



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“RESPUESTA DE LAS INTERACCIONES REDOX SENSIBLES DE LA
NUCLEORREDOXINA ANTE EL ESTRÉS OXIDANTE PRODUCIDO POR LA
ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN EL
HÍGADO DEL RATÓN”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

QUE PRESENTA

M. B. E. OSIRIS GERMÁN IDELFONSO GARCÍA

MATRICULA: 2191800078, CORREO:bio.exp.ger.idel@gmail.com

ORCID: 0000-0002-5627-5164

CO-DIRECTOR: DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO

CO-DIRECTOR: DR. HÉCTOR FERNANDO SERRANO

JURADO

PRESIDENTA: DRA. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ GUERRERO

SECRETARIO: DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

VOCAL: DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE

VOCAL: DR. GERARDO BLANCAS FLORES

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, A 6 DE MAYO DE 2024

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. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 431419

MIEMBROS DEL JURADO

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL FORMATO DE SOLICITUD - JURADO DE EXAMEN DE GRADO

NIVEL: DOCTORADO

FECHA: 18 de abril del 2024.

Por este conducto, se hace constar que hemos leído y aprobado el manuscrito de tesis, que se anexa, del alumno Osiris Germán Idelfonso García, (Matrícula:2191800078). Por lo anterior, emitimos nuestra autorización para que se inicien los trámites para la obtención del grado correspondiente y proponemos a los siguientes especialistas en la línea de investigación de la tesis para que funjan como Jurado en el examen de grado.

Título de la tesis: "Respuesta de las interacciones redox sensibles de la nucleorredoxina ante el estrés oxidante producido por la enfermedad hepática alcohólica durante el envejecimiento en el hígado del ratón".

Fecha probable de examen: 06 de mayo de 2024.

Solicite con anticipación, si lo requiere, videoproector, computadora y laser: Si.

Jurado propuesto:

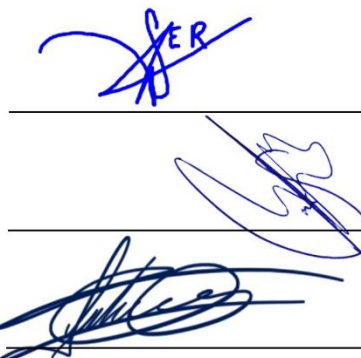
- 1.- Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero. Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- 2.- Dr. Julio Isael Pérez Carreón. Laboratorio de Enfermedades Hepáticas. Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.
- 3.- Dr. Pablo Muriel. Laboratorio de Hepatología Experimental. Departamento de Farmacología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN
- 4.- Dra. María Angélica Gutiérrez Nava. Laboratorio de Ecología Microbiana. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
- 5.- Dr. Gerardo Blancas Flores. Laboratorio de Farmacología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Comité de tutores:

Dr. Héctor Fernando Serrano.
Laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Dr. Jaime Arellanes Robledo.
Laboratorio de Enfermedades Hepáticas. Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.

Dr. Julio Isael Pérez Carreón.
Laboratorio de Enfermedades Hepáticas. Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.



MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

Co-director: Dr. Héctor Fernando Serrano.

Laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Co-director: Dr. Jaime Arellanes Robledo.

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas. Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.

Asesor: Dr. Julio Isael Pérez Carreón.

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas. Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa que me ha exigido tanto, pero al mismo tiempo me ha permitido obtener mi tan ansiado título. Agradezco a cada coordinador por su trabajo y por su gestión, sin lo cual no estarían las bases ni las condiciones para desarrollarme profesionalmente. A mi asesor el Dr. Héctor Fernando Serrano que me brindo el soporte y apoyo dentro de la Universidad.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) que me permitió desarrollar la parte experimental de este proyecto en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas bajo la dirección del Dr. Jaime Arellanes Robledo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías – CONAHCYT, por el apoyo económico a través de la beca de doctorado No. 431419, aprobado a la sustentante durante el periodo 2019-2023.

Este proyecto se desarrolló con el financiamiento de Ciencia de Frontera 2019, No. 53358 (CF2019-53358), aprobado y otorgado por el CONAHCYT, y con el financiamiento No. 06-2017-I aprobado y otorgado por el INMEGEN; ambos financiamientos fueron otorgados al Dr. Jaime Arellanes Robledo. También contó con el apoyo en especie No. 0114-14 aprobado y otorgado por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio – UPEAL, del CINVESTAV-IPN, al Dr. Emérito Saúl Villa Treviño.

AGRADECIMIENTOS

A la QFB. Norma Arely López Hernández por su apoyo y trabajo realizado en conjunto, del Laboratorio de Enfermedades Hepáticas-INMEGEN. Al técnico Ricardo Nava Monroy de la Unidad de Histología del INMEGEN, por la asistencia prestada.

A los QFB. Sergio Hernández García y Eunice Romo Medina, y a los técnicos Alejandro Cruz Hernández, Víctor Manuel Ortiz Santiago y a la Dra. María Asunción Cabañas Cortes por su apoyo y asistencia técnica, y a la secretaria Clara Hernández Chávez por su apoyo administrativo, del laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Al personal del UPEAL-CINVESTAV-IPN, el Dr. Jorge Fernández Hernández, a los MVZ. Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno, Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez, Alberto Rojo García y María Antonieta López López, y a las asistentes Irma Zavala Mejía y María Esther Zúñiga Alcántara, por su apoyo en el manejo y cuidado de los animales de experimentación y por su apoyo administrativo.

ABREVIATURAS

ABC, Ácido bicinconínico; **APS**, Persulfato de amonio; **ASB**, Albúmina de suero bovino; **ATM**, Ataxia telangiectasia mutada; **BC**, Buffer de corrida; **BT**, Buffer de transferencia; **C**, Control; **CAT**, Catalasa; **CD**, Dinámica del citoesqueleto; **CDK**, Quinasa dependiente de ciclina; **CEH**, Células estelares hepáticas; **CES**, Células de endoteliales sinusoidales; **CHC**, Carcinoma hepatocelular; **CK**, Células de Kupffer; **DDR**, Respuesta de daño al ADN; **DNAm**, ADN mitocondrial; **DSB**, Roturas de doble cadena; **EHA**, Enfermedad hepática alcohólica; **ERO**, Especies reactivas de oxígeno; **GCSM**, Estado metabólico celular global; **GSH**, Glutación; **H&E**, Hematoxilina y eosina; **H₂O₂**, Peróxido de hidrógeno; **HO₂[•]**, Radical perhidroxilo; **HRP**, Peroxidasa de rábano; **IF**, Inmunofluorescencia; **IHQ**, Inmunohistoquímica; **IP**, Inmunoprecipitación; **LPS**, Lipopolisacárido; **MEC**, Matriz extracelular; **miR**, micro RNA; **NADPH**, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **ncRNA**, RNA no codificante; **O₂**, Oxígeno molecular; **O₂^{•-}**, Anión superóxido; **OH[•]**, Radical hidroxilo; **PBS**, Buffer de fosfato salino; **PVDF**, Polifluoruro de vinilideno; **RB**, Retinoblastoma; **RE**, Retículo endoplásmico; **Redox**, Óxido-reducción; **SAFH**, Focos de heterocromatina asociados a la senescencia; **SASP**, Fenotipo secretor asociado a Senescencia; **SDS**, Dodecilsulfato sódico; **SOD**, Superóxido dismutasa; **TBS**, Tris buffer salino; **TEMED**, Tetrametiletilendiamina; **TRX**, Tiorredoxina; **VHB**, Virus de la hepatitis tipo B; **VHC**, Virus de la hepatitis tipo C; **WB**, Western blot; **WH**, Cicatrización de heridas.

SÍMBOLOS

ADH, Alcohol deshidrogenasa; **ALDH2**, Aldehído deshidrogenasa 2; **AMPK**, Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina; **ATP**, Trifosfato de adenosina; **ATR**, Proteínas quinasas relacionadas con RAD3; **CAMK2A**, Proteína quinasa II alfa dependiente de calcio/calmodulina; **CDK**, Quinasa dependiente de ciclina; **CK19**, Citoqueratina-19; **CK1 α** , Caseína cinasa 1 α ; **COL1A1**, Colágeno 1 alfa 1; **COL3A1**, Colágeno 3 alfa 1; **CXCL7**, Ligando 7 de quimiocina; **CYP2E1**, Citocromo P450-2E1; **DVL**, Dishevelled; **EGR-1**, Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1; **FGF**, Factor de crecimiento de fibroblastos; **FLII**, Flightless-I; **FOXO**, Caja O de Forkhead; **GAPDH**, Glutaraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; **GSK3 β** , Glucógeno sintasa cinasa 3 β ; **GSTP1**, Glutathión S transferasa pi 1; **HGF**, Factor de crecimiento humano; **HSP**, Proteína de choque térmico; **IL**, Inteleucina; **IRE1**, Quinasa transmembrana/endoribonucleasa 1; **MAPK**, Proteínas quinasas activadas por mitógenos; **MCP**, Proteína quimioatrayente de monocitos; **MMP**, Metaloproteinasas de matriz; **mTOR**, Diana de rapamicina en células de mamífero; **MYD88**, Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide; **NAD**, Nicotinamida adenina dinucleótido; **NADPH**, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **NF- $\kappa\beta$** , Factor nuclear $\kappa\beta$; **NRF2**, Factor nuclear eritroide similar al factor 2; **NXN**, Nucleorredoxina; **PAI-1**, Inhibidor del activador del plasminógeno-1; **PAR**, Poly ADP-ribosa; **PARP**, Poly ADP-ribosa polimerasa; **PCNA**, Antígeno nuclear de células en proliferación; **PFK-1**, Fosfofructoquinasa-1; **PGC-1 α** , Coactivador del receptor gamma 1 alfa; **pH2A.X**, Fosfo-histona H2A.X; **PI3K**, Fosfoinositol 3-quinasa; **PI4P**, Fosfatidilinositol 4-fosfato; **PKB**, Proteína quinasa B; **PNPLA3**, Proteína 3 que contiene dominio fosfolipasa similar a patatina; **PP2A**, Proteína

fosfatasa-2A; **pRB**, Proteína del gen del retinoblastoma; **PTGR1**, Prostaglandina reductasa-1; **SIRT**, Sirtuina; **TGF- β** , Factor de crecimiento transformante β ; **TIGAR**, Glucólisis inducido por TP53; **TLR4**, Receptores tipo Toll 4; **TNF- α** , Factor de necrosis tumoral α ; **UPR**, Respuesta a proteínas desplegadas; **VEGF**, Factor de crecimiento endotelial vascular; **Wnt**, Wingless.

CONTENIDO

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Envejecimiento	5
2.2 Características del envejecimiento en el hígado	5
2.2.1 Inestabilidad genómica.....	7
2.2.2 Desgaste de los telómeros	7
2.2.3 Alteraciones epigenéticas.....	8
2.2.4 Pérdida de la proteostasis	9
2.2.5 Detección de nutrientes desregulada	9
2.2.6 Disfunción mitocondrial	10
2.2.7 Agotamiento de las células madre	11
2.2.8 Comunicación intercelular alterada	12
2.2.9 Senescencia celular	13
2.3 El envejecimiento se acelera por el consumo de etanol.....	15
2.4 Patogénesis de la EHA.....	16
2.5 Estrés oxidante.....	20
2.6 Senescencia celular: impacto del estrés oxidante	22
2.7 Senescencia celular en el hígado.....	23
2.8 Mecanismos de protección y respuesta antioxidante	25
2.9 NXN.....	27
3 JUSTIFICACIÓN	33
4 HIPOTESIS	34
5 OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general	35
5.2 Objetivos específicos.....	35
6 MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1 Modelo experimental	36
6.2 Modelo de la EHA	37
6.3 Análisis histopatológico y de inmunodetección	38
6.4 Ensayo TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)	41
6.5 Actividad in situ de la SA- β -gal.....	42
6.6 Determinación de proteína total por Western Blot (WB).....	44
6.7 Ensayo de Inmunoprecipitación (IP).....	48

6.8 Determinación de proteínas oxidadas	49
6.9 Análisis densitométrico.....	49
6.10 Análisis estadístico	50
7 RESULTADOS	51
7.1 El consumo crónico de etanol incrementa el peso corporal y el peso relativo del hígado durante el envejecimiento en los ratones	51
7.2 El consumo crónico de etanol modifica los componentes de la MEC durante el envejecimiento.....	52
7.3 La proliferación celular aumenta con el consumo crónico de etanol durante el envejecimiento.....	55
7.4 El consumo crónico de etanol incrementa un marcador de daño al ADN en el hígado de ratones envejecidos.....	58
7.5 El consumo crónico de etanol favorece la muerte de las células hepáticas de ratones envejecidos	59
7.6 El consumo crónico de etanol incrementa los marcadores de senescencia celular en el hígado de ratones envejecidos	60
7.7 El consumo crónico de etanol promueve la localización preferente de la NXN cerca de o en las células senescentes del hígado de ratones envejecidos	63
7.8 El consumo crónico de etanol aumenta las proteínas carboniladas en el hígado de ratones envejecidos.....	64
7.9 El consumo crónico de etanol potencia las alteraciones promovidas por el envejecimiento en las interacciones dependientes de la NXN en el hígado de ratón	66
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
9 CONCLUSIONES.....	82
10 PERSPECTIVAS	84
11 BIBLIOGRAFÍA	85
12 ANEXOS	98
12.1 Publicaciones	98
12.2 Congresos	110

1. RESUMEN

Idelfonso García Osiris Germán. Respuesta de las interacciones óxido-reducción (redox) sensibles de la nucleorredoxina (NXN) ante el estrés oxidante producido por la enfermedad hepática alcohólica (EHA) durante el envejecimiento en el hígado del ratón (bajo la dirección de: Dr. Jaime Arellanes Robledo y Dr. Héctor Fernando Serrano).

