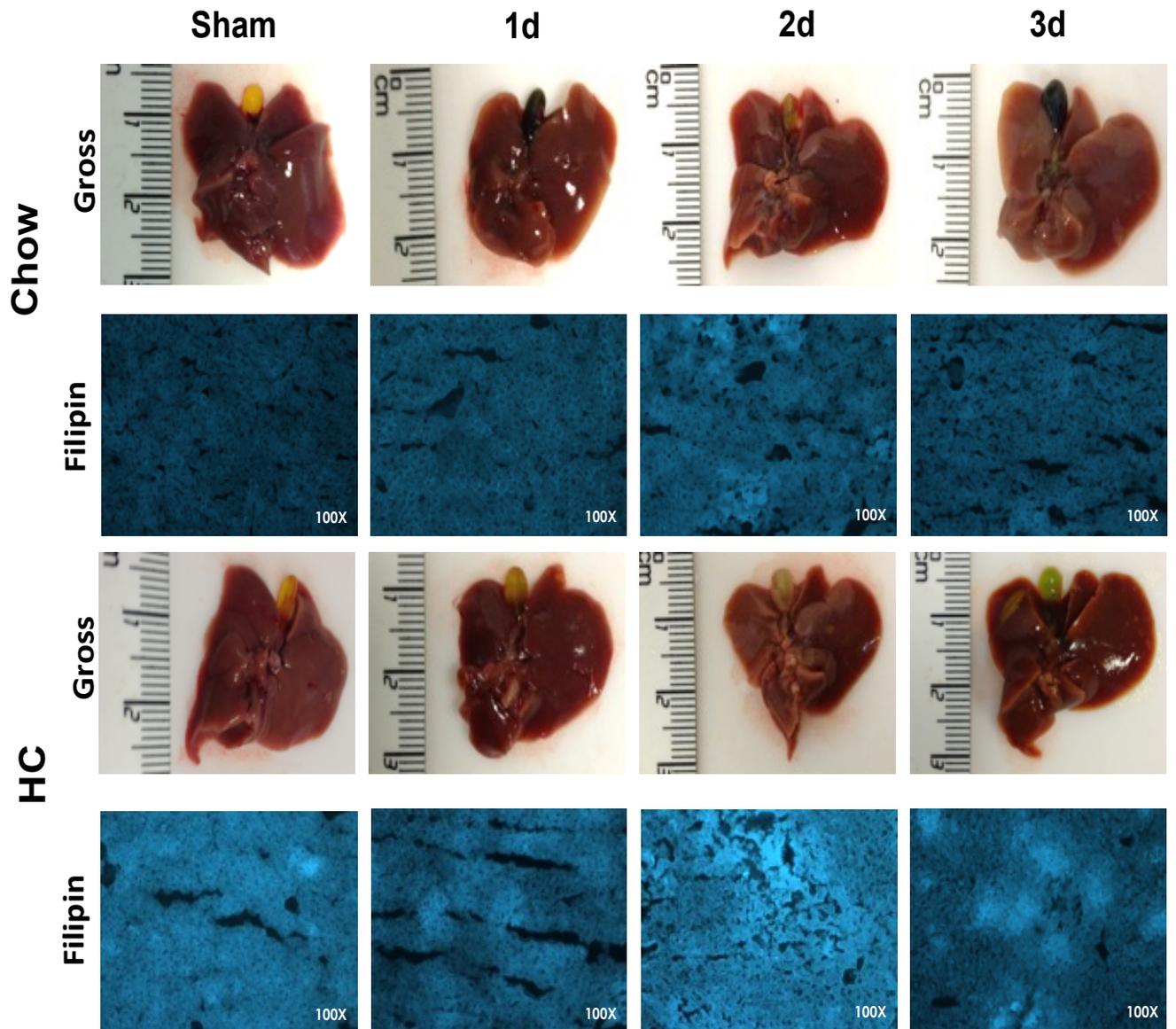


Figura R-5. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño hepático inducido por la BDL y agrava la colestasis obstructiva. Inspección macroscópica del hígado y la determinación de colesterol libre por Filipina. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Aumento original de 100X.

El colesterol sérico y el contenido de TG también fueron elevados en los ratones HC, pero el procedimiento quirúrgico parece no afectar a los valores (Fig. R-6A-B).

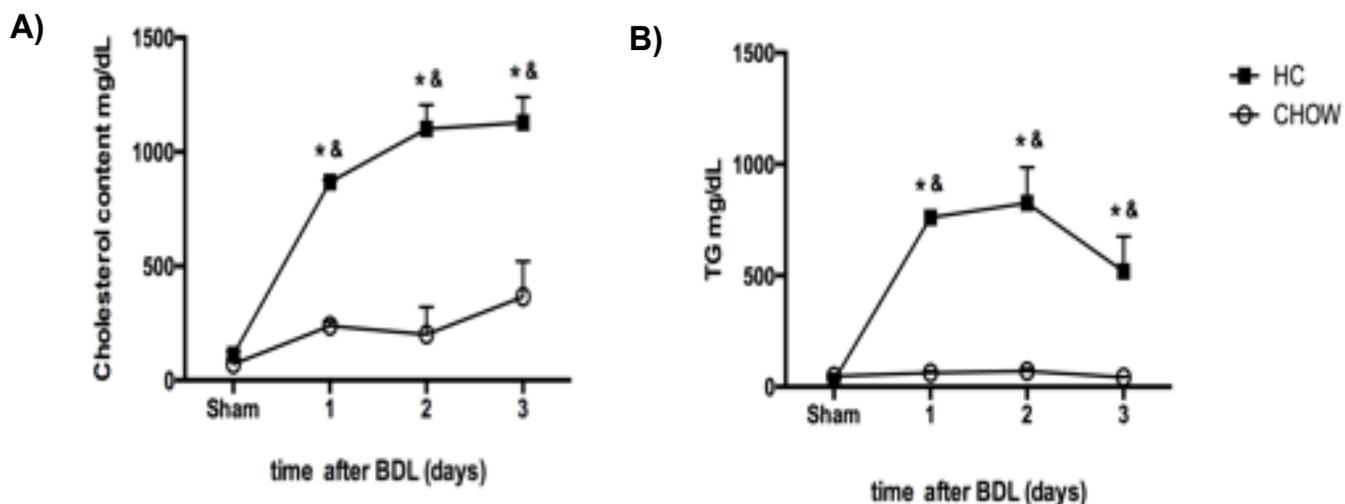


Figura R-6. La sobrecarga de colesterol aumenta los lípidos en el suero inducido por la BDL. Parámetros bioquímicos. A) Contenido de colesterol; B) Contenido de triglicéridos (TG). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs Sham Chow. & $P < 0,05$ vs Chow en el tiempo.

Los marcadores de función hepática mostraron un aumento significativo desde el primer día después de la BDL en AST (Fig. R-7A), ALT (Fig. R-7B) y al día 2 en ALP (Fig. R-7C). En todos los casos, los valores continúan elevándose hasta el día tres en los ratones alimentados con la dieta HC. Por el contrario, los animales Chow mostraron un ligero aumento en AST al día dos, sin observarse cambios significativos al tercer día.

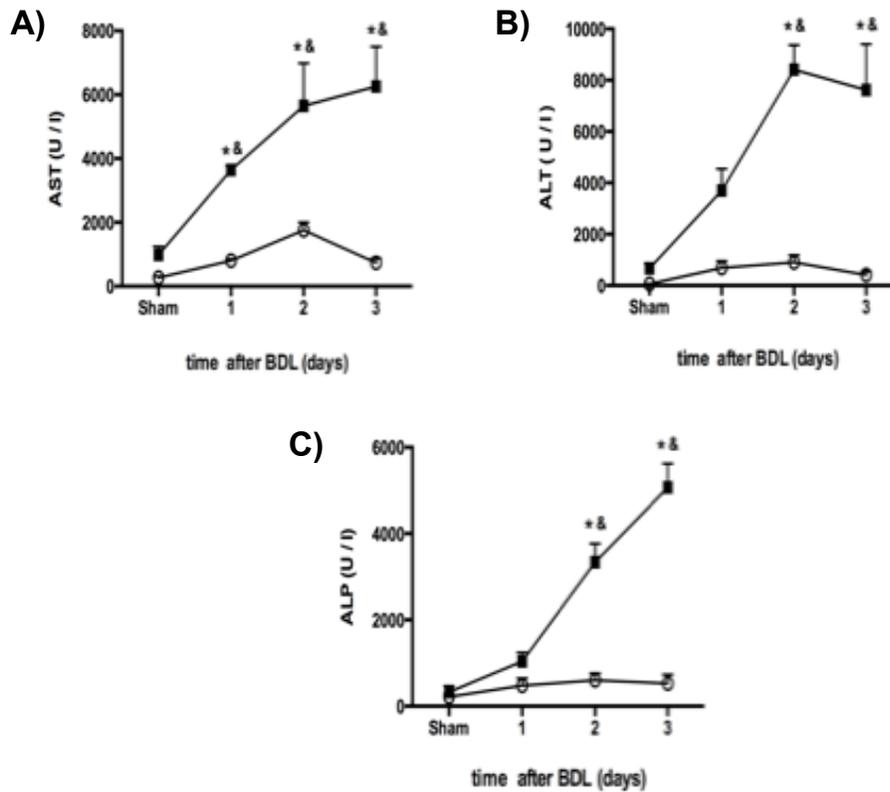


Figura R-7. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño hepático inducido por la BDL. A) Aspartato aminotransferasa (AST); B) Alanino aminotransferasa (ALT); C) Alcalino fosfatasa (ALP). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs Sham Chow. & $P < 0,05$ vs Chow en el tiempo.

La bilirrubina total y directa también se incrementaron en los animales HC desde el primer día de la cirugía (Fig. R-8 A-B) el mismo efecto se observó en los ácidos biliares totales en suero (TBA, Fig. R8C), curiosamente, los ácidos biliares totales en hígado se incrementaron significativamente incluso en los animales Sham debido a la alimentación con la dieta HC durante dos días, sin cambios en el transcurso del estudio, sin embargo los animales Chow aumentaron significativamente los ácidos biliares totales en el hígado al segundo día, alcanzando valores máximos al tercer día, a casi los mismos valores de los animales HC en el tiempo mismo (Fig. R-8D). Estos datos están de acuerdo con la viscosidad y turbidez

observada en los sueros de ambos grupos de animales, está claro que el suero de animales bajo dieta HC y BDL son más turbios que los de los animales Chow sometidos a la BDL(Fig. R-8E).