El envejecimiento se caracteriza por el aumento de especies reactivas que conducen al desequilibrio redox, el daño oxidante y la senescencia. Los efectos adversos del consumo de etanol potencian las alteraciones asociadas al envejecimiento y promueven varias enfermedades, entre ellas las hepáticas. La NXN es una enzima redox sensible que ataca a las especies reactivas del oxígeno (ERO) y regula procesos celulares claves, a través de interacciones proteína-proteína. Aquí, determinamos el efecto del consumo crónico de etanol sobre las interacciones redox dependientes de la NXN en el hígado de ratones envejecidos. Encontramos que el consumo crónico de etanol promueve preferentemente la localización de la NXN dentro o junto a las células senescentes, disminuye su capacidad de interacción y altera la proporción de interacción de la NXN con las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1 durante el envejecimiento. Además, incrementa el nivel de proteínas carboniladas y la proliferación celular, y se invierte las proporciones de colágeno I y colágeno III. En conclusión, demostramos un fenómeno emergente asociado a la alteración de la homeostasis redox durante el envejecimiento, el cual se demuestra a través de la disminución de la capacidad de la NXN para interaccionar con sus proteínas asociadas, que se ve potenciada por

el consumo crónico de etanol en el hígado de ratón. Esta evidencia abre una ventana atractiva para dilucidar las consecuencias tanto del envejecimiento como del consumo crónico de etanol en las vías de señalización reguladas por las interacciones redox-sensibles dependientes de la NXN.

ABSTRACT

Aging is characterized by increased reactive species leading to redox imbalance, oxidative damage, and senescence. The adverse effects of alcohol consumption potentiate the aging-associated alterations promoting several diseases including liver diseases. Nucleoredoxin (NXN) is a redox-sensitive enzyme that targets reactive oxygen species and regulates key cellular processes through redox protein–protein interactions. Here, we determine the effect of chronic alcohol consumption on NXN-dependent redox interactions in the liver of aged mice. We found that chronic alcohol consumption preferentially promotes the localization of NXN either into or alongside senescent cells, declines its interacting capability, and worsens the altered interaction ratio of NXN with FLII, MYD88, CAMK2A, and PFK1 proteins induced by aging. In addition, carbonylated protein and cell proliferation increased, and the ratios of collagen I and collagen III were inverted. Thus, we demonstrate an emerging phenomenon associated with the altered redox homeostasis during aging shown by the declined capability of NXN to interact with partner proteins, which is enhanced by chronic alcohol consumption in the mouse liver. This evidence opens an attractive window to elucidate the consequences of both aging and chronic alcohol consumption on the downstream signaling pathways regulated by NXN-dependent redox-sensitive interactions.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Envejecimiento

El envejecimiento conduce al deterioro progresivo de la homeostasis a nivel genómico, celular y tisular, lo que aumenta el riesgo de diversas enfermedades. Se ha descrito que el envejecimiento está estrechamente relacionado con la aparición de alteraciones epigenéticas, inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, pérdida de proteostasis, desregulación de la detección de nutrientes, comunicación intracelular alterada, disfunción mitocondrial, agotamiento de las células madre, senescencia celular, inflamación e incremento del estrés oxidante (Lopez-Otin *et al.*, 2013). El envejecimiento influye más que cualquier otro factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas. Además, existe una considerable superposición entre las características del envejecimiento y los mecanismos patogénicos de estas enfermedades (Niccoli & Partridge, 2012).

El hígado es un órgano metabólico complejo esencial para mantener la homeostasis de todo el cuerpo mediante la regulación del metabolismo energético, la eliminación de xenobióticos y la biosíntesis molecular, por lo tanto, los cambios en la función hepática relacionados con la edad contribuyen a la susceptibilidad sistémica de las enfermedades relacionadas con la edad. Por ejemplo, el hígado regula el metabolismo energético sistémico a través de la homeostasis hepática de la glucosa y los lípidos (Rui, 2014).

2.2 Características del envejecimiento en el hígado

Diversos estudios han examinado los efectos del envejecimiento en el tejido hepático, donde se observan principalmente cambios en los hepatocitos, además,

han reportado sobre los efectos del envejecimiento sobre alteraciones genéticas y mitocondriales en este órgano (**Figura 1**).



Figura 1. Esquema general de las características que contribuyen al proceso del envejecimiento. En conjunto, los siguientes factores determinan el fenotipo del envejecimiento, como la inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, detección desregulada de nutrientes, disfunción mitocondrial, agotamiento de las células madre, comunicación intercelular alterada y senescencia celular. Imagen modificada de (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

2.2.1 Inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica resulta de la acumulación del daño genético a lo largo de la vida promovido por factores exógenos y a través de errores de replicación del ADN, estrés oxidante y cambios en la transcripción genética (Lebel *et al.*, 2011). En los modelos de ratones envejecidos inducidos por mutaciones en la reparación del ADN, se ha demostrado que el hígado envejecido acumula reordenamientos genómicos (Gregg *et al.*, 2012). Los hígados de ratones envejecidos tienen translocaciones cromosómicas y deleciones, posiblemente mediadas por especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lebel *et al.*, 2011). El envejecimiento del hígado tiene una mayor incidencia de hepatocitos poliploides con una tasa reducida de síntesis y reparación del ADN (Basso *et al.*, 1998). Debido a la evidencia antes mencionada, la inestabilidad genómica puede ser un iniciador importante del fenotipo de envejecimiento en el hígado (Bao *et al.*, 2023).

2.2.2 Desgaste de los telómeros

El ADN telomérico se acorta con un número creciente de divisiones celulares, y la disfunción de los telómeros provoca una respuesta de daño al ADN (DDR). Esto, a su vez, induce la detención del ciclo celular y la expresión del factor proinflamatorio, lo que en última instancia conduce al envejecimiento del organismo. La longitud de los telómeros está controlada por la actividad de la telomerasa, y puede aumentar y mejorar la integridad de los cromosomas, por lo tanto, se prolonga la vida del organismo (Zhu *et al.*, 2019).

Un estudio sobre los efectos del envejecimiento en los telómeros de ratones en diferentes tejidos, encontró que los telómeros en el hígado disminuyeron en longitud

en ratones envejecidos, junto con cambios en el hipocampo, la hipófisis, la retina, los riñones y la piel (Baek *et al.*, 2019).

2.2.3 Alteraciones epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas se refieren a cambios en el fenotipo o la expresión genética causados por mecanismos distintos a los cambios en la secuencia del ADN. Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, modificaciones, remodelación de la cromatina y alteración transcripcional por el ARN no codificante (ncRNA) (Sen *et al.*, 2016).

La desregulación de las redes transcripcionales y el estado de la cromatina que sustentan la expresión genética es un factor crucial en el envejecimiento. Existe un conjunto complejo de procesos involucrados en la regulación de la expresión genética influenciados por el envejecimiento, incluida la metilación del ADN, factores de transcripción, marcas de histonas, posicionamiento de nucleosomas y ncRNA (Benayoun *et al.*, 2015).

En el hígado, hay cambios relacionados con la edad en la metilación del ADN que se correlacionan con la edad cronológica (Meer *et al.*, 2018). Durante el envejecimiento en el ratón se han observado muchos cambios en la red de transcripción, incluidas alteraciones importantes en la caja O de Forkhead (FOXO), un factor de transcripción clave implicado en el envejecimiento (Martins *et al.*, 2016). El posicionamiento de los nucleosomas también es fundamental para la expresión genética y la mayoría de los procesos relacionados con el ADN. Hay cambios relacionados con la edad en los nucleosomas en el hígado del ratón que contribuyen a la disfunción metabólica (Bochkis *et al.*, 2014).

El envejecimiento también afecta la expresión de algunos microRNA (miR). Estos incluyen al miR-146 que influye en la función mitocondrial y la inflamación (Rippo *et al.*, 2014); al miR-146a, miR-376c y miR-411 que están asociados con la inflamación metabólica (Victoria *et al.*, 2017); y al miR-34a y miR-93 que se dirigen a genes como *NRF2*, sirtuina 1 (*SIRT1*), e influyen en la senescencia celular y el estrés oxidante (Li *et al.*, 2011).

2.2.4 Pérdida de la proteostasis

La proteostasis es la síntesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas (Schneider *et al.*, 2015). La alteración de la proteostasis desencadena cambios adaptativos en la célula. Para hacer frente a esta situación, las células han desarrollado múltiples mecanismos para reducir el plegamiento incorrecto y eliminar las proteínas mal plegadas. Uno de estos mecanismos es el desarrollo de chaperonas, que se unen a cadenas peptídicas, que evita que los péptidos se doblen prematuramente y les ayuda a adoptar la forma correcta (Hipp *et al.*, 2019). La pérdida de proteostasis contribuye a la carga de proteínas mal plegadas a través del estrés del retículo endoplásmico (RE) (Wakabayashi & Yoshida, 2013), estrés oxidante y daño celular dentro del hígado (Karunadharma *et al.*, 2015).

2.2.5 Detección de nutrientes desregulada

Las vías de detección de nutrientes median los efectos de la nutrición sobre el envejecimiento y tienen un papel fundamental en la regulación de la tasa de envejecimiento. Las principales vías de detección de nutrientes incluyen la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), SIRT y proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Bitto *et al.*, 2015). El hígado tiene el papel central en la regulación de la respuesta sistémica a la nutrición, por lo tanto, los

cambios relacionados con la edad en las vías de detección de nutrientes en el hígado pueden tener efectos sistémicos sustanciales.

La señalización de AMPK en muchos tejidos disminuye con la edad, lo que afecta la homeostasis celular y la función mitocondrial (Reznick *et al.*, 2007). En el hígado de ratón, el envejecimiento se asocia con una mayor fosforilación y actividad de AMPK. Sin embargo, las vías posteriores no se activan y existe una ausencia de la respuesta a la hipoxia, lo que indica un deterioro general de la vía AMPK (Mulligan *et al.*, 2005).

SIRT1 es un ortólogo clave de las histonas desacetilasas de clase III que participan en la regulación de múltiples dianas proteicas y de transcripción relevantes para el envejecimiento como p53, FOXO, el coactivador del receptor gamma 1 alfa (PGC-1 α) y el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- κ B) (Anderson & Weindruch, 2010; Hubbard & Sinclair, 2014).

2.2.6 Disfunción mitocondrial

Se han reportado muchos cambios en las mitocondrias en el hígado envejecido, incluidas mutaciones en el ADN mitocondrial (DNAm_t) (Niemann *et al.*, 2017), estrés oxidante, alteración de la fosforilación oxidativa y cambios estructurales (Navarro & Boveris, 2004). Estos cambios reducen la bioenergética celular y aumentan el daño oxidativo, pero también conducen a las células hacia la senescencia celular (Lawless *et al.*, 2012).

El modelado computacional de los niveles de ERO en cultivos celulares ha demostrado que las células individuales entran en senescencia a un nivel de ERO elevado (Lawless *et al.*, 2012). También, se demostró que un impulso hacia un estado de senescencia celular implica la producción de ERO a partir de una

disfunción mitocondrial (Passos *et al.*, 2010). En relación con el envejecimiento normal, donde se pueden reducir las ERO y mantener la funcionalidad mitocondrial. En general, estos datos demuestran que las regulaciones de ERO son muy importantes para la disfunción mitocondrial y para la transición hacia la senescencia celular, y los impulsores para la producción de un exceso de ERO dependen de las interacciones entre las vías epigenéticas, de detección de nutrientes y de estrés celular (Giorgi *et al.*, 2018).

Adicionalmente se conoce que, en respuesta a los estímulos de estrés, la señalización del RE es promovida por proteínas de choque térmico (HSP). Sin embargo, se observa una marcada disminución de HSP70, HSP27 y HSP90 en hepatocitos senescentes de ratas viejas (Takahashi *et al.*, 2002). Esta disminución en la disponibilidad y/o función de las HSP con la edad puede conducir a la acumulación de proteínas dañadas y a la pérdida de la proteostasis.

La acumulación de HSP promueve la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), una respuesta protectora altamente conservada que mantiene la homeostasis celular. La desactivación de la UPR relacionada con la edad en el RE y las mitocondrias de los hepatocitos, se ha demostrado que causa acumulación de proteínas mal plegadas, aumento de la lipogénesis y lipotoxicidad, amplificación de ERO y señalización de estrés inflamatorio, lo que lleva a una predisposición general a enfermedades hepáticas relacionadas con la edad (Zhang & Wang, 2016).

2.2.7 Agotamiento de las células madre

Se ha estudiado que las células madre hematopoyéticas que no son capaces de someterse a la autofagia celular, presentan una acumulación de mitocondrias y se encuentran en un estado constante de activación metabólica, lo que acelera la

diferenciación de las células mieloides mediante modificaciones anómalas del ADN, que influye en última instancia a la capacidad de las células madre hematopoyéticas para autofagocitarse (Ho *et al.*, 2017). Además, estudios recientes han demostrado que la expansión, el agotamiento o el mantenimiento de la reserva de células madre, si los patrones de división celular no se controlan adecuadamente, se puede producir un agotamiento prematuro de la reserva de células madre o trastornos anormales del crecimiento y la diferenciación que aceleran la senescencia celular (Manzano-Lopez & Monje-Casas, 2020).

Los efectos del envejecimiento sobre las células progenitoras del hígado no se han estudiado ampliamente. En ratones, la vejez se ha asociado con una activación y proliferación reducidas de las células progenitoras del hígado *in situ* después de un daño hepático, pero con una capacidad proliferativa normal *in vitro* de las células progenitoras del hígado después del aislamiento. Se concluyó que las respuestas alteradas de las células madre en el hígado envejecido son secundarias a la inflamación y no a déficits intrínsecos (Cheng *et al.*, 2017).

2.2.8 Comunicación intercelular alterada

La comunicación intercelular se caracteriza normalmente por la liberación de factores solubles y afecta la función de las células vecinas (Fafian-Labora & O'Loughlen, 2020). En el microentorno tisular, el fenotipo secretor asociado a Senescencia (SASP) tiene una serie de efectos negativos sobre las células vecinas, la matriz extracelular (MEC) circundante y otros componentes estructurales, como la inflamación crónica y la senescencia pasiva de las células sanas (Xu *et al.*, 2021). La función del hígado depende de la comunicación intercelular entre hepatocitos, células estelares hepáticas (CEH), células de Kupffer (CK) y las células endoteliales

sinusoidales (CES) al utilizar una amplia gama de sustratos que incluyen citosinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), eicosanoides, factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y componentes de la MEC (Kmiec, 2001). Se ha informado que el envejecimiento se asocia con una disminución de la síntesis de vasodilatadores y un estado proinflamatorio que indica una desregulación de las células de los sinusoides hepáticos (Maeso-Diaz *et al.*, 2018). También, cabe señalar que las CES, que se encuentra en la interfaz entre la sangre y los hepatocitos, tendrán un papel fundamental en la regulación de la interacción entre el hígado y las citosinas y factores de crecimiento circulantes, así como en la absorción de xenobióticos y endobióticos (Brenner *et al.*, 2013).

2.2.9 Senescencia celular

La senescencia celular describe una detención irreversible del ciclo celular y se cree que se debe principalmente al desgaste de los telómeros. Está asociado con la secreción de citosinas inflamatorias denominado SASP. La senescencia celular asociada con el acortamiento de la longitud de los telómeros se ha confirmado en hígados del ser humano de edad avanzada (Capri *et al.*, 2017). Además del acortamiento de los telómeros, los cambios en el tamaño nuclear, el contenido de ADN, el incremento de p21, fosfo-histona H2A.X (pH2A.X), la activación de la β -galactosidasa y la formación de focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAFH), se ha confirmado que son características de la senescencia en el hígado del ser humano durante el envejecimiento normal y la enfermedad hepática (Aini *et al.*, 2014; Paradis *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 2017). En ratones, la presencia de un aumento de células senescentes se ha demostrado mediante la identificación de (i) marcadores celulares (**Figura 2**) (White *et al.*, 2015); (ii) SASP

(Lasry & Ben-Neriah, 2015) y (iii) firmas genéticas de senescencia celular (Hudgins *et al.*, 2018).

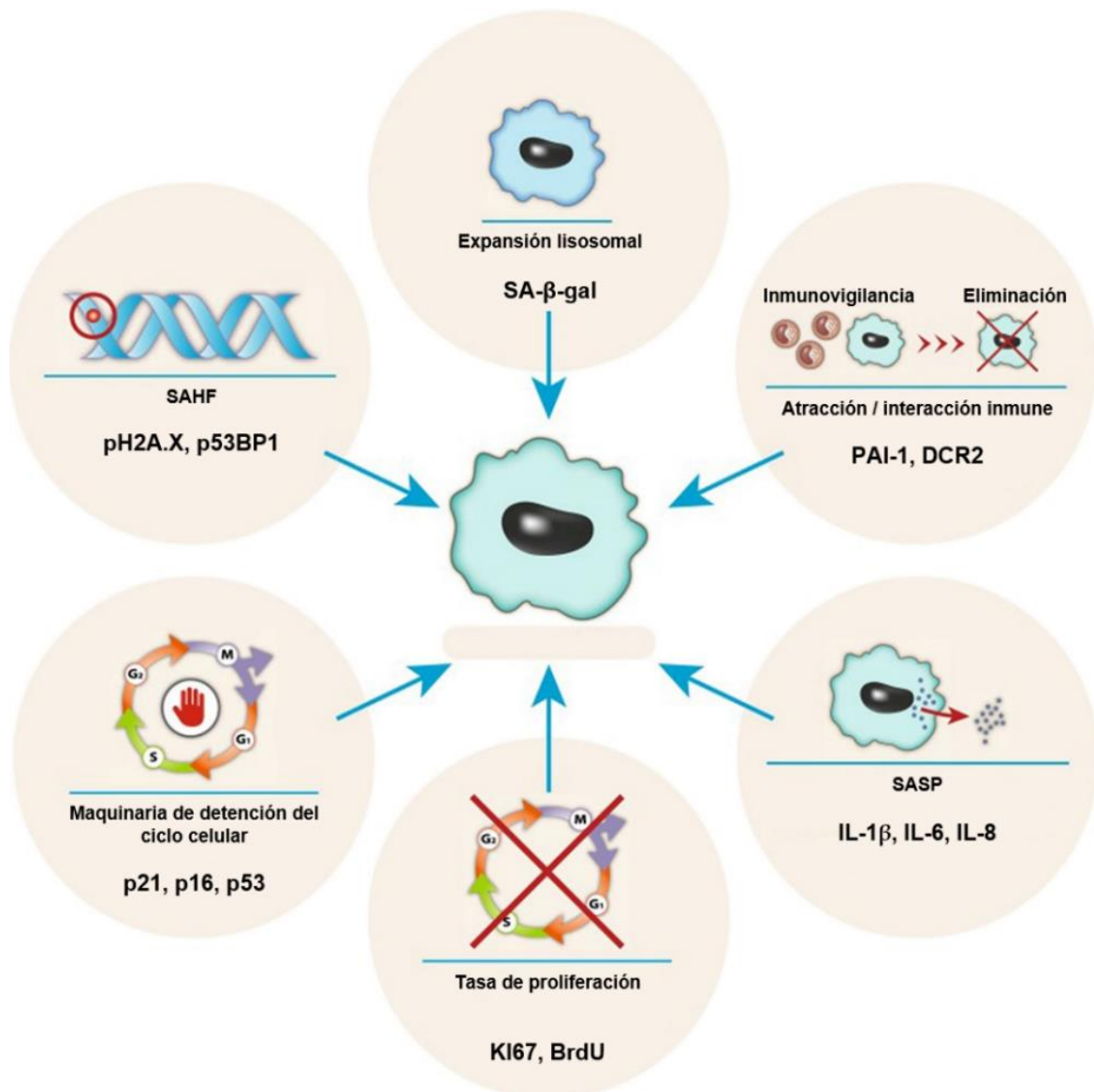


Figura 2. Biomarcadores de las células senescentes. El uso de varios marcadores moleculares que representan diferentes características de la senescencia celular es necesario para identificar las células senescentes. Los marcadores se dividen en categorías según su función y la combinación de marcadores aumenta la validez de la identificación de células senescentes. Imagen modificada de (Burton & Krizhanovsky, 2014).

Generalmente, se acepta que la velocidad a la que una célula puede volverse senescente depende de la interacción de factores genéticos y ambientales, como la

exposición a toxinas, virus y, de particular interés, la influencia dietética; se ha demostrado que la senescencia de los hepatocitos y la acumulación de grasa en ratones que envejecen dependen de la ingesta dietética de calorías y macronutrientes (Ogrodnik *et al.*, 2017).

2.3 El envejecimiento se acelera por el consumo de etanol

El consumo crónico y excesivo de etanol es un problema de salud mundial, que conduce a enfermedades clínicas y cambios patológicos que causan la enfermedad hepática alcohólica (EHA). La EHA se asocia con inflamación y daño hepático o fibrosis progresiva que generan tres estadios principales durante la enfermedad (Stickel *et al.*, 2017). Estos incluyen hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis. El hígado graso es una característica que está presente en la mayoría de los bebedores crónicos y se asocia con la ingesta crónica de etanol (Singh *et al.*, 2017). Un porcentaje significativamente menor de consumidores de etanol que beben en exceso progresará a hepatitis alcohólica, que se ha demostrado que es un precursor de la cirrosis hepática (Mathurin & Bataller, 2015). La EHA grave tiene un pronóstico muy bajo. Tanto la duración como la cantidad de la ingesta de etanol son factores de riesgo más importantes que intervienen en el desarrollo de la EHA. El patrón del tipo de bebida y el patrón de consumo juegan un papel menor en la determinación del riesgo (Dawson, 2011). Sin embargo, al parecer se requieren factores de riesgo adicionales que aún no están bien definidos en el progreso del daño hepático más allá de la etapa de hígado graso (Benedict & Zhang, 2017).

Al estimar el consumo de etanol, debe entenderse que 12 onzas líquidas de cerveza, cuatro onzas de vino o 1,5 onzas líquidas de licores destilados contienen

aproximadamente 14 g o 0,6 onzas líquidas de etanol puro (Kang *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, el umbral para desarrollar una enfermedad EHA grave en los hombres es una ingesta de menos de 60 a 80 g por día de etanol durante 10 años, mientras que las mujeres parecen tener un mayor riesgo de desarrollar el mismo grado de daño hepático al consumir 20-40 g por día de etanol (Sharma & Arora, 2020).

En comparación con los hombres, las mujeres son más susceptibles a la patogenia de la EHA. Las mujeres tienden a desarrollar la enfermedad hepática avanzada con una ingesta sustancialmente menor de etanol (Bradley *et al.*, 1998). Es probable que las diferencias dependientes del género en el metabolismo gastrointestinal y hepático del etanol contribuyan a una mayor susceptibilidad de las mujeres al daño hepático inducido por el etanol (Ohashi *et al.*, 2018).

2.4 Patogénesis de la EHA

El consumo crónico de etanol produce un amplio espectro de daños hepáticos. El hígado graso, es decir, la esteatosis, es la respuesta más común y temprana que se desarrolla en más del 90 por ciento de los bebedores que consumen 4 o 5 tragos estándar por día. Si el consumo continuo, la enfermedad hepática inducida por el etanol puede derivar en inflamación del hígado, es decir, esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis e incluso el carcinoma hepatocelular (CHC) (**Figura 3**). La compleja interacción de varios tipos distintos de células hepáticas es crucial para comprender el daño hepático mediado por el etanol (Nagy *et al.*, 2016).