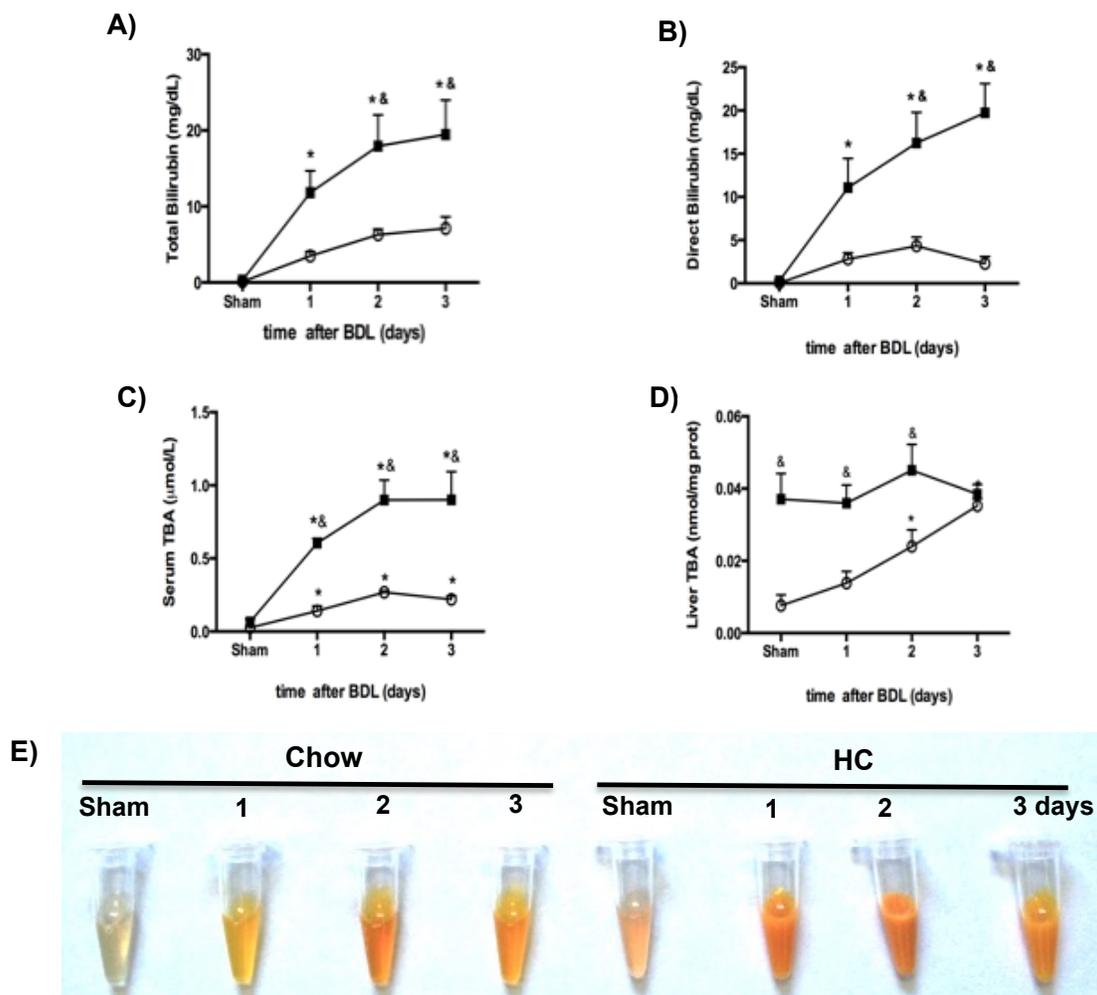


Figura R-8. La sobrecarga de colesterol sensibiliza al daño hepático inducido por la BDL. A) Bilirrubina total; B) Bilirrubina directa; C) Ácidos biliarres totales en suero (TBA); D) Ácidos biliarres totales en el hígado (TBA). E) Características del suero de ratones Chow y HC. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs Sham Chow. & $P < 0,05$ vs Chow en el tiempo.

Un análisis completo del contenido de ácidos biliarres reveló un incremento significativo en las formas conjugadas con taurina y glicina en animales HC, más

de 10 veces en comparación con los animales alimentados Chow (Fig. R-9), los ácidos biliares libres fueron significativamente elevados en los animales Sham al día 2, pero no se observaron diferencias entre ambas dietas en el día 2 y 3.

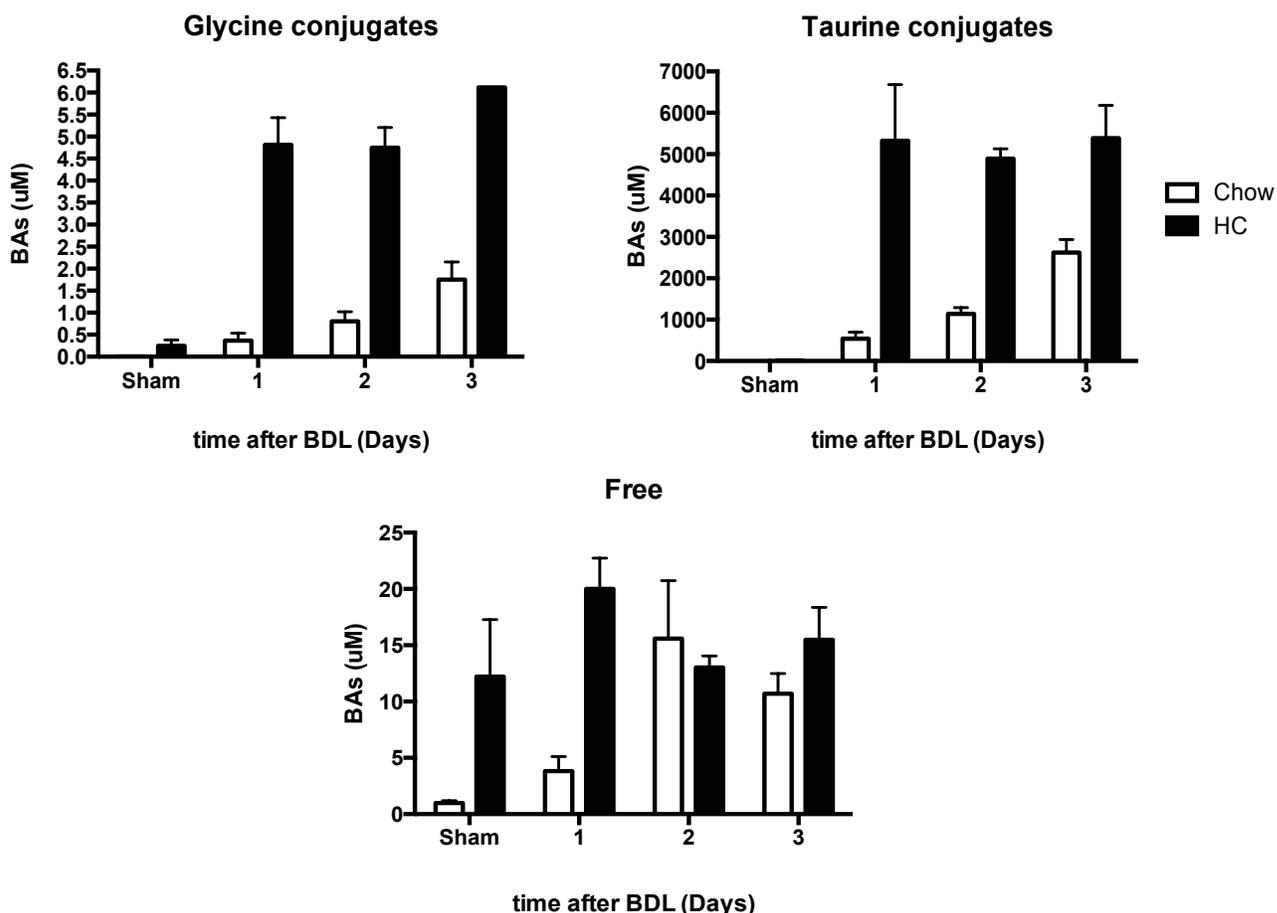
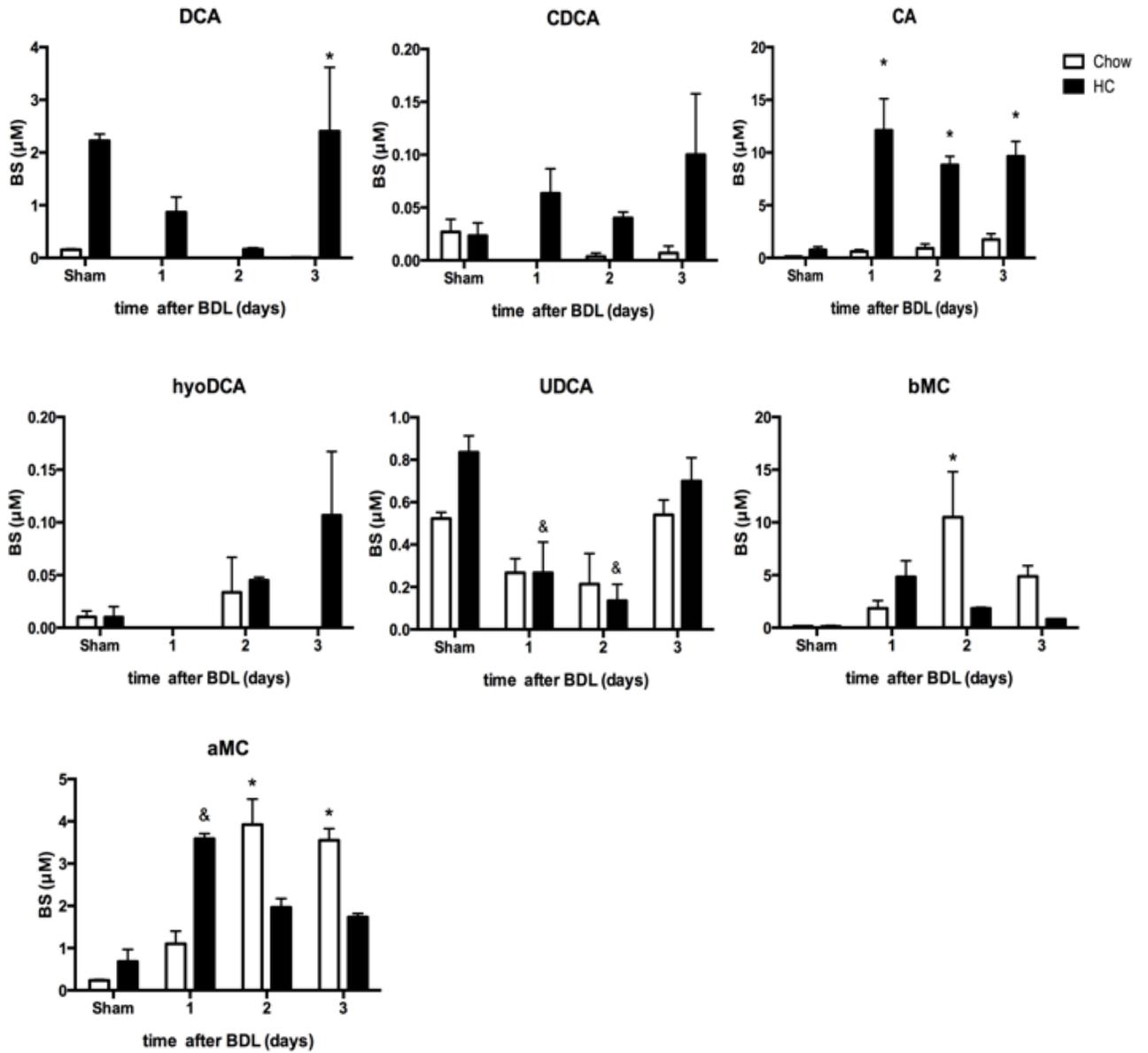


Figure R-9. La sobrecarga de colesterol incrementa los ácidos biliares. Ácidos biliares conjugados con Glicina y Taurina (BA), y ácidos biliares libres en animales alimentados con la dieta Chow y HC después de la BDL.

Los ácidos biliares analizados también se agruparon en orden de hidrofobicidad (Fig R-10), donde el perfil de los ácidos biliares indica un aumento de DCA, CDCA y CA en ratones alimentados-HC en comparación con los ratones alimentados con la dieta chow después de la BDL, con pequeños cambios en los niveles de hyoDCA, UDCA y AMC.