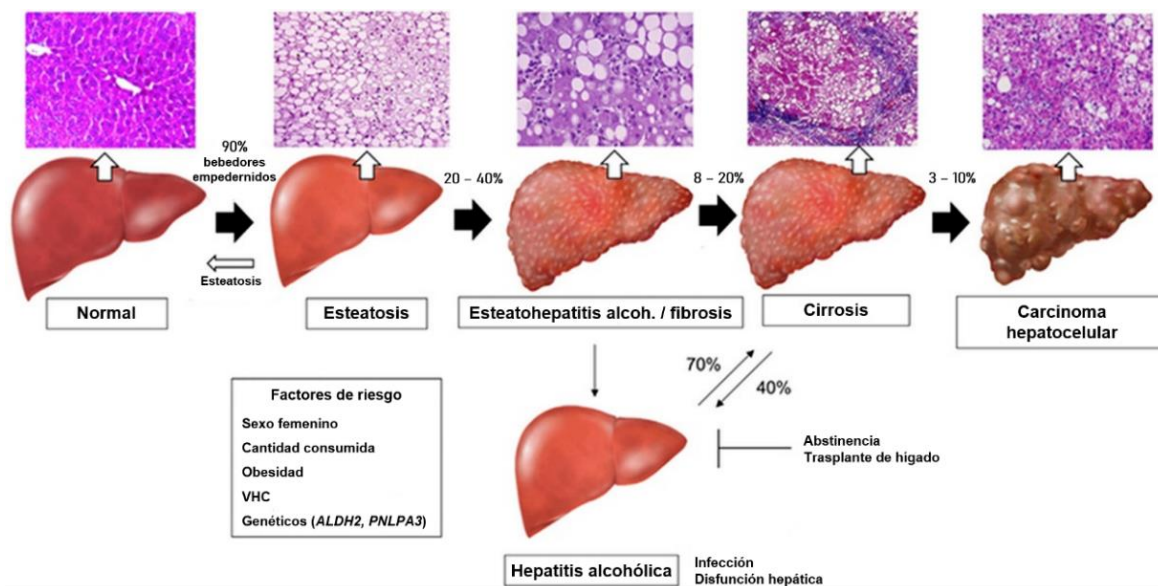


Figura 3. Progresión de la EHA. El espectro de la EHA varía desde esteatosis hasta fibrosis, cirrosis y luego el CHC. Aproximadamente el 90% de los bebedores empedernidos desarrollan esteatosis alcohólica. Esta etapa es reversible al disminuir el consumo de etanol. Los factores de riesgo, como el sexo, el patrón de consumo de etanol, entre otros, pueden contribuir a la progresión de la EHA. Alrededor de 20 al 40% de los pacientes con esteatosis alcohólica progresarán a esteatohepatitis alcohólica, que se caracteriza histológicamente por infiltración de células inflamatorias, especialmente neutrófilos y muerte de hepatocitos en el parénquima hepático. Algunos de esos pacientes desarrollarán fibrosis hepática y posteriormente cirrosis. La cirrosis puede progresar aún más hasta convertirse en CHC. La hepatitis alcohólica, una afección que va de aguda a crónica de la EHA, se presenta con síntomas clínicos, como infección y descompensación, y puede ocurrir en cualquier etapa de la progresión de la EHA. Los tratamientos para esta afección incluyen abstinencia, corticosteroides y el trasplante de hígado. Abreviaturas: VHC, virus de la hepatitis C; ALDH2, aldehído deshidrogenasa 2; PNPLA3, proteína 3 que contiene dominio fosfolipasa similar a patatina. Imagen modificada de (Ohashi *et al.*, 2018).

El etanol se metaboliza principalmente en las principales células parenquimatosas del hígado, es decir, los hepatocitos, estas células expresan los niveles más altos de las principales enzimas oxidantes del etanol, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), que se encuentra en el citosol, y el citocromo P450-2E1 (CYP2E1), que reside en el RE liso. Los hepatocitos también expresan niveles muy altos de catalasa (CAT), una enzima que habita en los peroxisomas (**Figura 4**). En el momento en que el etanol está presente, la CAT tiene un papel secundario en el

metabolismo del etanol mediante el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar el etanol a acetaldehído (Ceni *et al.*, 2014).

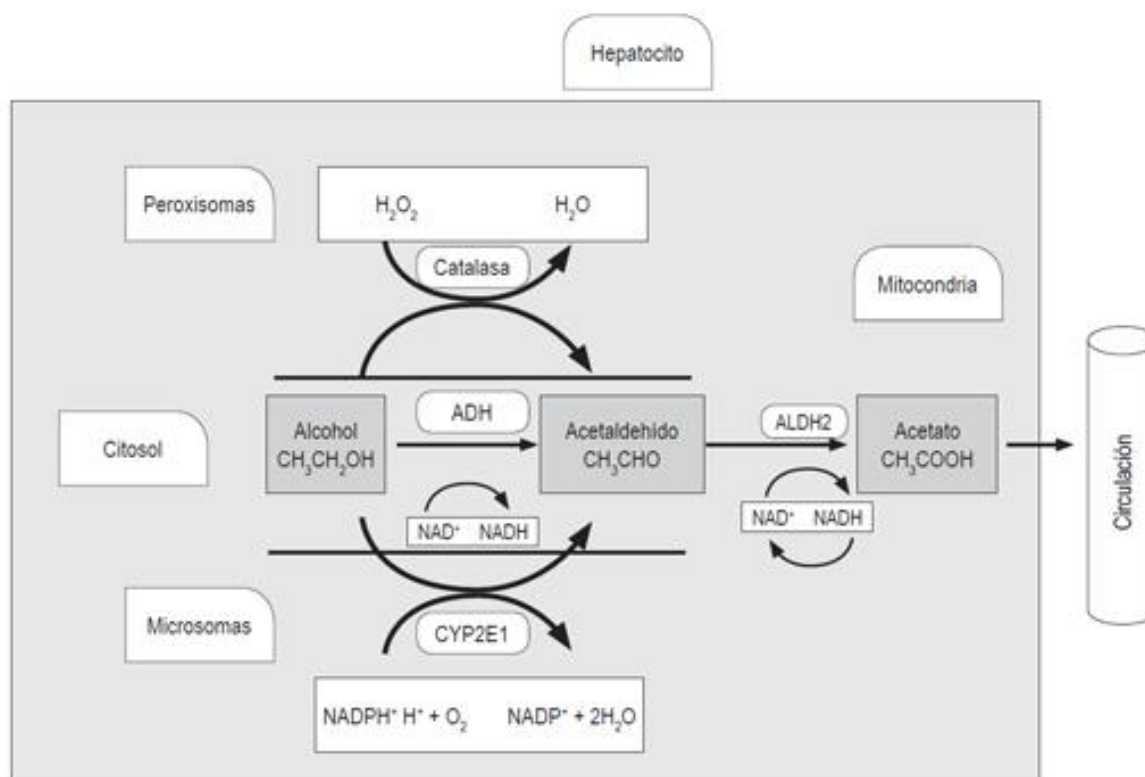


Figura 4. Vías oxidativas del metabolismo del etanol. El etanol se metaboliza principalmente en el citosol por la ADH para producir acetaldehído. En niveles elevados de consumo de etanol, una enzima del RE, el CYP2E1, participa en el metabolismo del etanol a acetaldehído. Una reacción mediada por la CAT en los peroxisomas se considera una vía metabólica menor del metabolismo del etanol, como resultado a estos eventos, el acetaldehído se metaboliza a acetato en las mitocondrias. Esto da como resultado la formación de nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y, por lo tanto, cambia el estado oxido-reducción (redox) de los hepatocitos, es decir, aumenta la proporción de NADH/NAD^+ . Tanto el metabolismo del etanol por CYP2E1 como la reoxidación de NADH a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias dan como resultado la formación de ERO. Imagen modificada de (Gaviria C *et al.*, 2016).

Existen tres sistemas metabólicos principales que participan en el metabolismo oxidante del etanol a acetaldehído. El primero es el sistema de ADH citoplasmático de los hepatocitos, que oxida el etanol en acetaldehído al usar la nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD^+) como cofactor. La ADH1, entre las otras isoenzimas de ADH, juega un papel principal en el metabolismo del etanol en el

hígado. El acetaldehído, que es producido por la ADH, se oxida a acetato por la ALDH. El segundo sistema metabólico principal del etanol son las enzimas del CYP2E1 que convierten las moléculas químicas en metabolitos polares antes de la excreción. El CYP2E1 se considera el componente principal de este sistema. En condiciones fisiológicas normales, el CYP2E1 cataliza la oxidación de una pequeña cantidad de etanol, alrededor del 10%, en acetaldehído. Sin embargo, se incrementa en condiciones de abuso crónico de etanol debido a la inducción de la expresión del CYP2E1. El tercer sistema metabólico es la CAT una enzima que habita en los peroxisomas, que se considera como el otro sistema metabólico principal que depende de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para el metabolismo oxidante. En adición, si la concentración de etanol en sangre y líquido tisular es baja, se metaboliza principalmente por la vía ADH. Sin embargo, si la concentración de etanol es superior a 10 mol/L, los otros dos sistemas enzimáticos también comienzan a participar en el metabolismo del etanol (Osna *et al.*, 2017).

El eje de la microbiota hepática e intestinal se ha vinculado en las acciones bidireccionales, y esto involucra la integración de factores genéticos, dietéticos y ambientales. La alteración de la barrera intestinal explica las interrelaciones del intestino, el hígado y en ocasiones conduce a efectos negativos sobre este órgano. Los microbios intestinales en la enfermedad hepática se asocian principalmente con el etanol. Esta acción recíproca establecida por los derivados intestinales ingresa directamente al hígado y conduce a las secreciones intestinales. Los péptidos microbianos inducidos por el etanol aumentan el nivel de mediadores proinflamatorios en los alrededores del hígado, lo cual se interconecta con la barrera epitelial, el revestimiento de la membrana mucosa y el microbioma intestinal. En el

desarrollo de la patogenia hepática, un factor importante en el inicio de la respuesta inflamatoria por parte de los macrófagos residentes del hígado, es decir, las CK, es la endotoxina o lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas que se traslada desde la luz intestinal a la circulación portal para llegar al hígado. Los niveles elevados de endotoxinas circulantes en la hepatitis alcohólica son causados por cambios cualitativos y cuantitativos inducidos por el etanol en las bacterias que habitan en el intestino, es decir, la microbiota intestinal, y una mayor permeabilidad intestinal. En el hígado, el LPS activa las CK y las CEH al interactuar con el receptor tipo toll 4 (TLR4). Estas células producen ERO así como citosinas y quimiocinas proinflamatorias que, junto con el etanol, contribuyen al daño del tejido hepático (Albillos *et al.*, 2020).

2.5 Estrés oxidante

El estrés oxidante se puede definir como el incremento en la producción de ERO, las cuales son productos altamente reactivos derivados del oxígeno molecular (O_2). Estos compuestos se originan por mecanismos endógenos como el metabolismo celular; y por mecanismos exógenos como la exposición a xenobióticos y a agentes ambientales. Entre las ERO se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el H_2O_2 , el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y el radical perhidroxilo ($HO_2^{\cdot}$), entre otras (Ding *et al.*, 2015). Las ERO inducen modificaciones proteicas reversibles, principalmente a nivel de los residuos que contienen azufre cisteína y metionina, lo que refleja una señal redox. El estrés oxidante puede causar cambios en la estructura de las proteínas, la localización, las interacciones físicas y las modificaciones postraduccionales a través de la modificación oxidativa de las cisteínas reactivas. Las especies de lípidos que reaccionan con ERO sufren peroxidación de lípidos y producen 4-

hidroxinonenal y malondialdehído, que pueden inducir varias formas de muerte celular, incluidas la apoptosis y la ferroptosis. Los productos de peroxidación de lípidos también pueden unirse al ADN y mejorar la carcinogénesis mediante la producción de aductos eteno-ADN (Yang & Stockwell, 2016). Las proteínas que reaccionan con las ERO modifican sus estructuras y funciones, lo que posiblemente da como resultado neoantígenos que pueden inducir una respuesta inmunitaria (Mueller *et al.*, 2018).

En las CES del hígado, el estrés oxidante altera la oxidación de la espectrina. Se ha demostrado que el estrés oxidante reduce la formación de enlaces disulfuro y provoca la acumulación de proteínas desplegadas, lo que desencadena un estrés adicional en el RE. Las células contrarrestan estas modificaciones en las proteínas a través de las siguientes vías principales de señalización, quinasa transmembrana/endoribonucleasa 1 (IRE1) que requiere inositol, factor de transcripción activador 6 y quinasa ER similar a ARN de proteína quinasa. En conjunto, forman la UPR, que se produce principalmente a través de la vía de la ubiquitina-proteasoma (Khambu *et al.*, 2017).

La EHA se caracteriza por anomalías estructurales y funcionales en las mitocondrias hepáticas, incluido el agrandamiento, daño del DNAm, niveles reducidos de trifosfato de adenosina (ATP), síntesis de proteínas mitocondriales, aumento de la producción de ERO, y alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la transición de permeabilidad mitocondrial, lo que resulta en apoptosis intrínseca y extrínseca (García-Ruiz *et al.*, 2013).

2.6 Senescencia celular: impacto del estrés oxidante

Las ERO se han convertido en un componente crítico en la evolución de la vida, sus efectos sobre las rutas de señalización redox influyen en varios procesos fisiológicos, como la senescencia celular. La producción de ERO es uno de los principales activadores y estabilizadores de la senescencia celular; existen evidencias que revelan la contribución directa de las ERO tanto en la DDR como en las vías activadas por redox y la inducción de acortamiento de los telómeros, que da como resultado una DDR y la activación de la senescencia celular.

La senescencia celular puede desencadenarse por daño en el ADN causado por estímulos internos o externos en los cromosomas y telómeros. Dos mecanismos importantes de la senescencia celular son la senescencia replicativa, principalmente relacionada con el acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento, y la senescencia inducida provocada por el estrés celular, que generalmente se asocia con daños en el ADN, también llamada senescencia prematura. Diferentes factores estresantes inducen la senescencia y, a menudo, se asocian con la regulación de p53. Algunos factores específicos que determinan la senescencia inducida por el estrés son la disfunción mitocondrial y el estrés del RE, que pueden inducir daños irreversibles en el ADN y activar los mecanismos moleculares de la senescencia. Los factores de estrés inducen daño en el ADN, en particular roturas de doble cadena (DSB) del ADN, lo que desencadena la DDR. La activación de esta vía conduce a la activación de la ataxia telangiectasia mutada (ATM) y proteínas quinasas relacionadas con *RAD3* (ATR), y posteriormente, a la fosforilación de p53 y la activación de p21, lo que eventualmente resulta en la detención del ciclo celular

(Kumari & Jat, 2021). Además, p21 y p16 inhiben la fosforilación del factor del retinoblastoma (Rb), lo que le permite unirse al factor de transcripción *E2F* y contribuir así a la detención del ciclo celular. En resumen, diferentes vías de señalización celular relacionadas con la senescencia celular convergen en la activación de p53 y posteriormente en la activación de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) p16, p15 y p21 (Chicas *et al.*, 2010). Los niveles de P53 determinan el destino celular durante las condiciones de estrés y se observan niveles elevados en la senescencia temprana, pero normalmente se observan niveles más altos (al menos dos veces) durante la apoptosis. Asimismo, los niveles de p53 pueden estabilizarse y el mantenimiento del fenotipo de senescencia a menudo se asocia con la activación de p16, y se establece el estado senescente que ya no se puede revertir mediante la inhibición de p53 (Mijit *et al.*, 2020).

La DDR es un activador bien conocido de SASP. El SASP incluye una serie de factores proinflamatorios, en su mayoría factores dependientes de NF- κ B como la interleucina 6 (IL-6), IL-8, IL-1 β , la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), MCP-2 y MCP-4, factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento humano (HGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteasas tales como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y proteínas secretadas insolubles/proteínas de MEC. El SASP puede reforzar la detención del ciclo celular inducida por la senescencia mediante mecanismos autocrinos o paracrinos y puede modular el microambiente tisular mediante vías paracrinas (Kuilman *et al.*, 2010).

2.7 Senescencia celular en el hígado

La senescencia de las células hepáticas puede ser inducida por diversas condiciones de estrés, como estrés metabólico, infecciones virales y estímulos

oncogénicos y también, puede ser inducida por el envejecimiento. La senescencia de los hepatocitos parece ser un sello distintivo en la enfermedad hepática crónica, independientemente de la etiología. El hígado normal contiene un nivel constante de hepatocitos senescentes (3-7%), pero en las enfermedades hepáticas crónicas este porcentaje puede incrementar por arriba del 50% (Huda *et al.*, 2019).

El daño hepático crónico contribuye a la inducción continua de células senescentes o senescencia “crónica”, lo que promueve la disfunción hepática y la progresión tumoral. Además, el daño hepático crónico induce cambios funcionales en los hepatocitos que, en ocasiones, pueden revertirse o progresar hasta la muerte celular (Xiao *et al.*, 2018). En general, los hepatocitos senescentes sufren cambios morfológicos y bioquímicos similares a los ya reportados como marcadores de senescencia celular entre los que encontramos, un número reducido de mitocondrias (disminución en la biogénesis y/o aumento de la mitofagia), la acumulación de lipofuscina, la sobreexpresión de p21, p16, p53, p21A.X y el incremento de la actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia o SA- β -gal (Hunt *et al.*, 2019). La senescencia de los hepatocitos también conduce a la SASP, lo que resulta en la producción de mediadores proinflamatorios y alteraciones en el microambiente tisular. Por ejemplo, la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) se involucra en la “propagación” de la senescencia de una célula a otra. Si se inhibe la señalización de TGF- β en ratones, se impide la senescencia, se acelera la regeneración y se mejora la supervivencia. También se ha demostrado que la IL-1 y la IL-6 son capaces de inducir la senescencia en las células adyacentes, que es antagonizada por la inhibición de sus receptores (Huda *et al.*, 2019).

Uno de los principales factores de riesgo que inducen el estrés oxidante es el consumo crónico de etanol. Del metabolismo del etanol resulta principalmente el acetaldehído, un metabolito altamente mutagénico que genera aductos cíclicos en el ADN, además, está vinculado con la producción de ERO. El daño oxidante del hígado que conduce a la cirrosis, resultante del consumo elevado de etanol y la consiguiente peroxidación lipídica, puede conducir a la hepatitis crónica. En la EHA, la presencia de hepatocitos senescentes positivos a p21 está estrechamente relacionada con el desarrollo de la fibrosis (Wan *et al.*, 2017). De hecho, 5 semanas de alimentación con etanol en ratones conduce a la acumulación de SA- β -gal y a la regulación positiva de los iniciadores de la senescencia, como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI- 1) y la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR-1) en los hepatocitos. Curiosamente, el silenciamiento de PAI-1 o EGR-1 reduce la senescencia en los hepatocitos tratados con etanol al tiempo que disminuye los niveles de marcadores profibróticos, lo que sugiere una relación directa entre el inicio de la senescencia y la progresión de la EHA (Meng *et al.*, 2017). De manera similar, la inhibición del miR-34, que incrementa en muestras clínicas de pacientes con EHA, pero disminuye el número de hepatocitos senescentes en ratones alimentados con etanol y se reduce la fibrosis. En conjunto, estos resultados sugieren un papel potencial para la senescencia celular como un evento causal de un efector de la progresión de la EHA (Aravinthan *et al.*, 2013).

2.8 Mecanismos de protección y respuesta antioxidante

Bajo condiciones fisiológicas normales, la acumulación de ERO está limitada por numerosos sistemas antioxidantes endógenos que incluyen mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Éstos pueden eliminar ERO

o prevenir su formación. Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), CAT y glutatión (GSH), junto con otras proteínas, son responsables de la eliminación de ERO y de la restauración del conjunto reducido de proteínas y lípidos. El etanol inhibe la expresión de enzimas antioxidantes; por ejemplo, SOD1, y agota los niveles de antioxidantes no enzimáticos, por ejemplo, GSH, lo que reduce la capacidad celular para modular el estrés oxidante (Filomeni *et al.*, 2015). Las ERO debilitan esta respuesta antioxidante por la S-glutationilación, que reduce la expresión de antioxidantes posteriores, como la SOD2, CAT y sestrina 3 a través de la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) /Akt. Este proceso también aumenta la generación mitocondrial de H₂O₂, lo que facilita un mayor daño oxidante (Nogueira & Hay, 2013).

Es probable que las estrategias para mejorar la capacidad antioxidante de las células durante el estrés oxidante inducido por el etanol también protejan del daño hepático inducido por el etanol. Las pequeñas proteínas redox que contienen disulfuro en la familia de la tiorredoxina (TRX) contribuyen al mantenimiento del equilibrio redox en las células. La TRX es una proteína sensible a redox de 12 kDa involucrada en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular, la promoción del crecimiento celular y la inhibición de la inflamación y la apoptosis (Burke-Gaffney *et al.*, 2005). La TRX, el NADPH y la TRX reductasa son importantes sistemas de defensa contra el estrés oxidante y proporcionan los electrones a las peroxidasas dependientes de tiol o peroxirredoxinas para eliminar las ERO. Además del GSH, enzimas de la familia de las TRX, como la nucleorredoxina (NXN), están involucradas en la eliminación de ERO y en la regulación de vías de señalización redox sensibles.

2.9 NXN

La NXN es un integrante relativamente desconocido de la familia de las TRX, la cual está involucrada en varios procesos fisiológicos; entre ellos, la regulación de la respuesta al estrés oxidante. La NXN fue llamada así debido a que fue localizada inicialmente en el núcleo celular, más tarde se determinó que se localiza principalmente en el citoplasma y que es translocada al núcleo en respuesta al estrés oxidante debido a que responde a los cambios redox que ocurren en las células. Múltiples evidencias indican que la NXN puede participar en la regulación de una gran variedad de fenómenos biológicos; por ejemplo, las vías de señalización relacionadas con la morfogénesis primaria y el mantenimiento de las células madre, donde regula las reacciones redox (Funato & Miki, 2007). En este sentido, la vía de señalización Wnt/ β -catenina, participa en el control del desarrollo temprano, la proliferación y el destino celular, y su activación depende de la presencia de ERO. En esta vía, Wnt se acopla a su receptor Frizzled, que transmite la señal a la proteína adaptadora Dishevelled (DVL). Las ERO pueden disociar el complejo NXN/DVL a través de la oxidación de la NXN, entonces, DVL puede inhibir al complejo de destrucción de β -catenina; que está compuesto por Axina, las enzimas caseína cinasa 1 α (CK1 α) y el glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β), y resulta en la acumulación citosólica de β -catenina. Este proceso inhibe la fosforilación de β -catenina y por lo tanto su degradación por la vía ubiquitina/proteasoma. La acumulación de β -catenina genera su translocación al núcleo y la activación de diversos factores de transcripción que participan en la proliferación celular. Contrariamente, la fosforilación de β -catenina en el citosol impide su acumulación; así, si el nivel de la proteína es muy bajo, ésta no se

transloca al núcleo (Funato *et al.*, 2006). Por tanto, la NXN regula negativamente la vía Wnt/ β -catenina a nivel de DVL. Es posible que la NXN altere el estado de fosforilación de DVL mediante la modulación de la función de algunas quinasas y fosfatasas. Se sabe también que, la NXN compite frecuentemente con la unión de DVL a través del bloqueo del dominio PDZ-básico de DVL (Funato & Miki, 2007).

Recientemente se ha descubierto que DVL actúa como un adaptador de doble función debido a que su interacción con la ubiquitina ligasa transmembranal *ZNRF3/RNF43* produce ubiquitinización y degradación de los receptores Wnt; esto trae como consecuencia la regulación negativa de la vía Wnt/ β -catenina como parte de un control estricto (Jiang *et al.*, 2015).

Otra interacción interesante de la NXN es la que lleva a cabo con Flightless-I (FLII), la cual es reclutada hacia la proteína conocida como gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) para formar un complejo que media la regulación negativa de la vía de señalización del TLR4/MYD88, la cual activa al factor de transcripción NF- κ B, que se encarga de la transcripción de genes que participan en la inmunidad innata y en la inflamación; y la alteración en su regulación se relaciona con procesos neoplásicos, enfermedades autoinmunes e infecciosas (Hayashi *et al.*, 2010). Entre las actividades de FLII, se encuentra la remodelación del citoesqueleto de actina, la regulación negativa de la apoptosis y la invasión de las células tumorales. Es importante mencionar que la NXN también interactúa con la proteína fosfatasa-2A (PP2A), una enzima que remueve los grupos fosfato a los aminoácidos serina y treonina; esta enzima está implicada en los procesos de replicación del ADN, transcripción, traducción y diferenciación celular (Lechward *et al.*, 2006). NXN también interactúa con la proteína Sec63, localizada en la

membrana del RE, cuya actividad está relacionada con el transporte de proteínas al interior del retículo. Además, la NXN interactúa con la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK1), principal enzima glicolítica y cuya alteración está implicada en la reprogramación metabólica del cáncer (Funato *et al.*, 2013). Sin embargo, recientes investigaciones sugieren que algunas de las interacciones de la NXN con otras proteínas, por ejemplo, PFK1, no son redox-dependientes (Nakao *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha identificado que la proteína quinasa II alfa dependiente de calcio/calmodulina (CAMK2A) también interactúa con la NXN (Tran *et al.*, 2021). Mediante el uso del sistema de doble híbrido en levadura, de un análisis de oxidación diferencial del proteoma, así como un modelo de ratones knockout para la NXN, el cual elimina parcialmente su funcionamiento, los autores encontraron una oxidación reducida en las neuronas del hipocampo, incluida la oxidación de CAMK2A. La pérdida de funciones prooxidativas dependientes de la NXN se manifestó como una reducción significativa del comportamiento no dirigido a objetivos, esfuerzos restringidos al comportamiento dirigido a objetivos con menor interés en actividades aventureras, exploratorias y gratificantes, incluida la carrera voluntaria sobre ruedas. Dado que la exploración en ratones depende de CAMK2A y, a su vez, la actividad de esta enzima está fuertemente influenciada por la NXN, los autores propusieron acertadamente que la NXN puede mantener la motivación y el placer en la exploración, probablemente manteniendo la oxidación y la actividad de la CAMK2A (Tran *et al.*, 2021).