A)



B)

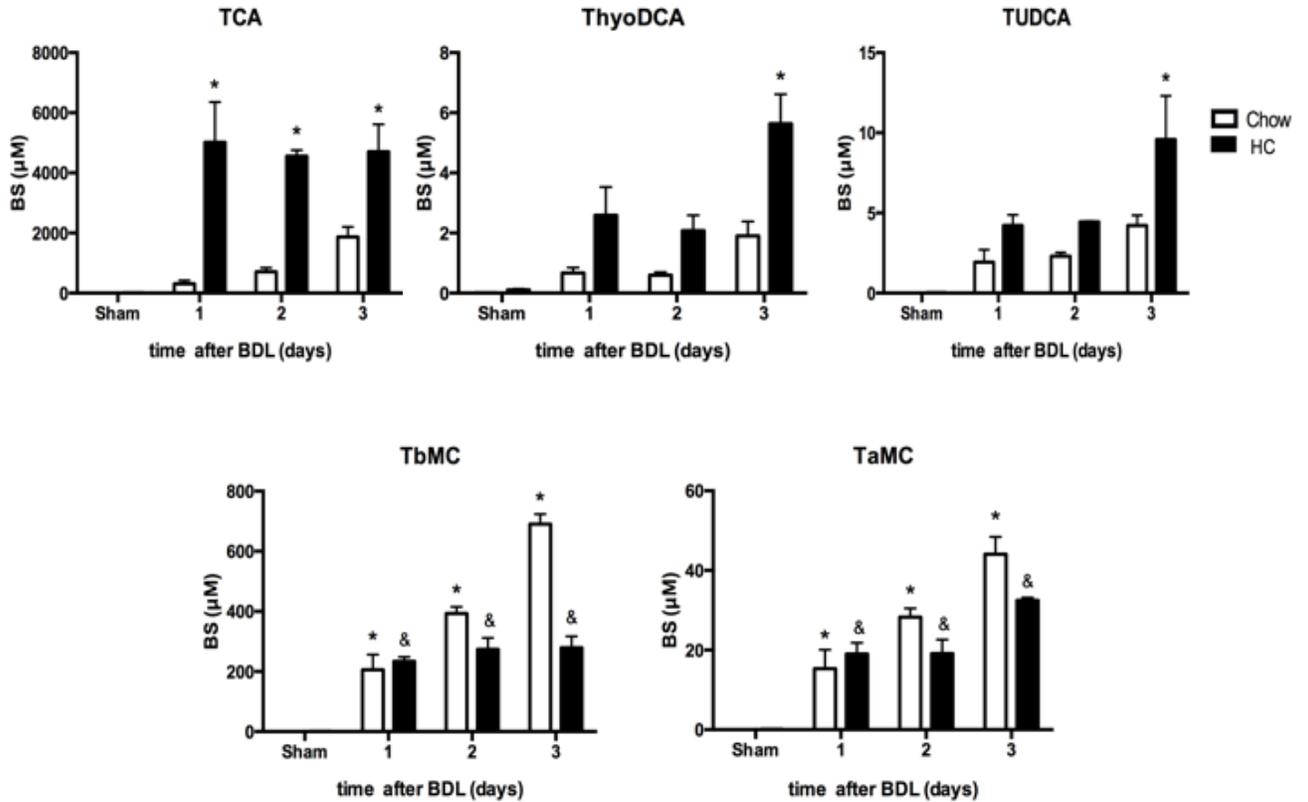


Figura R-10. La dieta alta en colesterol aumenta las sales biliares séricas después de la ligadura del conducto biliar. Las sales biliares se determinaron por HPLC. Sales biliares A) ácido Deoxicólico (DCA), Ácido Quenodexicólico (CDCA), Ácido Cólico (CA), Ácido Hiodeoxicólico (hyoDCA), Ácido Ursodeoxicólico (UDCA), Ácido β -Muricólico (bMC) y Ácido α -Muricólico (aMC) B) Ácido Taurocólico (TCA), Ácido Tiodeoxicólico (ThyoDCA), Ácido Tauroursodeoxicólico (TUDCA), Ácido Tauro β -Muricólico (TbMC) y Ácido Tauro α -Muricólico (TaMC) de animales alimentados con la dieta Chow y HC después de la BDL. Cada columna representa el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideran significativas a * $p \leq 0.01$ vs los animales Chow Sham, & $p \leq 0.01$ vs los animales Chow del mismo tiempo.

El análisis histológico de los hígados HC (Fig. R-11) reveló, esteatosis y áreas necróticas desde el primer día después de la cirugía, que continuó aumentando en número hasta el tercer día, cuando el puenteo de la necrosis hepática fue más evidente (asteriscos). La inflamación estuvo presente desde el primer día,

especialmente los leucocitos polimorfonucleares y linfocitos (flecha negra). La proliferación celular, en particular colangiolar se observó en el día uno y dos, pero era casi ausente en el día tres. Se presentaron los mismos resultados en los animales Chow en los días uno y dos, con una reducción de la necrosis hepática, en este momento parece un daño amplificado en los animales Chow (Fig. R-11C) en comparación con el mismo tiempo de los ratones HC (Fig. R-11G), pero al día tres la necrosis disminuye y se observa proliferación (Fig. R-11D, flecha blanca). La histología muestra un mejor proceso de reparación en los animales Chow en el día tres en comparación con los animales HC, donde las áreas necróticas son más prominentes y la esteatosis micro y macro vesicular es mas severa como se muestra en las imágenes 100X (Fig. R-12).

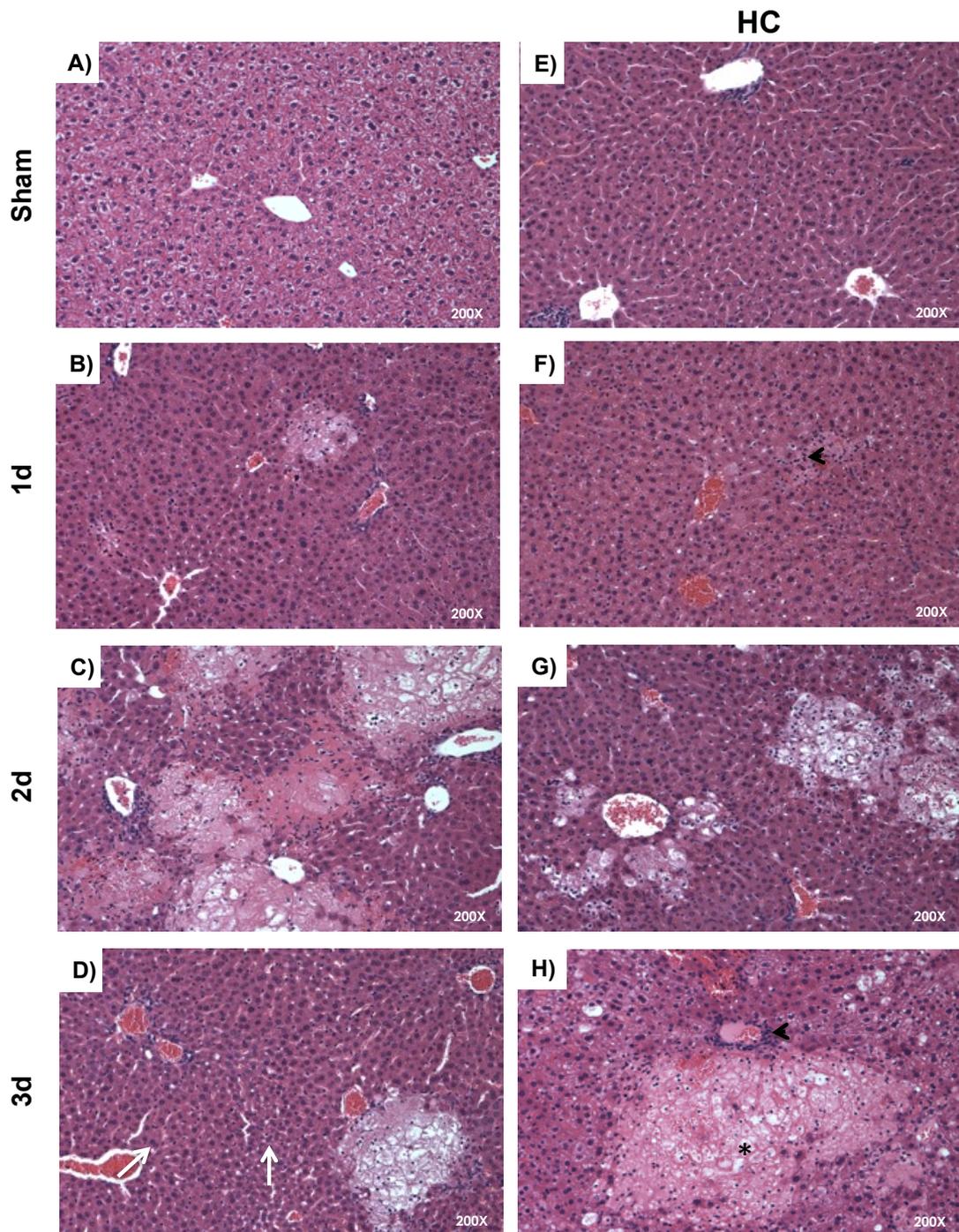


Figura R-11. La sobrecarga de colesterol exacerba el daño hepático. Análisis histológico por una tinción de H&E. El tejido hepático se obtuvo de animales alimentados con la dieta control (Chow) ó la dieta alta en colesterol (HC) por 2 días, después se realiza la BDL y los ratones fueron sacrificados al día 1, 2 o 3. Imágenes representativas de al menos cuatro animales diferentes. Aumento original 200 X.

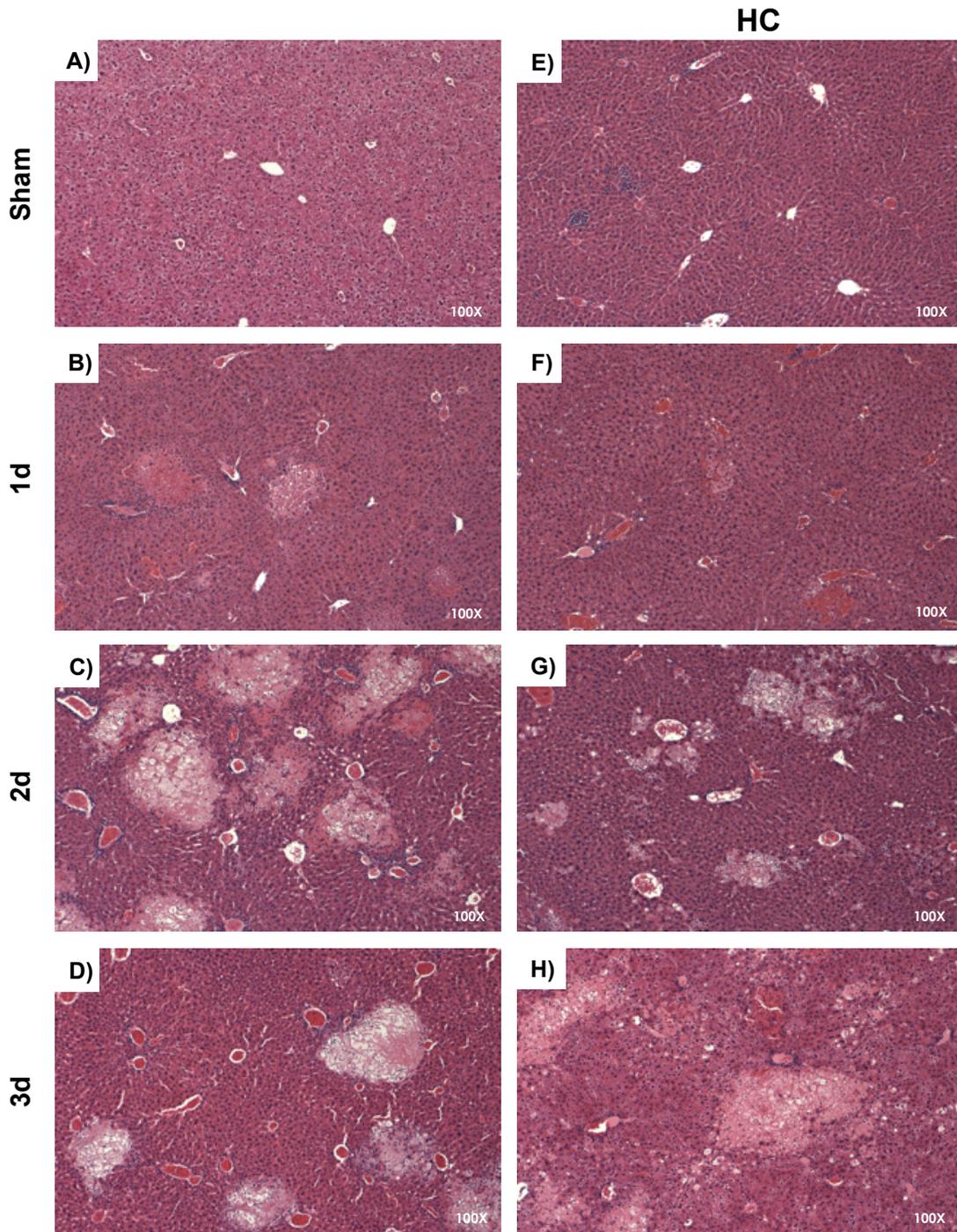


Figura R-12. La sobrecarga de colesterol exagera el daño hepático. Análisis histológico por una tinción de H&E. El tejido hepático se obtuvo de animales alimentados con la dieta control (Chow) ó la dieta alta en colesterol (HC) por 2 días, después se realiza la BDL y los ratones fueron sacrificados al día 1, 2 o 3. Imágenes representativas de al menos cuatro animales diferentes. Aumento original 100 X.