En resumen, la NXN participa en la regulación de varios procesos celulares clave, incluida la proliferación, la organogénesis, la progresión del ciclo celular, la glucólisis, la inmunidad innata e inflamación, la motilidad y la contracción, el

transporte de proteínas al retículo endoplásmico y la plasticidad neuronal. Su función está determinada por cambios redox generados por las ERO y éstas a su vez, activan vías de señalización implicadas en diferentes mecanismos celulares tanto en condiciones normales como patológicas (Idelfonso-García *et al.*, 2022).

Por otro lado, un análisis epigenómico realizado en muestras sanguíneas de seres humanos demostró que cierta población presenta una metilación en el gen de la NXN, la cual incrementa su transcripción y a su vez, incrementa la regulación negativa que ésta ejerce sobre la vía Wnt, una vía activada en cáncer. Debido al papel que la NXN juega en la regulación del estrés oxidante, los autores sugieren que esta metilación inhibe la activación de esta vía, por lo que proponen a la metilación de la NXN como un marcador de bajo riesgo de cáncer asociado a la producción del estrés oxidante. Esta investigación resalta la relevancia de la NXN no sólo en la progresión de la senescencia sino a nivel de patologías como el cáncer. Por lo tanto, generar conocimiento sobre el papel de la NXN en la progresión de la senescencia impactará en el papel de la NXN en el desarrollo del cáncer hepático, una enfermedad que generalmente aparece en adultos mayores y que puede ser promovido por el consumo crónico de etanol (Schottker *et al.*, 2015). De manera contrastante, recientemente fue reportado que la sobreexpresión de la NXN promueve la diferenciación adipogénica a través de la inhibición de la vía Wnt, y proponen que puede funcionar como un factor proadipogénico que favorece la obesidad y desordenes metabólicos tales como la diabetes. En adición, estas alteraciones también están asociadas con el envejecimiento, esta información nos motiva a pensar que si por un lado el incremento de la expresión de la NXN disminuye el riesgo al cáncer, pero por otro lado, incrementa el riesgo de padecer

obesidad y desordenes metabólicos, por lo tanto, será pertinente también considerar en qué momento de la progresión de la senescencia la NXN juega un rol central (Bahn *et al.*, 2015). En conjunto, esta información sustenta la investigación del papel de la NXN en la senescencia celular y en consumo crónico de etanol.

Como antecedente directo, recientemente se ha reportado que la NXN regula procesos fibrogénicos y la producción de fosfoinosítidos ambos regulados por la activación de la vía Wnt en respuesta al estrés oxidante generado por el acetaldehído, un producto de oxidación del metabolismo del etanol, y por el estrés generado por el consumo crónico de etanol, respectivamente. En el primero, los autores demostraron que la sobreexpresión de la NXN inhibe la translocación de la β -catenina al núcleo de CEH y en consecuencia la expresión de genes profibrogénicos como el colágeno 1 (Arellanes-Robledo *et al.*, 2013); y en el segundo, la sobreexpresión de la NXN inhibe la producción del fosfatidilinositol 4 fosfato (PI4P), como una consecuencia de la inhibición de la vía Wnt tanto en co-cultivos de CEH y hepatocitos del ser humano, como en hígados de ratones sometidos al consumo crónico de etanol (Arellanes-Robledo *et al.*, 2018). En resumen, la NXN, una enzima oxidorreductasa, contribuye a la homeostasis redox celular al regular diferentes vías de señalización de manera dependiente de redox y participa en la regulación de varios procesos celulares clave, incluida la proliferación, la organogénesis, la progresión del ciclo celular, la glucólisis, la inmunidad e inflamación innatas, la motilidad y la contracción, transporte de proteínas al RE, plasticidad neuronal (**Figura 5**); esta evidencia posiciona a la NXN como un fuerte candidato para ser un regulador redox de la fisiología celular y centro de diferentes vías de señalización sensibles a redox en la patología de la EHA.

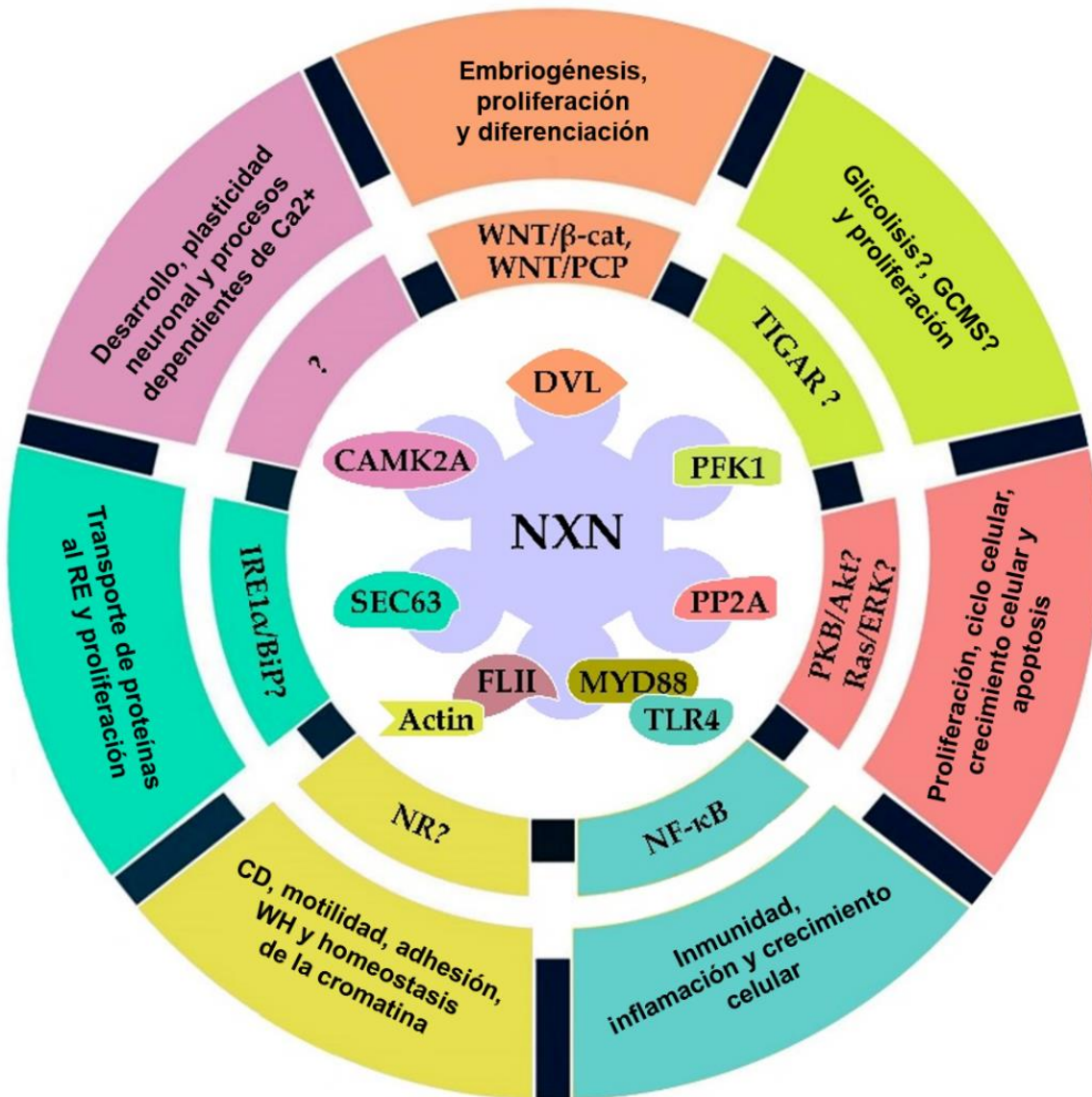


Figura 5. Esquema de las interacciones de la NXN, vías de señalización involucradas y procesos celulares. La interacción NXN/DVL regula la señalización WNT que influye en los procesos de embrionogénesis, proliferación y diferenciación. La interacción NXN/PFK1 regula procesos como la glucólisis, el estado metabólico celular global (GCSM) y la proliferación mediante la participación del regulador de apoptosis y glucólisis inducido por TP53 (TIGAR). La interacción NXN/PP2A probablemente esté involucrada en la proliferación, el ciclo celular, el crecimiento celular y la apoptosis a través de la regulación de las vías de señalización proteína cinasa B (PKB)/Akt y RAS/RAF/MEK/ERK. La interacción FLII/NXN/MYD88 regula la señalización de NF- κ B; en consecuencia, influye en los procesos de inmunidad, inflamación y crecimiento celular; además, también influye en la dinámica del citoesqueleto (CD), la motilidad, la adhesión, la cicatrización de heridas (WH) y la homeostasis de la cromatina. La interacción NXN/SEC63 probablemente esté implicada en la activación de la señalización IRE1 α /BiP, que regula el transporte de proteínas al RE, el crecimiento y la proliferación de las células biliares. La interacción NXN/CAMK2A influye en el desarrollo neuronal, la plasticidad y los procesos dependientes de CA²⁺. Imagen modificada de (Idelfonso-García *et al.*, 2022).

3 JUSTIFICACIÓN

El hígado es un órgano metabólico complejo esencial para mantener la homeostasis de todo el organismo mediante la regulación del metabolismo energético, la eliminación de xenobióticos y la biosíntesis molecular. Por lo tanto, el insulto crónico puede modificar sustancialmente el funcionamiento de este órgano, y esta sensibilidad aumenta con la edad. Uno de los factores clave en la progresión de la EHA es el estrés oxidante debido a que el consumo incrementa las ERO, que oxida las biomoléculas, disminuyen la defensa antioxidante y como resultado, altera el funcionamiento hepático.

Por su parte, la NXN, una enzima multifuncional redox sensible que actúa como oxidorreductasa, regula las ERO, y mantiene la integridad de los sistemas antioxidantes mediante la regulación de diferentes procesos celulares clave a través de las interacciones proteína-proteína redox sensibles, que dependen en gran medida del estado redox de las células. Por lo tanto, un área inexplorada es descubrir si las interacciones dependientes de la NXN son alteradas por el estrés oxidante inducido durante el envejecimiento y potenciadas por el consumo crónico de etanol en el hígado del ratón.

4 HIPOTESIS

El consumo crónico de etanol potencia las alteraciones de las interacciones proteína-proteína dependientes de la NXN, iniciadas por el envejecimiento en el hígado del ratón.

Las bases que respaldan dicha hipótesis es que la NXN regula la homeostasis redox celular y el consumo crónico de etanol genera un desbalance redox que puede alterar la proporción de interacciones redox sensibles de diferentes proteínas implicadas en la regulación de vías de señalización importantes para el mantenimiento fisiológico de los tejidos envejecidos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la participación de la NXN en consumo crónico de etanol durante el envejecimiento en el hígado de ratón.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar las alteraciones celulares promovidas por la EHA durante el envejecimiento en el hígado de ratón.
- Validar marcadores de senescencia celular modificados por la EHA durante el envejecimiento en el hígado de ratón.
- Determinar el estatus de interacción proteína-proteína dependiente de la NXN durante la EHA en el envejecimiento en el hígado de ratón.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Modelo experimental

Para determinar el efecto que ejercen los estímulos oxidantes sobre la expresión de la NXN y de algunas proteínas con las que interactúa, tres grupos de ratones fueron sometidos a una cinética de administración de etanol. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, por medio de las especificaciones de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 correspondiente a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Se realizó una evaluación constante de los signos clínicos que nos permitieron determinar el punto final humanitario establecido por el Consejo Canadiense de Cuidado de los Animales. Brevemente, los criterios del punto final humanitario establecen que los animales de experimentación deben ser retirados en el momento en que presenten signos característicos del deterioro de su bienestar, sufrimiento excesivo e injustificado, o incompatibilidad con la vida, que puedan alejarnos a su vez del objetivo principal de la investigación.

Los ratones fueron proporcionados por la Unidad Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN para ser utilizados exclusivamente de acuerdo al protocolo experimental número 0114-14, autorizado después de una rigurosa evaluación realizada por el comité de ética institucional. Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron aclimatados y alimentados *ad libitum* en un ambiente controlado de 12 horas luz/oscuridad y una temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.2 Modelo de la EHA

Brevemente, ratones ($n = 5$ por grupo) de 7 semanas, 12 meses y 18 meses de edad fueron sometidos al consumo de etanol al 20% en una solución de sacarosa al 20% durante 8 semanas. Cada animal recibió una dosis única de LPS (1 mg/kg, ip) en la última semana del consumo de etanol. La dosis de LPS se seleccionó con base en investigaciones previas que evaluaron el efecto agudo del LPS en modelos de EHA. Adicionalmente, se incluyeron grupos controles de 7 semanas, 12 meses y 18 meses de edad, los cuales no fueron sometidos al consumo de etanol y no recibieron la administración del LPS (**Figura 6**).

Tanto a los animales de control como a los sometidos al modelo experimental se les practicó la eutanasia por punción cardíaca bajo anestesia con isoflurano; inmediatamente, se dividieron trozos de hígado para aislar las proteínas y se congelaron en nitrógeno líquido para su criopreservación y se almacenaron a -80°C .

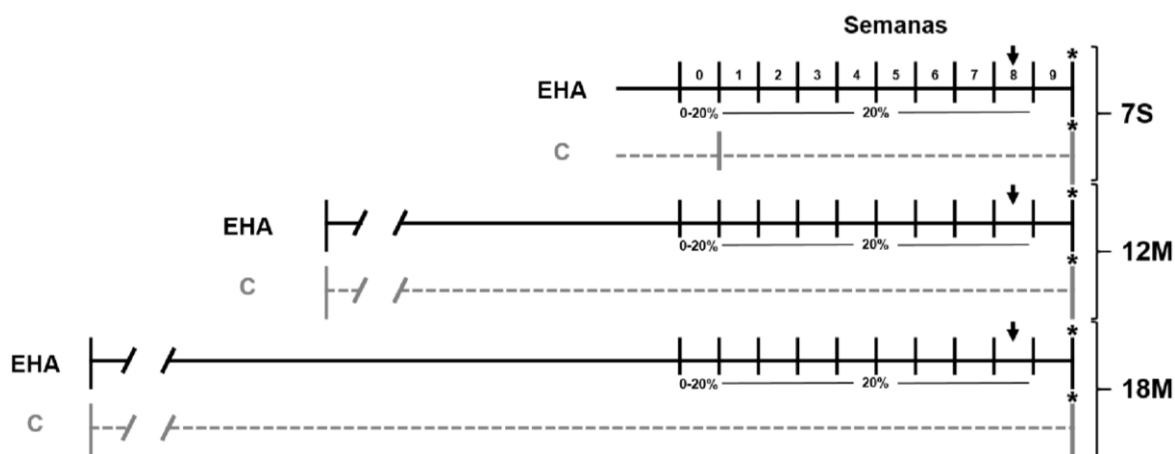


Figura 6. Representación esquemática del modelo de EHA en ratones jóvenes y envejecidos. Los grupos de animales representados por líneas negras continuas recibieron etanol al 20% (v/v) durante 8 semanas, posteriormente recibieron una dosis única de LPS (1 mg/kg, i.p.) en la última semana, indicado con una flecha negra. Los grupos de animales representados por líneas grises discontinuas no recibieron ni etanol ni LPS. Todos los animales fueron sacrificados una semana después de finalizar el consumo de etanol, indicado con un asterisco (*). $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

6.2.1 Obtención de las muestras

Durante la eutanasia, parte del tejido hepático fue recuperado y conservado en formaldehído al 4%; otra parte fue recuperada en láminas de corcho de 2 x 2 cm, sumergidas en 2-metilbutano frío. Además, trozos del tejido hepático fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido para su criopreservación, y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

6.3 Análisis histopatológico y de inmunodetección

Los tejidos hepáticos fijados en formaldehído al 4% se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 3 μm de grosor, se desparafinaron y se rehidrataron gradualmente. Para el examen histológico y la detección de la fibrosis, las secciones se procesaron mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson (T-Ms), respectivamente.

Para la inmunohistoquímica (IHQ) se realizaron cortes de 5 μm , de cada uno de los hígados. Brevemente, el protocolo inicia después de que los tejidos son desparafinados, posteriormente los tejidos fueron colocados en buffer de exposición de antígeno Tris-EDTA pH 9.0 (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 1.21 g de Tris base, 0.37 g de EDTA, y 0.5 mL de Tween 20, posteriormente se ajustó el pH), en baño maría mediante una olla de presión durante 30 minutos. El buffer se dejó enfriar con los tejidos y se cambió por agua desionizada. Posteriormente, los tejidos se lavaron con TBST 1X, y se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con el Kit Mouse/Rabbit inmunodetector HRP/DAB (BSB 0005, BioSB; Santa Barbara, CA, EE.UU.), durante 30 minutos, concluido el bloqueo, los tejidos se lavaron con TBST 1X. Se realizó un segundo bloqueo con albúmina de suero bovino (ASB) al 1% diluida en TBST 1X durante 30 minutos;

posteriormente, los tejidos se lavaron una vez más con TBST 1X y se incubaron en una cámara húmeda con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 1**) diluido en TBST 1X a 4°C durante toda la noche.

Concluida la incubación con el anticuerpo primario los tejidos se lavaron con TBST 1X, y se incubaron con el Streptavidin HRP/AP (BSB 0005, BioSB; Santa Barbara, CA, EE.UU.), a temperatura ambiente, durante 30 minutos y se realizó un lavado más con TBST 1X. El revelado se realizó con 1 mL del buffer DAB-Sustrato más una gota de DAB-Cromógeno del Kit de inmunodetección (BSB 0005, BioSB; Santa Barbara, CA, EE.UU.). Los tejidos se observaron al microscopio hasta que la señal apareció, en un tiempo aproximado de 15 segundos a 1 minuto; posteriormente, se removió la solución de revelado de los tejidos con agua destilada. Por último, los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y montados con el medio Fluoroshield Mounting Medium (ab104137; Abcam. Cambridge, MA; EE.UU.).

Para el análisis de inmunofluorescencia (IF), los tejidos se incubaron con Rodent Decloaker 1X (RD913; BioCare Medical. Concord, CA; EE.UU.) en baño maría mediante una olla de presión durante 30 minutos para exponer epítomos. El buffer se dejó enfriar con los tejidos y se cambió por agua desionizada. Posteriormente, los tejidos se lavaron con TBST 1X, y se incubaron los anticuerpos primarios anti-Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), anticuerpo anti-Poly ADP-ribosa (PAR) y anticuerpo anti-pH2A.X (**Tabla 1**) durante la noche a 4°C; a continuación, los tejidos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad con el anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-ratón 1:300 (ab150112; Abcam. Cambridge, MA; EE.UU.). Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:1000, 62247; Thermo Scientific; Rockford, IL; EE.UU.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por

último, los tejidos se lavaron con TBST 1X, escurrieron y fijaron con el medio de montaje Fluoroshield Mounting Medium (ab104137; Abcam. Cambridge, MA; EE.UU.). Para la cuantificación de los núcleos positivos, se capturaron 10 campos 20X seleccionados al azar por muestra individual, obteniendo 50 imágenes por grupo y un total de 150 imágenes. Los núcleos positivos se cuantificaron con el software ImageJ 1.5 (Schneider et al., 2012). Las imágenes para los análisis de IHQ e IF se capturaron con un microscopio ZEISS Axio-A1.

Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa	No catalogo
Colageno 1 A1 (COL1A1)	Conejo	1:200	Genetex	GTX112731
Colageno 3 A1 (COL3A1)	Conejo	1:200	Novus Biologicals	NB600-594SS
KI67 (SP6)	Conejo	1:150	Genetex	GTX16667
IL-6	Conejo	1:200	Proteintech	21865-1-AP
pH2A.X	Conejo	1:300	Cell Signaling	2577S
PAR	Conejo	1:200	Enzo	ALX804220R100
PCNA (PC10)	Ratón	1:200	Invitrogen	13-3900

El doble marcaje para detectar la NXN y la pH2A.X se realizó mediante el protocolo de IF en tejidos congelados. Las secciones de hígado congeladas de 8 µm de grosor se lavaron dos veces en Buffer de fosfato salino (PBS) 1X frío, se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 50 minutos en solución de lavado [0,25% Triton X-100 en PBS (PBST)]. Las secciones se bloquearon con ASB al 1%

en PBST durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó el anticuerpo primario anti-pH2A.X (Ser139) (1:50, 2577S; Cell Signaling; Danvers, MA, EE.UU.) durante una noche a 4°C en la solución de bloqueo. Tras el lavado, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:400, ab150077; Abcam; Cambridge, MA, EE.UU.) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se incubó el anticuerpo anti-NXN (1:25, GTX107039; GeneTex; Irvine, CA, EE.UU.) durante 2 horas a 4°C en una solución de bloqueo. Tras el lavado, las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 568 (1:1000, A-11079; Thermo Scientific; Rockford, IL, EE.UU.) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:1000, 62247; Thermo Scientific; Rockford, IL, EE.UU.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, los tejidos se lavaron con PBST, se escurrieron y se fijaron con Fluoroshield Mounting Medium (ab104137; Abcam; Cambridge, MA, EE.UU.). Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 AOBS (Acousto-optical Beam Splitter) DMI6000 (Wetzlar; DE), proporcionado por la Unidad de Microscopía Confocal del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN (México, Ciudad de México).

6.4 Ensayo TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)

El ensayo TUNEL se realizó con el kit Click-It TUNEL Alexa Fluor Imaging (C10245, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), con algunas modificaciones. Brevemente, tras la rehidratación, los tejidos en fresco se fijaron con formalina al 4% recién preparada, durante 15 minutos a 37°C y se lavaron sumergiéndolos dos veces en PBS durante 5 minutos cada una. A continuación, las secciones se

permeabilizaron con proteinasa K (4485228, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 20 minutos y los portaobjetos se lavan en PBS durante 5 minutos, para posteriormente mantenerlos en agua desionizada durante 5 minutos. A continuación, el ADN fragmentado se detectó como se indica en el kit Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging, con la solución Hoechst 33342 durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz, y los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS; finalmente, se fijaron con Fluoroshield Mounting Medium (ab104137; Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). Se procesó un control negativo al añadir la mezcla de reacción sin enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, así como un control positivo tratado con la enzima DNasa I (C10245; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) en una concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos para inducir roturas de la cadena de ADN. La detección de la marca y las imágenes se capturaron con el microscopio confocal Leica TCS SP8 Acousto-optical Beam Splitter (DMI6000; Wetzlar, DE), proporcionado por la Unidad de Microscopía Confocal del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN (México, Ciudad de México).

6.5 Actividad in situ de la SA- β -gal

La detección de la SA- β -gal se realizó como se ha descrito previamente (Dimri *et al.*, 1995). Brevemente, se montaron secciones de hígado congeladas de 10 μm de grosor en portaobjetos de vidrio, se fijaron con la solución fijadora (1 mM MgCl_2 , 0,1 M EGTA y 0,2% de glutaraldehído) durante 5 minutos, se lavaron con agua desionizada y se incubaron a 37°C durante 24 horas con la solución de tinción de β -gal (0,4 M de buffer ácido cítrico/sodio fosfato, pH 6; 5 mM de ferrocianuro de potásico, 5 mM de ferricianuro de potásico, 1M de MgCl_2 y 1 mg/mL de X-gal), y se

realizó un lavado con TBST 1X. A continuación, las secciones se contratiñeron con hematoxilina, y las áreas con células SA- β -gal-positivas se capturaron en 20 campos de 40 $\times$ seleccionados al azar por muestra individual, es decir, 100 imágenes por grupo de tratamiento. Las imágenes se tomaron con un microscopio ZEISS Axio-A1 (Oberkochen, BW; DE).

Para detectar la co-localización entre la actividad SA- β -gal con la proteína NXN en la misma sección de tejido, se trataron secciones congeladas como se describió previamente (Idelfonso-Garcia *et al.*, 2024). Brevemente, tras la incubación con la solución de tinción β -gal, las secciones se bloquearon con ASB al 1% en PBS durante 2 horas y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo anti-NXN (1:150; GTX107039, GeneTex; Irvine, CA, EE.UU.). Posteriormente, se bloqueó con la peroxidasa endógena (BSB 0005, BioSB; Santa Barbara, CA, EE.UU.) durante 12 minutos a temperatura ambiente; las secciones se lavaron con PBS y se incubó la biotina durante 10 minutos; a continuación, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados incluidos en el kit InmunoDetector HRP-label y el DAB-Plus Substrate (BSB 0005, BioSB; Santa Barbara, CA, EE.UU.) para detectar la señal. Finalmente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina, y las áreas con el doble marcaje para las células SA- β -gal-positivas y con señal para la NXN se capturaron en 10 campos de 40 $\times$ y 100 $\times$ seleccionados aleatoriamente por muestra individual, con un total de 50 imágenes por grupo de tratamiento. Las imágenes se capturaron con un microscopio ZEISS Axio-A1 (Oberkochen, DE).