Con el fin de verificar que los mismos hallazgos son consistentes con la sobrecarga de colesterol en el hígado, se realizó el mismo proceso en ratones transgénicos SREBP2, que sobre producen colesterol en el hígado debido a la sobreactivación de este factor de transcripción que impulsa la expresión de muchas enzimas relacionadas con la biosíntesis de colesterol (26). La BDL no indujo cambios macroscópicamente en el hígado de los animales SREBP2 (Tg) comparados con los WT (Fig. R-13), sin embargo el contenido de colesterol fue considerablemente elevado en los ratones Tg como consecuencia de la BDL (Fig. R-13)

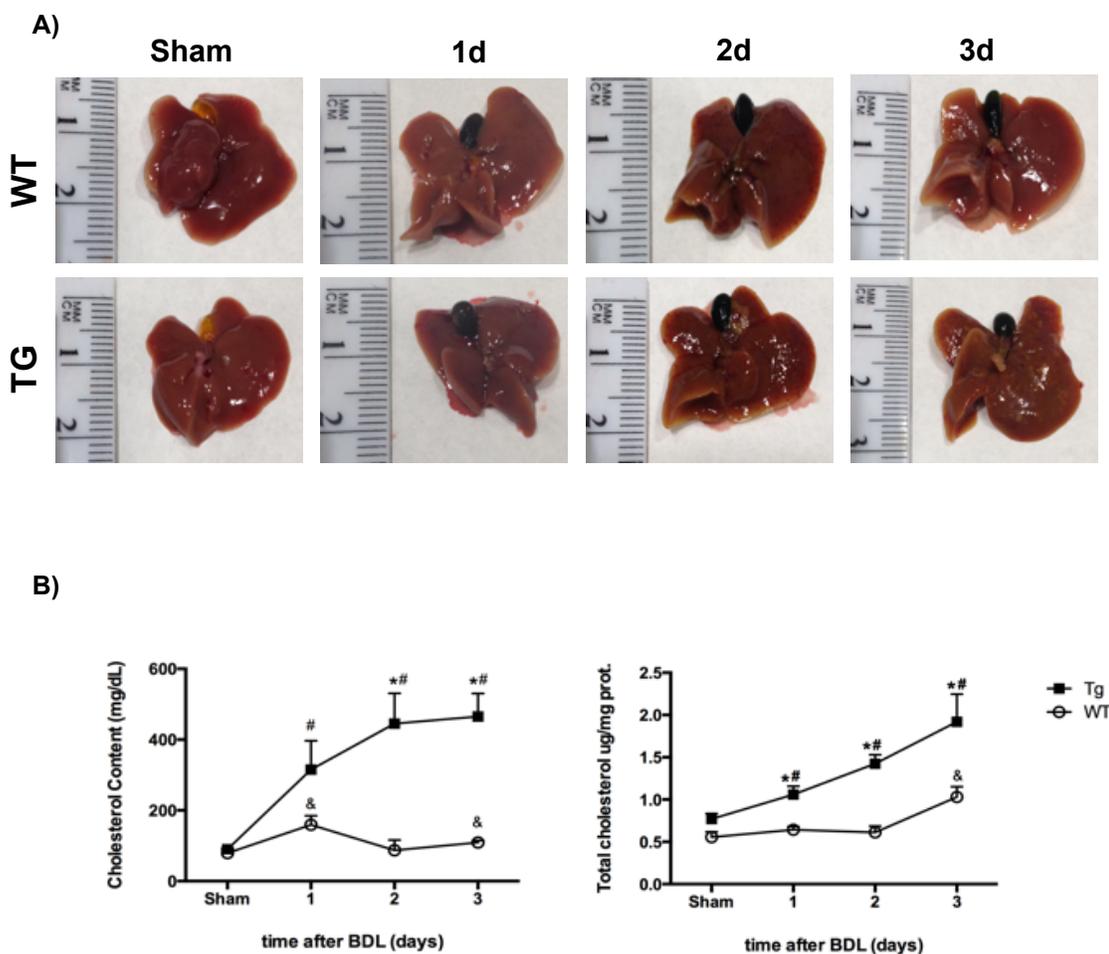


Figura R-13. La ligadura del conducto biliar exacerba el daño hepático en ratones transgénicos SREBP2. A) Inspección macroscópica del hígado. Dieta control (Chow), dieta alta en colesterol (HC). B) Determinación bioquímica del contenido de colesterol total y triglicéridos (TG).

La AST, ALT y ALP se elevaron en el día 2 después de la BDL, al día tres los valores de AST y ALT fueron similares a los de los ratones WT, sin embargo la ALP

se mantuvo elevada (Fig.R-14).

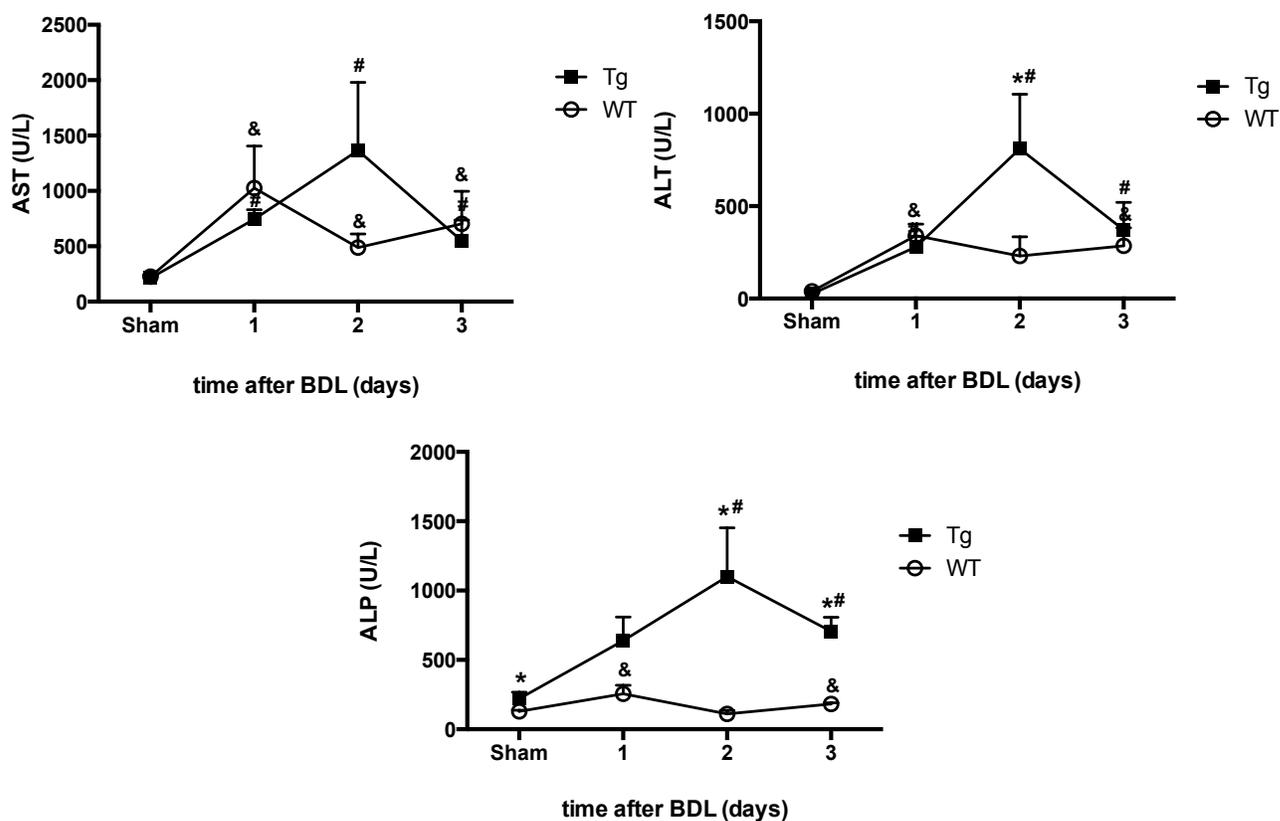


Figura R-14. La ligadura del conducto biliar exacerba el daño hepático en ratones transgénicos SREBP2. Pruebas de función hepática aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP). Cada punto representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a * $p \leq 0,01$ vs Chow, y $p \leq 0,01$ vs animales Chow bajo la BDL en el tiempo.

El análisis histológico fue similar al modelo de la dieta HC, los ratones Tg mostraron importantes puentes en las áreas de necrosis hepática en comparación con los ratones WT (Fig. R-15).

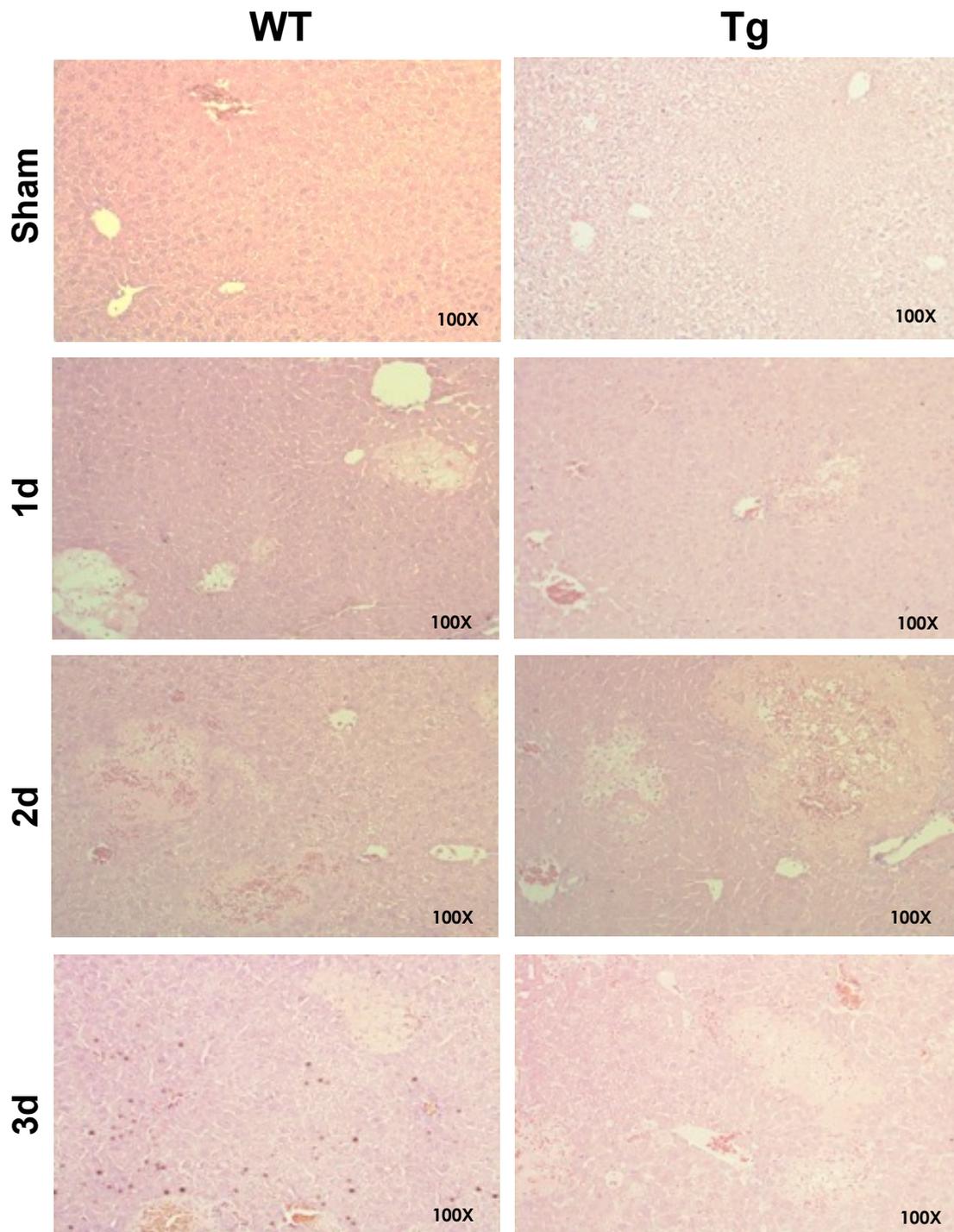


Figura R-15. La ligadura del conducto biliar exagera el daño hepático en ratones transgénicos SREBP2. Análisis de Histología por tinción de H&E. El tejido hepático se obtuvo a partir de animales alimentados con la dieta Chow o HC durante 2 días, después que se realizó la BDL, los ratones fueron sacrificados a 1, 2 o 3 días. Imágenes representativas de al menos cuatro animales diferentes. Aumento original 100 X.

Con el fin de verificar que la proliferación estaba involucrada en el proceso de reparación observada al día tres en los animales Chow, se realizó la tinción de Ki67 en las muestras de ambos grupos de ratones al tercer día. La figura R-16 muestra claramente más células positivas para Ki67 en el tejido Chow (Fig. R-16B) que el HC (Fig. R-16D).

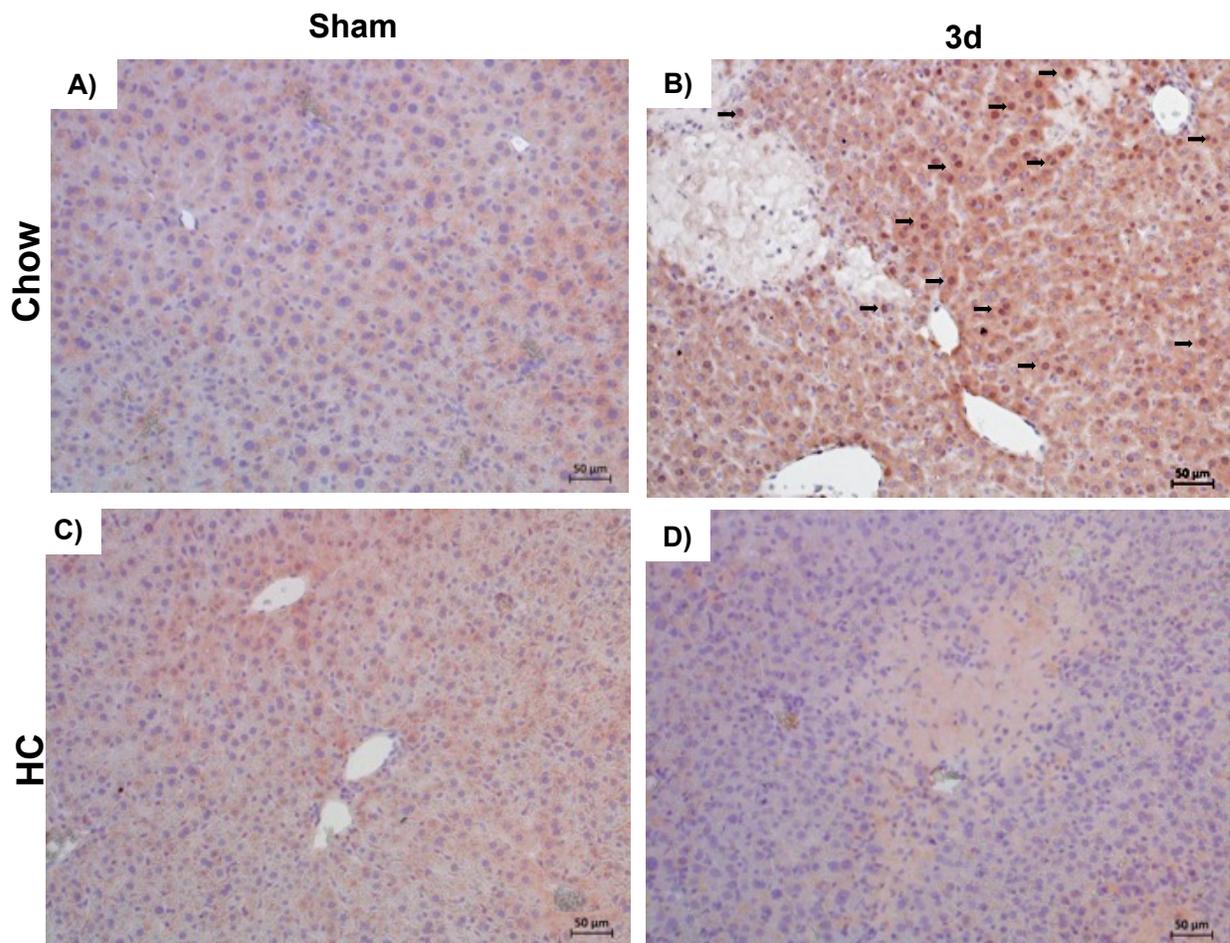


Figura R-16. El exceso de colesterol afecta la proliferación celular. El tejido se obtiene a partir de ratones Sham y de tres días después de la BDL, A-B) dieta control (Chow) o, CD) dieta alta en colesterol (HC). Se ensayó la inmunohistoquímica de Ki67; las flechas muestran células positivas (aumento a 100X).

Los resultados concuerdan con las principales proteínas del ciclo celular las cuales se midieron por Western blot, la ciclina D1, A y cdk2 y 4 mostraron una expresión sostenida de una manera dependiente al tiempo en los animales Chow, pero todas ellas se redujeron en los ratones HC, sobre todo al tercer día. Las proteínas inhibidoras del ciclo celular, tales como p27 y p21, se redujeron en los animales HC (Fig. R-17).

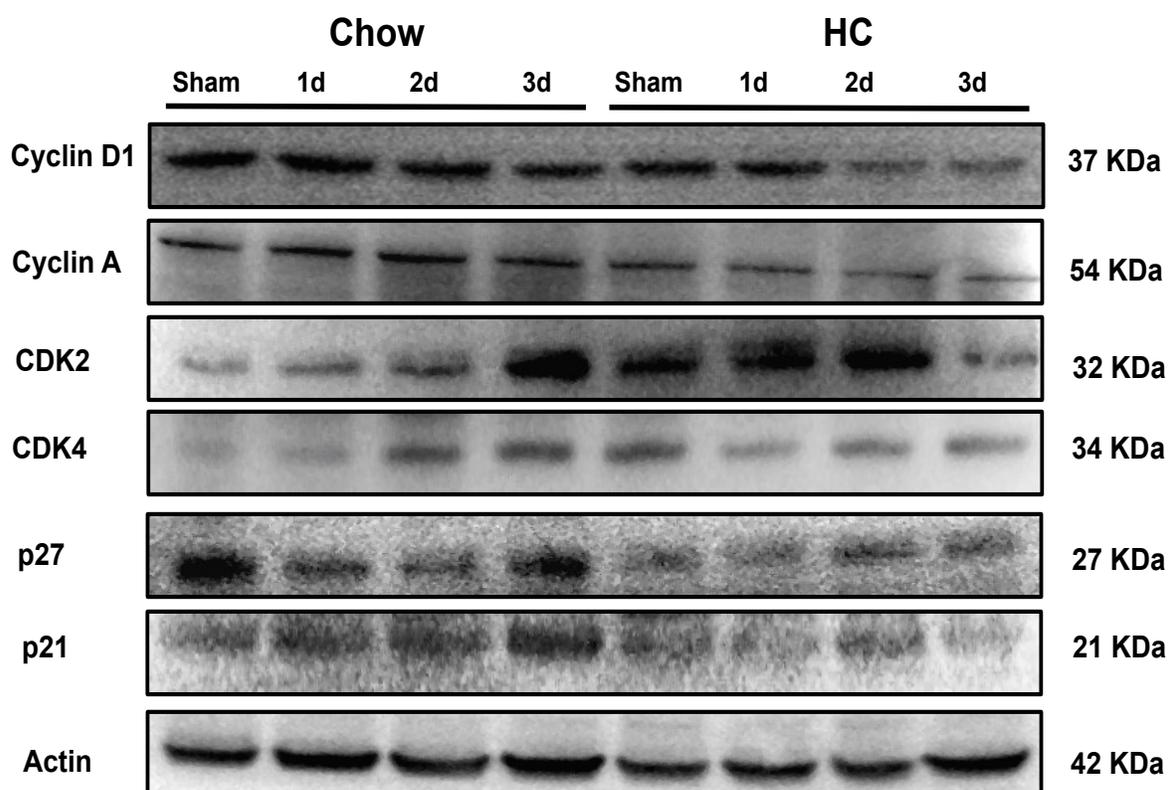


Figura R-17. El exceso de colesterol afecta la proliferación celular. E) análisis por Western blot de las principales proteínas del ciclo celular. La actina se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos cuatro ratones independientes.

3. La BDL induce apoptosis y estrés oxidante en ratones alimentados con la dieta HC

Posteriormente se evaluó la apoptosis; debido a que es bien conocido que las

sales biliares inducen apoptosis en hepatocitos (27, 28). La Figura R-18 muestra claramente que los ratones HC sometidos a la cirugía BDL presentan más células apoptóticas, medidas por TUNEL (Fig. R-18D), que los animales Chow (Fig. R-18B) al tercer día de tratamiento. La cuantificación de las células apoptóticas reveló un incremento significativo en las células positivas en los animales HC al tercer día.

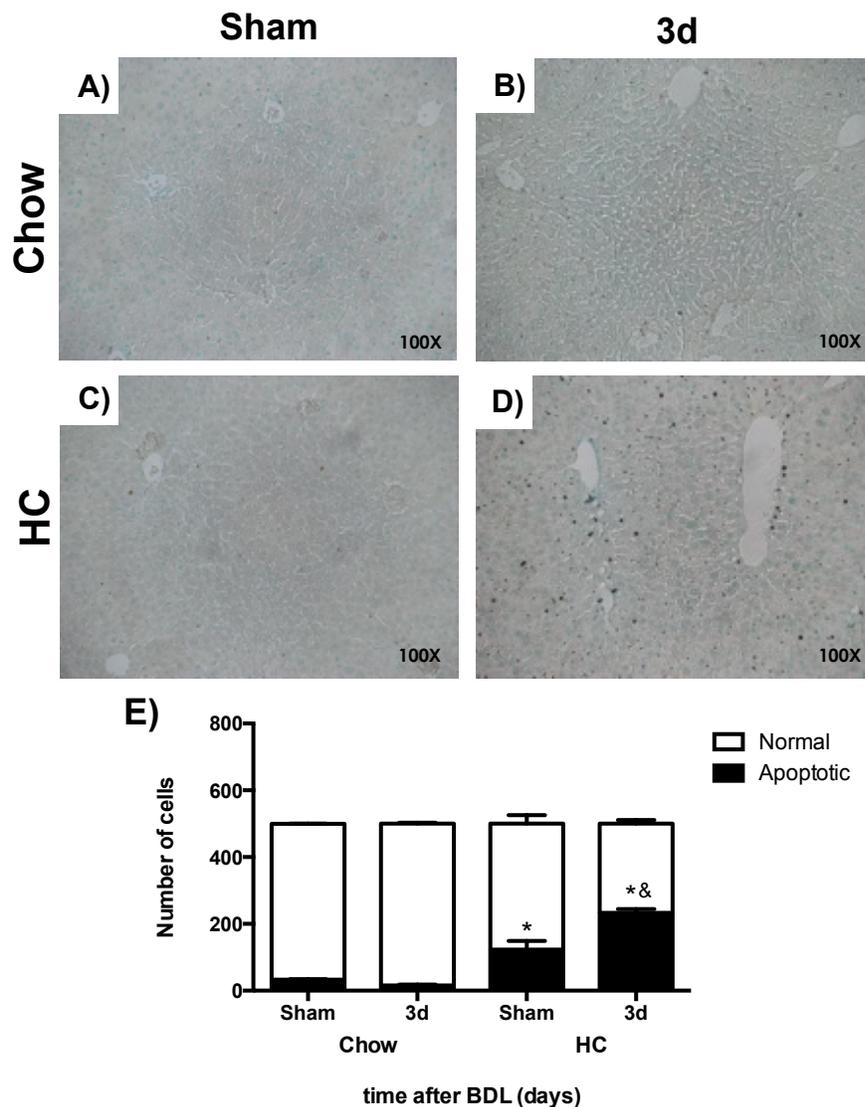


Figura R-18. La BDL en ratones alimentados con la dieta HC aumenta la apoptosis. El tejido se obtuvo a partir de animales Sham y de animales de tres días después la BDL, bajo A-B) dieta control (Chow) o, C-D) dieta alta en colesterol (HC) y la apoptosis fue ensayada

por inmunohistoquímica de TUNEL; E) la cuantificación de células TUNEL positivas. Aumento original de 100X . * p <0,01 vs ratones alimentados con la dieta Chow, ratones & P <0,01 vs 3 días alimentados con la dieta Chow, y # p <0,01 vs ratones alimentados con la dieta HC.

Estos datos fueron corroborados mediante la medición de actividad de caspasa 3 (Fig. R-19A), y las principales proteínas apoptóticas por Western blot (Fig. R-19B), estos resultados muestran que hay cambios en Bcl2 en los animales Chow, disminuyendo el contenido de la proteína antiapoptótica en el primer y segundo día después de la cirugía, incrementándose al tercer día, en contraste los ratones HC no exhiben ningún cambio en Bcl2 o BclxL, sin embargo aumenta Mcl-1 de una manera dependiente al tiempo en los animales Chow, efecto que es contrario en los ratones HC, donde el contenido de Mcl-1 disminuye a lo largo del tiempo. En el caso de Bax, los animales Chow muestran un incremento tiempo dependiente, resultado no observado en los HC donde Bax no cambió hasta el día tres (3 veces con respecto a HC Sham) coincidiendo con la abrogación de Mcl-1 y la muerte de los ratones.

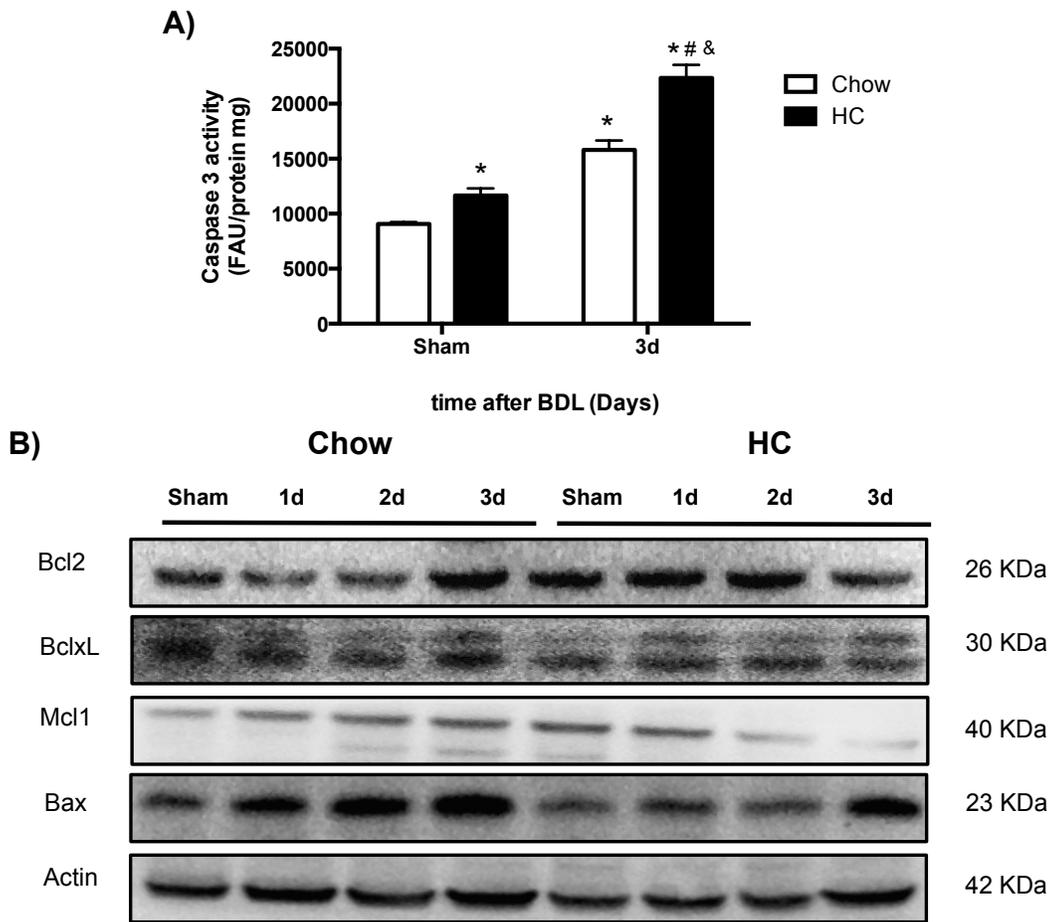


Figura R-19. BDL in HC fed mice increases apoptosis. El tejido se obtuvo a partir de animales Sham y de animales de tres días después la BDL, A) actividad de caspasa 3. G) Western blot de las principales proteínas relacionadas con la apoptosis. La actina se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos cuatro ratones independientes. * $p < 0,01$ vs ratones alimentados con la dieta Chow, ratones & $P < 0,01$ vs 3 días alimentados con la dieta Chow, y # $p < 0,01$ vs ratones alimentados con la dieta HC.

4. La BDL en los ratones alimentados con la dieta HC exacerba el estrés oxidante

El estrés oxidante es uno de los principales mediadores de daño hepático, como hemos abordado (29, 30), medimos el contenido de peróxidos in situ por DCFH y el anión superóxido por DHE, como reportamos anteriormente (31). La figura R-20 muestra que tanto, peróxidos como el anión superóxido se incrementan en los

animales HC a los 3 días de tratamiento cuando se comparan con los animales Chow.

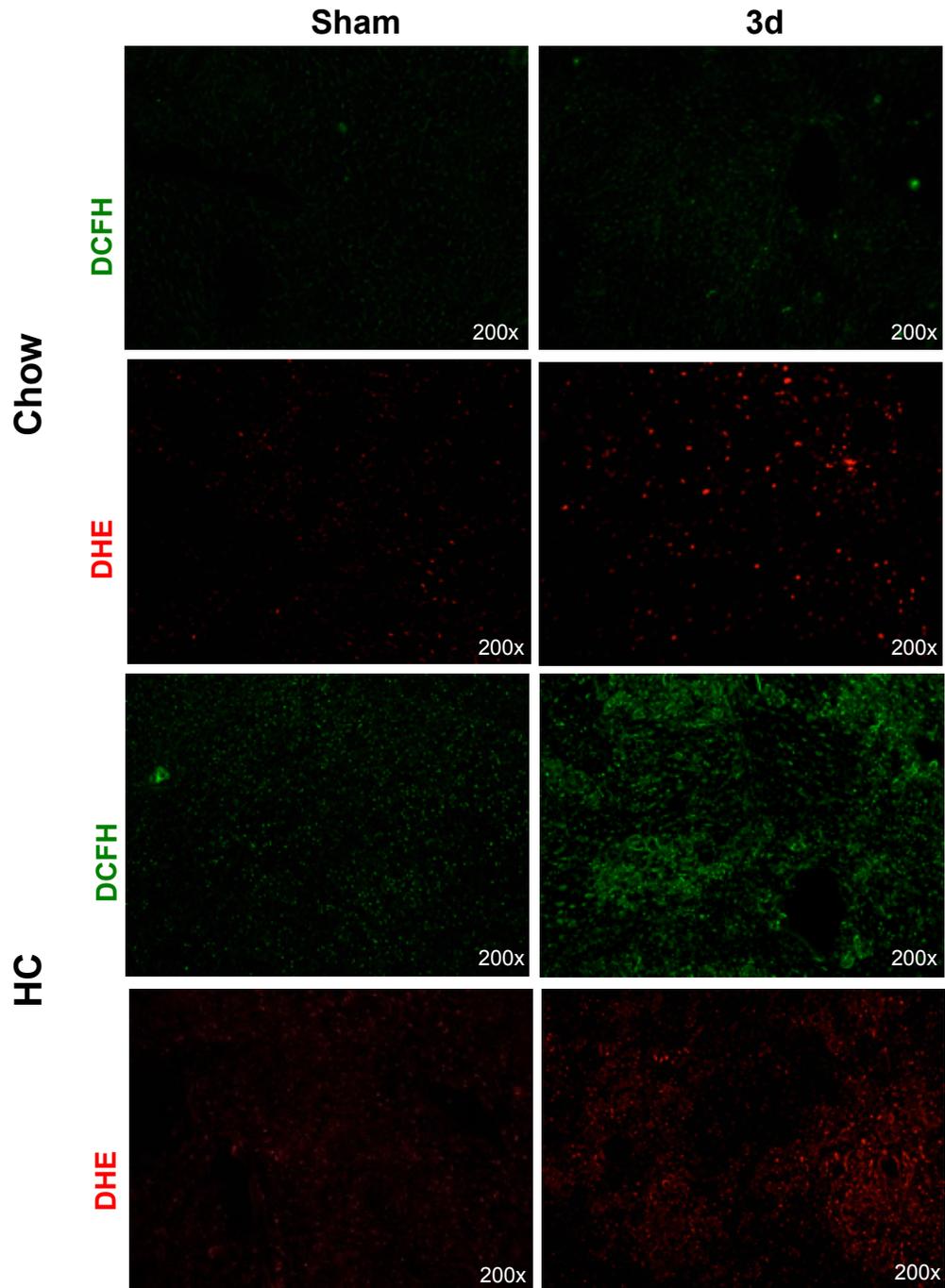


Figura R-20. La dieta HC aumenta el estrés oxidante en ratones con BDL. Contenido de ROS determinado en secciones de hígado fresco. El contenido de peróxidos fue ensayado

por DCFH (5 mM) durante 30 min, y el contenido de superóxido se determinó por DHE (50 M) durante 30 min. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Aumento original de 200X.

Estos resultados están de acuerdo con la disminución en el glutatión (Fig. R-21), de hecho el GSH se redujo como resultado de la dieta HC y continuó disminuyendo a lo largo del tiempo del estudio, sin embargo los animales chow disminuyeron el contenido de GSH al primer día de tratamiento, aumentando al segundo día, alcanzando su punto máximo en el tercer día.

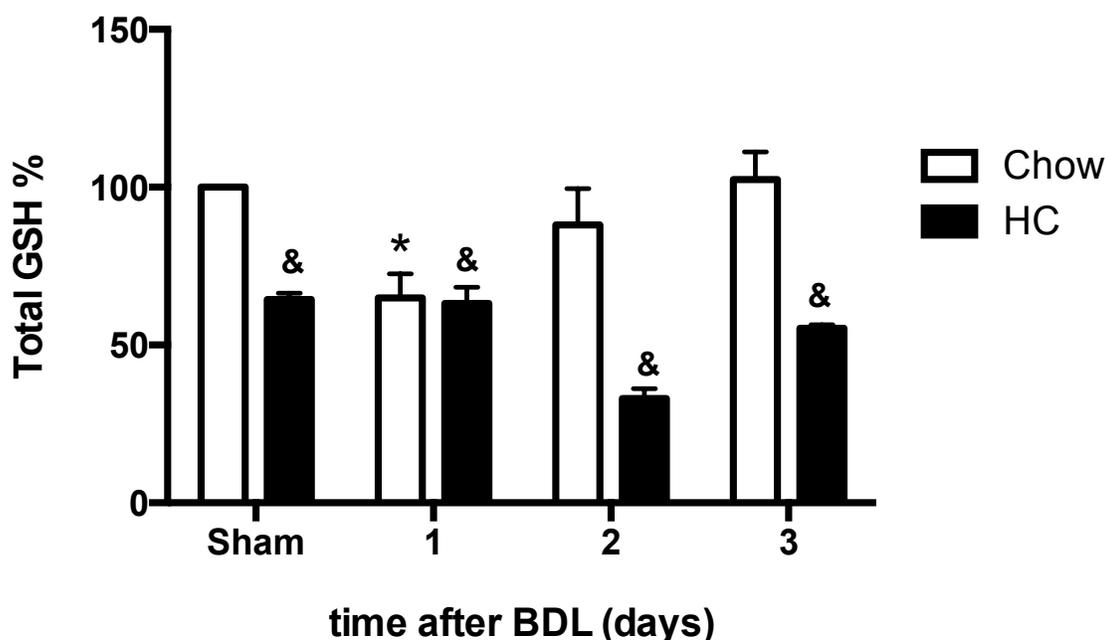


Figura R-21. La dieta HC disminuye el contenido de GSH en ratones con BDL. El contenido de GSH se determinó por HPLC. Las diferencias se consideraron significativas a * $p \leq 0,01$ vs animales Sham Chow, & $p \leq 0,01$ vs animales Chow en el tiempo.

El análisis de las principales enzimas antioxidantes (Fig. R-22A) reveló una inducción de γ GCS y GPX-4 en los animales Chow a los días dos y tres, efecto que no se observó en los animales HC, sin embargo, una ligera compensación se encontró en GPX1/2. GST exhibió un incremento dependiente al tiempo en los

animales Chow, con efecto opuesto en ratones HC. Otras enzimas antioxidantes como SOD1, SOD2, HO1 y NQO1, mostraron un incremento en los ratones Chow, no así en los animales HC.

Con el fin de averiguar la disminución del mecanismo de las proteínas antioxidantes, se realizó el ensayo de la activación de NF- κ B por el análisis de EMSA, la figura R-22B muestra la activación del factor de transcripción en los animales Chow en el día 1 disminuyendo en los siguientes días, los animales HC mostraron una activación fuerte en los días 1 y 2, disminuyendo considerablemente al día 3, como ocurre con las principales proteínas antioxidantes, en consonancia con el momento de la muerte de los ratones de HC.

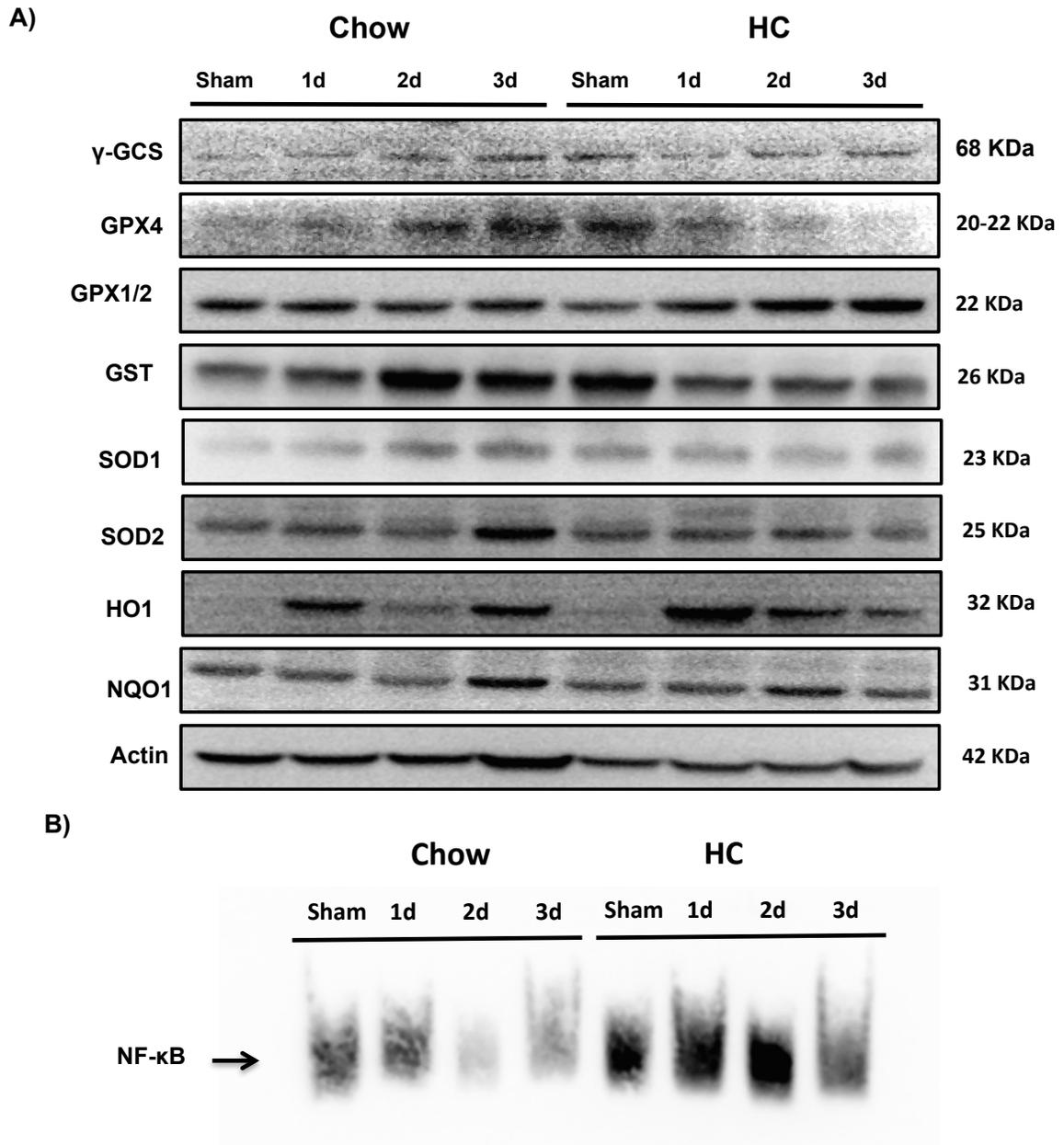


Figura R-22. La dieta HC disminuye la capacidad antioxidante en ratones con BDL. A) Western blot de las principales proteínas relacionadas con el estrés oxidante. La actina se utilizó como control de carga. B) Análisis de NF- κ B por EMSA. Cada columna representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Se sabe que la lesión hepática debida a la obstrucción del conducto biliar conduce a la colestasis; entre las principales causas se encuentran la obstrucción con cálculos biliares, atresia biliar, y la compresión por un tumor (32). Los ácidos biliares potencialmente tóxicos acumulados en el hígado, generan lesiones hepatocelulares. El mecanismo de daño es complejo pero se centra principalmente en tres componentes, los ácidos biliares por sí mismos, la generación de estrés oxidante y la inflamación (13, 32, 33).

Es bien sabido que los ácidos biliares surgen de la oxidación enzimática del colesterol, y que la hipercolesterolemia es uno de las claves distintivas en la NAFLD y la NASH, induciendo la sobrecarga de colesterol, en particular la forma no esterificada, en el hígado (34, 35). Regularmente el consumo de dietas enriquecidas en colesterol podría agravar la NAFLD, particularmente en individuos susceptibles relacionados a riesgo congénito o hábitos dietéticos deficientes (21, 22), en latinos es frecuente el consumo de alimentos con colesterol alto y esto podría explicar la alta prevalencia de hígado graso no alcohólico en esta población (23).

En este trabajo nos centramos en averiguar el papel de la sobrecarga de colesterol, inducido por la ingesta de una dieta alta en colesterol, en la colestasis generada por la ligadura del conducto biliar en ratones.

Los ratones sometidos a la dieta HC durante dos días mostraron un rápido fenotipo esteatósico con especial sobrecarga de lípidos en los hepatocitos (Fig. R-1 y R-2) y se relacionó con daño hepático juzgado por los valores de AST y ALT (Fig. R-3). Los ratones exhibieron un comportamiento normal sin signos de enfermedad. Aunque la dieta especial se complementó con 2% de colesterol, el contenido de TG

fue significativamente elevado en los hepatocitos, posiblemente como un mecanismo de compensación para manejar la sobrecarga de colesterol, sin embargo el colesterol libre está directamente relacionado con la sensibilización al daño, más que la acumulación de TG o FFA, según lo demostrado previamente (8).

Se ha asociado al colesterol con la progresión de la NAFLD a la NASH en ratones y seres humanos (34, 36, 37), aún más, se ha documentado que el colesterol libre en el tejido hepático se correlaciona con la gravedad histológica de la enfermedad (34, 38), y la fibrosis (39, 40), además, el presente trabajo está documentando una muerte prematura debido a la BDL en animales HC (Fig. R-4), en apoyo a los hallazgos anteriores donde colesterol puede inducir sensibilización al daño (8), en este caso la evidencia fue contundente con consecuencias fatales para los animales alimentados con la dieta.

Se sabe que el colesterol es un componente estructural esencial de las membranas celulares de mamíferos, estableciendo tanto la adecuada permeabilidad de la membrana como su fluidez. Las figuras 7 y 8 muestran claramente que la sobrecarga de colesterol exagera todos los marcadores de daño debido a la BDL, de hecho, la bilirrubina total y directa, así como los ácidos biliares totales en el suero aumentan considerablemente desde el primer día, sin embargo no es así en los animales Sham, dejando claro que esta respuesta es debido a procedimiento de cirugía, sin embargo, curiosamente, los TBA en el hígado se incrementaron como resultado de la dieta HC, sin variaciones significativas debido a la cirugía, mientras tanto los animales Chow mostraron un incremento en el curso de tiempo de los TBA

en hígado alcanzando valores similares a los observados en los animales HC en el día tres.

El efecto tóxico de los ácidos biliares está bien documentado (27, 41, 42), la acumulación en el hígado es uno de los principales factores asociados a la colestasis, algunos estudios dirigen la toxicidad diferencial entre las diversas formas de los ácidos biliares, y particularmente aquellos con residuos de aminoácidos conjugados tales como la taurina o la glicina han mostrado un aumento de la toxicidad debido a su alta solubilidad y propiedades biofísicas las cuales pueden cambiar la reorganización de las balsas lipídicas, afectando las vías de señalización de la apoptosis (41-43). Nuestros datos muestran que los animales HC presentaron un incremento importante y significativo en los ácidos biliares conjugados con glicina y taurina (Fig. R-9), además pueden inducir apoptosis (27), este hallazgo es particularmente relevante en los pacientes con NAFLD o NASH los cuales exhiben niveles elevados de ambos ácidos biliares conjugados[15]. Sin embargo después de la BDL, en los hígados de ratones Chow los ácidos biliares hepatotóxicos nunca alcanzaron concentraciones que podrían causar directamente la muerte celular, mientras que los animales HC si, desencadenando una respuesta inflamatoria exacerbada y la muerte celular causada por los neutrófilos a través de estrés oxidante (16). Por otro lado, el UDCA puede prevenir el daño hepático mediante la mejora del flujo biliar, el aumento de la solubilidad del colesterol, modificando la concentración de las sales biliares y fosfolípidos, también mediante la activación de diferentes vías de señalización tales como PI3K/AKT, la vía de las proteínas cinasas activadoras de mitógenos (MAPK), la vía de la proteína cinasa extracelular (ERK),

p38 y la cinasa amino terminal c-Jun, previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno y la liberación del citocromo c, por lo tanto, la permeabilidad mitocondrial y finalmente, la inhibición de la apoptosis (43) Sin embargo en nuestro estudio el UDCA se encuentra disminuido, por lo cual proteínas protectoras como Mcl-1 se encuentran inhibidas, incrementándose las especies reactivas de oxígeno y exacerbándose el daño.

El incremento de los ácidos biliares en el parénquima promueven la infiltración de células inflamatorias, lo que puede agravar el estrés oxidante y el daño tisular (12), sin embargo el contenido de colesterol incrementa este efecto, lo que representa un mecanismo fundamentalmente clave para la colestasis, como nuestros datos están indicando (Fig. R-11).

Los resultados muestran claramente que la sobrecarga de colesterol en el hígado potencia el daño del órgano, según la histología y marcadores sistémicos muestran, la muerte prematura sugiere fuertemente deterioro en la reparación del hígado. La inmunodetección de Ki67 reveló una proliferación prácticamente abrogada (Fig. R-16), sin embargo, el análisis por Western blot muestra que, molecularmente los hígados HC están tratando de responder reprimiendo el contenido de p21 y p27, pero cdk2 y las ciclinas D1 y A disminuyeron con el tiempo (Fig. R-17). Aunque algunos ácidos biliares inducen la regeneración del hígado, tales como el ácido obeticolico o el ácido quenodesoxicólico (OCA), mediante la activación del receptor farnesoide X (FXR) (44), en nuestro estudio se observó una producción exacerbada de todas las formas, incluyendo el OCA, en los animales HC, (Fig. R-9-11), con una clara asociación en la muerte celular (Fig. R-18). Está claro que el colesterol

antagoniza este efecto protector mediado por FXR, en apoyo con las publicaciones recientes del doctor Cheng y colaboradores donde dicen que los ratones transgénicos FXR exhiben un aumento en la sensibilidad a la hepatotoxicidad inducida por la dieta alta en colesterol (45), lo que sugiere que FXR es incapaz de promover la protección en el hígado, aún más, puede inducir efectos adversos.

La concentración aumentada de ácidos biliares en la colestasis provoca una respuesta tóxica induciendo apoptosis en los hepatocitos, lo cual contribuye a generar una lesión hepática. Se sabe que el aumento en la expresión de la proteína celular mieloide de leucemia-1 (Mcl-1, por sus siglas en inglés) juega un papel hepatoprotector en la colestasis, ya que protege a las células de la muerte celular, directamente inhibiendo la señalización de Ca^{2+} dentro de la mitocondria para evitar la liberación de citocromo c, deteniendo de este modo la vía de señalización intrínseca (46, 47). Los resultados de este estudio apoyan un papel importante para Mcl-1 en la modulación de la lesión hepática colestásica, dado que se observa un mayor daño en el hígado al verse disminuida esta proteína en los ratones alimentados con una dieta hipercolesterolémica (Fig. R-19), lo cual podría estar diciendo en parte el porqué de la muerte temprana de estos animales después de haberlos sometido a una BDL.

Varios reportes argumentan el papel del estrés oxidante inducido tanto por los ácidos biliares, como por el colesterol (7, 27, 33, 37), nuestros resultados confirman estas observaciones, aún más, el estrés oxidante está potenciado por ambos insultos, como se representa en la figura R-20. Uno de los principales mecanismos implicados en la toxicidad del colesterol es la generación de ROS, que se asocia a la

depleción de GSH mitocondrial (8), de hecho, nuestros datos apoyan que la mitocondria es la reguladora clave en el efecto perjudicial mediado por la BDL y el colesterol, la figura R-22 muestra una regulación a la baja en SOD2 y GPX4, dos de las principales enzimas protectoras mitocondriales (48, 49), el mismo efecto se observó en GST, y γ -GCS, los datos apoyan firmemente que el sistema de GSH es el mediador clave en la gestión de daño hepatocelular generado por el colesterol, los animales Chow exhiben el efecto contrario, incrementándose en el transcurso del estudio el contenido de GST, GPX4, SOD1, SOD2, NQO1, HO-1 y γ -GCS, relacionándose con un menor contenido de ROS y menos apoptosis (Fig. R-19 y R-22), a pesar de la fuerte activación de NF- κ B en los días uno y dos, pero fallando en el tercer día (Fig. R-22).

La sobrecarga de colesterol en el hígado demostró ser un aspecto que empeoró el daño hepatocelular debido a la enfermedad obstructiva del conducto biliar, ambos modelos hipercolesterolémicos, el dietético y el genético, exhibieron la sensibilización al daño, posicionando el contenido de colesterol como un determinante clave en la progresión y el agravamiento de la enfermedad hepática colestásica. Nuestros hallazgos sugieren que el exceso de colesterol en el hígado, debido a la NAFLD o NASH, deben ser tratados, en particular en personas predispuestas, con el fin de evitar complicaciones clínicas.

CONCLUSIÓN

En conclusión, podemos decir que en la colestasis obstructiva, el tipo de lípido (colesterol) y no la cantidad contribuye significativamente a la agravamiento de la enfermedad y a la disfunción hepática debido a la desregulación tanto de vías de reparación como de inflamación, así como del desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante, además de la sobreproducción de ácidos biliares hidrofóbicos generando apoptosis y necrosis en el hígado.

La comprensión de los mecanismos moleculares del colesterol en la colestasis puede ayudar a determinar el desarrollo de nuevas estrategias para el control de esta enfermedad en escenarios clínicos.

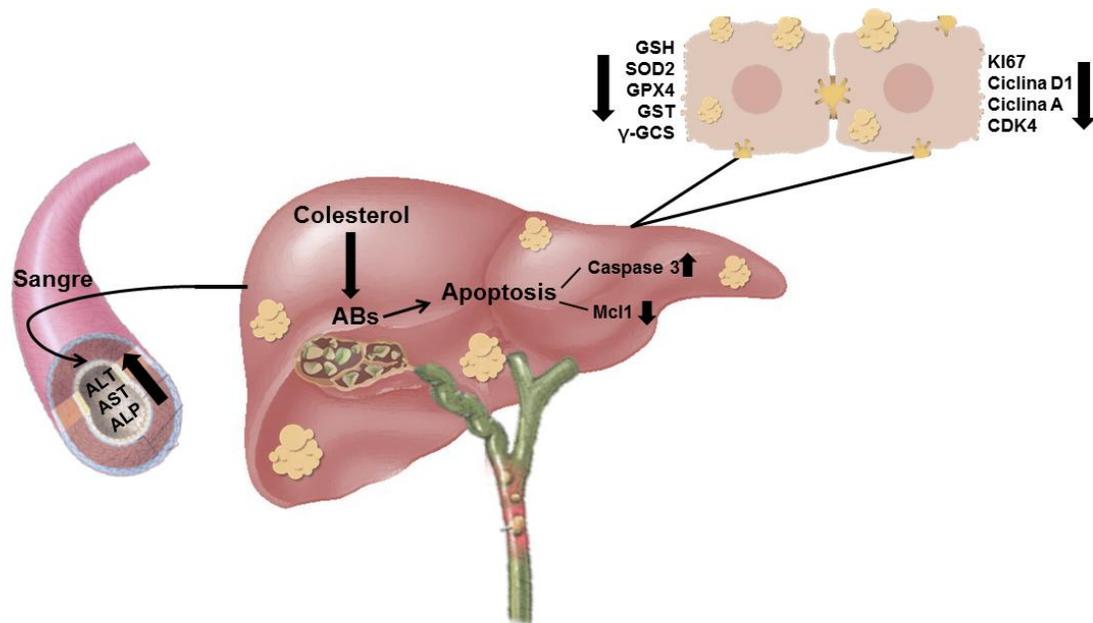


Figura C-1. Mecanismos moleculares de la sobrecarga de colesterol en la colestasis hepática.

REFERENCIAS

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67.
2. Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World journal of hepatology*. 2015;7(6):846-58.
3. Rodriguez-Hernandez H, Simental-Mendia LE, Rodriguez-Ramirez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:678159.
4. Perichart-Perera O, Balas-Nakash M, Rodriguez-Cano A, Munoz-Manrique C, Monge-Urrea A, Vadillo-Ortega F. Correlates of dietary energy sources with cardiovascular disease risk markers in Mexican school-age children. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010;110(2):253-60.
5. Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang XD. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *The Journal of nutrition*. 2008;138(10):1866-71.
6. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of a high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, focal nodular hyperplasia and fibrosis in non-obese mice. *The British journal of nutrition*. 2010;103(3):378-85.
7. Gutierrez Ruiz MC, Dominguez Perez M, Rodriguez Gonzalez S, Nuno Lambarri N, Licona Retama C, Gomez-Quiroz LE. [High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]. *Gaceta medica de Mexico*. 2012;148(3):236-42.
8. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism*. 2006;4(3):185-98.
9. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(9):1765-78.
10. Lin CJ, Lai CK, Kao MC, Wu LT, Lo UG, Lin LC, et al. Impact of cholesterol on disease progression. *BioMedicine*. 2015;5(2):7.
11. Chen Y, Kong J, Wu S. Cholesterol gallstone disease: focusing on the role of gallbladder. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2015;95(2):124-31.
12. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *The American journal of pathology*. 2011;178(1):175-86.
13. Roma MG, Sanchez Pozzi EJ. Oxidative stress: a radical way to stop making bile. *Annals of hepatology*. 2008;7(1):16-33.
14. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60(11):3318-28.

15. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2015.
16. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(36):4985-93.
17. Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2010;22(6):651-61.
18. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996;85(6):803-15.
19. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996;85(6):817-27.
20. Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays in biochemistry*. 2003;39:25-40.
21. Yasutake K, Kohjima M, Kotoh K, Nakashima M, Nakamuta M, Enjoji M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1756-67.
22. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1081-90.
23. Kallwitz ER, Daviglius ML, Allison MA, Emory KT, Zhao L, Kuniholm MH, et al. Prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease in Hispanic/Latino individuals differs by heritage. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(3):569-76.
24. Nytofte NS, Serrano MA, Monte MJ, Gonzalez-Sanchez E, Tumer Z, Ladefoged K, et al. A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *Journal of medical genetics*. 2011;48(4):219-25.
25. Garcia-Rodriguez JL, Barbier-Torres L, Fernandez-Alvarez S, Gutierrez-de Juan V, Monte MJ, Halilbasic E, et al. SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology*. 2014;59(5):1972-83.
26. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86(11):839-48.
27. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology*. 2005;129(6):2009-31.
28. Webster CR, Johnston AN, Anwer MS. Protein kinase Cdelta protects against bile acid apoptosis by suppressing proapoptotic JNK and BIM pathways in human and rat hepatocytes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014;307(12):G1207-15.
29. Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(4):424-30.

30. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, et al. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer research*. 2007;67(20):9844-51.
31. Enriquez-Cortina C, Almonte-Becerril M, Clavijo-Cornejo D, Palestino-Dominguez M, Bello-Monroy O, Nuno N, et al. Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2013;135(1):26-36.
32. Hofmann AF. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options. *Liver*. 2002;22 Suppl 2:14-9.
33. Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(2):195-204.
34. Caballero F, Fernandez A, De Lacy AM, Fernandez-Checa JC, Caballeria J, Garcia-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol*. 2009;50(4):789-96.
35. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):175-91.
36. Ganz M, Bukong TN, Csak T, Saha B, Park JK, Ambade A, et al. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med*. 2015;13:193.
37. Bashiri A, Tavallaee G, Li L, Ng DS. Emerging role of cellular cholesterol in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in lipidology*. 2013;24(3):275-6.
38. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2012;15(5):665-74.
39. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2014;59(1):154-69.
40. Van Rooyen DM, Gan LT, Yeh MM, Haigh WG, Larter CZ, Ioannou G, et al. Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2013;59(1):144-52.
41. Woolbright BL, Dorko K, Antoine DJ, Clarke JI, Gholami P, Li F, et al. Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;283(3):168-77.
42. Chatterjee S, Bijsmans IT, van Mil SW, Augustijns P, Annaert P. Toxicity and intracellular accumulation of bile acids in sandwich-cultured rat hepatocytes: role of glycine conjugates. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2014;28(2):218-30.
43. Nuno-Lambarri N, Barbero-Becerra VJ, Uribe M, Chavez-Tapia NC. Elevated cholesterol levels have a poor prognosis in a cholestasis scenario. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2016.

44. Ding L, Yang Y, Qu Y, Yang T, Wang K, Liu W, et al. Bile acid promotes liver regeneration via farnesoid X receptor signaling pathways in rats. *Molecular medicine reports*. 2015;11(6):4431-7.
45. Cheng Q, Inaba Y, Lu P, Xu M, He J, Zhao Y, et al. Chronic activation of FXR in transgenic mice caused perinatal toxicity and sensitized mice to cholesterol toxicity. *Molecular endocrinology*. 2015;29(4):571-82.
46. Beilke LD, Aleksunes LM, Olson ER, Besselsen DG, Klaassen CD, Dvorak K, et al. Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Toxicology letters*. 2009;188(1):38-44.
47. Kahraman A, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, Barreyro FJ, Guicciardi ME, et al. Overexpression of mcl-1 attenuates liver injury and fibrosis in the bile duct-ligated mouse. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(9):1908-17.
48. Cole-Ezea P, Swan D, Shanley D, Hesketh J. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(3):488-97.
49. Clavijo-Cornejo D, Gutierrez-Carrera M, Palestino-Dominguez M, Dominguez-Perez M, Nuno N, Souza V, et al. Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014;69:102-8.

ARTICULO PRODUCTO DE LA PRESENTE TESIS