6.6 Determinación de proteína total por Western Blot (WB)

6.6.1 Extracción de proteína

Se procesaron 50 mg de tejido en un homogeneizador GLAS-COL 099C K64, con 0.5 mL de buffer de lisis no desnaturizante (Tris-HCl 20 mM, pH 7.8, NaCl 137 mM, 10% de glicerol, 1% Nonidet P40, EDTA 2 mM, Na₃VO₄ 2 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas (05892970001; Merck; Darmstadt, HE; DE)). El homogeneizado se mantuvo en agitación en una plataforma oscilante durante 20 minutos a 4°C; posteriormente, se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf de 1.5 mL, el cual fue centrifugado a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La muestra se centrifugo por segunda vez para eliminar cualquier residuo de grasa. Finalmente, las proteínas se cuantificaron de acuerdo al protocolo de ácido bicinconínico o ABC (B9643; Sigma-Aldrich, Purchase, NY; EE.UU.)

6.6.2 Cuantificación de proteína

Las muestras correspondientes a cada uno de los tiempos de eutanasia, fueron diluidas en una proporción 1:15 (28 µL de Buffer de lisis + 2 µL de muestra tratada). La curva estándar de calibración se realizó a partir de diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de ASB de 2 µg/µL, compuesta por 9 puntos, identificados de la A la I. En tubos eppendorf de 0.6 mL se preparó una mezcla de 50 µL de cada uno de los elementos tanto de las muestras como de la curva estándar, más 200 µL de una mezcla de ABC y sulfato de cobre (Relación 50:1). Dicha mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se realizó la lectura a 562 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTek; Colmar; FR)

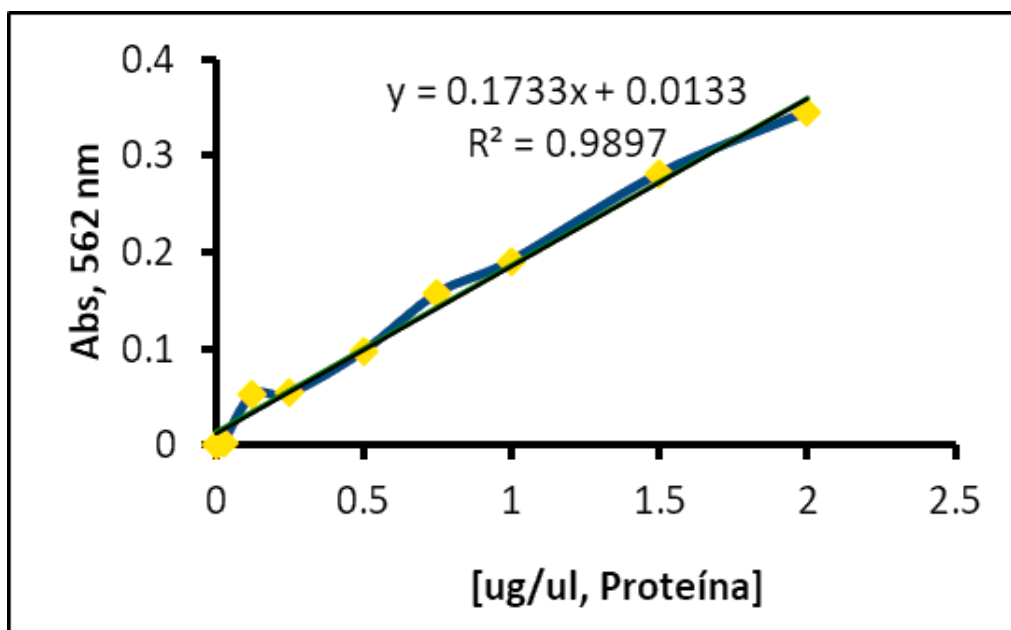


Figura 7. Curva estándar para la cuantificación de proteínas. La gráfica muestra los valores de las absorbancias por concentración estándar de la ASB.

Posterior a la cuantificación se colocó a cada una de las muestras 25 μ L de buffer de carga 5X Laemmli, y se calentaron en un thermoblock Stat Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 95°C por 10 minutos. Inmediatamente después las muestras fueron almacenadas a -70°C para su posterior análisis.

6.6.3 Análisis por WB desnaturalizante (SDS page)

El WB es una técnica que se emplea para el análisis de proteínas específicas dentro de una muestra biológica. La técnica se fundamenta en que todas las proteínas presentan una carga eléctrica neta y se encuentran en una solución con un pH diferente al de su punto isoeléctrico, de esta forma, al ser sometidas a un campo eléctrico, éstas se desplazan hacia un polo y se distribuyen de acuerdo a su tamaño.

6.6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, mediante el sistema MiniProtean de BioRad para geles de 1.5 mm con 10 pozos. Se cargaron 30 μ g de

proteína en cada pozo, con un volumen correspondiente según los valores de la cuantificación. La electroforesis se realizó inicialmente a 70 V, una vez observado el frente de corrida en el gel separador se cambió a 120 V, y la corrida se detuvo a las 2 horas aproximadamente. Se utilizó el buffer de corrida (BC) 1X a partir de un stock 10X (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 30 g de Tris base, 144 g de Glicina y 10 g de SDS). Una vez concluido la electroforesis se procedió con la transferencia.

6.6.5 Transferencia de proteínas a membrana

Los geles resultantes de la electroforesis fueron transferidos a membranas de PVDF previamente activadas en metanol durante 2 minutos, se realizó el ensamblaje de los casetes de transferencia en el orden correspondiente (Ánodo - esponja - filtro - membrana - gel - filtro - esponja - cátodo), sumergidos en buffer de transferencia (BT) 1X a partir de un stock 10X (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 30.2 g de Tris base y 144.2 g de Glicina). La transferencia se realizó en un sistema húmedo de electrotransferencia, con una fuente de poder a 0.25 A (250 mA) durante 2.5 horas. Concluida la transferencia, las membranas fueron bloqueadas en una solución de TBST 1X y leche al 5%. El bloqueo de las membranas se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Terminado el bloqueo, se realizaron 3 lavados en TBST 1X, cada uno de 5 minutos.

6.6.6 Inmunodetección en membrana de las proteínas de interés

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario, durante una noche a 4°C, en agitación constante. El anticuerpo primario se diluyó en una solución de TBST 1X y 5% de leche (**Tabla 2**). Concluida la incubación, el anticuerpo primario

fue retirado, y las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en TBST 1X. Posteriormente, la incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante. De acuerdo a cada anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el cual fue diluido en una solución de TBST 1X y 5% de leche (Tabla 3). Para normalizar la proteína se utilizó a la Glutaraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) debido a su estabilidad y que no presenta cambios en condiciones fisiológicas (Li & Shen, 2013; Nie *et al.*, 2017).

Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Pm (KDa)	Especie	Dilución	Empresa	No catalogo
pH2A.X	15	Conejo	1:2500	Cell Signalling	2577S
NXN	48	Conejo	1:4000	Gene Tex	GTX107039
NXN	54	Conejo	1:4000	Novus Biologicals	AF-5718
FLII	145	Ratón	1:3000	Santa Cruz B.	SC-21716
MYD88	33	Ratón	1:4000	Cell Signaling	4283S
CAMK2A	56	Conejo	1:3000	Merck	SAB4503250
PFK1	85	Ratón	1:4000	Santa Cruz B.	SC-166722
Ig-HC	36	Ratón	1:5000	Proteintech	66009- 1-Ig
GAPDH	36	Ratón	1:5000	Santa Cruz B.	SC-51905

Por último, para determinar la presencia de la proteína de acuerdo al peso molecular conocido, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con el Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Thermo Scientific; Rockford,

IL, EE.UU.), en un fotodocumentador mini HG9 de Uvitec Cambridge. Las imágenes fueron obtenidas a tiempos de exposición de 30 segundos a 5 minutos.

Tabla 3. Características de los anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Empresa	No catalogo
Anti- Ratón	1:10000	Jackson	115-035-174
Anti-Conejo	1:10000	Jackson	211-032-171

6.7 Ensayo de Inmunoprecipitación (IP)

Se utilizaron 3 mg de proteína total por muestra. Las proteínas totales de los tejidos hepáticos se procesaron en tampón de lisis que contenía 20 mmol/L Tris-Cl, pH 7,8, 137 mmol/L NaCl, 1% (v/v) Nonidet P40, 10% (v/v) glicerol, 2 mmol/L EDTA (todos de Sigma-Aldrich, Purchase, NY; EE.UU.), y se suministraron con Complete y PhoSTOP (Roche; Basel, CH). Las proteínas de interés se inmunoprecipitaron con una mezcla de perlas en complejo de proteína A/G Plus-Agarosa (sc2003, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA; EE.UU.) y el anticuerpo anti-NXN de conejo (GTX107039; GeneTex; Irvine, CA; EE.UU.). Las proteínas precipitadas y coprecipitadas se analizaron por WB y se normalizó con las regiones constantes (cadenas pesadas) de las inmunoglobulinas utilizadas para el ensayo de IP.

Para revelar las proteínas precipitadas y coprecipitadas, se utilizaron los anticuerpos anti-NXN (AF-5718; Novus Biologicals; Centennial, CO; EE.UU.), anticuerpo anti-FLII (sc-21716; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA; EE.UU.), anticuerpo anti-MYD88 (4283S; Cell Signaling Danvers, MA; EE.UU.), anticuerpo anti-CAMK2A (SAB4503250; Merck; Darmstadt, HE; DE), anticuerpo anti-PFK1 (sc-166722; Santa

Cruz) y el anticuerpo anti-ratón (66009- 1-Ig, Proteintech; Rosemont, IL; EE.UU.). Para evitar la reactividad cruzada con las cadenas pesadas o ligeras desnaturalizadas de los anticuerpos utilizados para el ensayo IP, se incubaron anticuerpos secundarios específicos de las cadenas ligeras de los anticuerpos cabra anti-ratón y de ratón anti-conejo (115-035-174 y 211-032-171, respectivamente. Jackson ImmunoRes Lab, Baltimore, PA; EE.UU.).

6.8 Determinación de proteínas oxidadas

El contenido de carbonilo de las proteínas se detectó con el kit de oxidación de proteínas OxyBlot (S7150; Sigma-Aldrich, Purchase, NY; EE.UU.) con pequeñas modificaciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para derivatizar el grupo carbonilo para la detección por WB, se mezclaron volúmenes iguales de lisado tisular (10 mg/mL) y SDS al 12%, seguido de la adición de 2 volúmenes de 20 mM de dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) en ácido trifluoroacético al 10%. La mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añadió una solución de neutralización del kit Oxyblot para detener la reacción. Se incluyó un control no derivado por grupo. El anticuerpo primario fue un anticuerpo policlonal de conejo contra dinitrofenilhidrazona (DNP, S7150) y se utilizó a una dilución de 1:150. El anticuerpo secundario conjugado con HRP (S7150) se utilizó a una dilución de 1:300.

6.9 Análisis densitométrico

La cuantificación de las imágenes correspondientes de las muestras del modelo de EHA y su respectivo control fueron analizadas por densitometría con el software para procesamiento de imágenes Imagen J, del National Institutes of Health, versión 1.50.

6.10 Análisis estadístico

Se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples, o la prueba t de Student para comparar sólo dos grupos. Los experimentos en ratones fueron realizados en grupos de 5 ratones para el modelo de EHA y de sus respectivos controles. Las diferencias se consideran significativas con el calor de $p < 0.05$.

7 RESULTADOS

7.1 El consumo crónico de etanol incrementa el peso corporal y el peso relativo del hígado durante el envejecimiento en los ratones

Aunque los ratones envejecidos sometidos al modelo de EHA registraron pesos corporales más elevados (ambos $p < 0.0001$) al final del consumo de etanol, es decir, los ratones de 12 y 18 meses, en comparación con el inicio del tratamiento, los pesos de los animales de los grupos control también aumentaron significativamente (ambos $p < 0.0001$). El peso corporal de los animales jóvenes no fue diferente al final del experimento. Curiosamente, el porcentaje del peso relativo del hígado sólo aumentó en los ratones de 18 meses sometidos al modelo de EHA ($p < 0.0001$) en comparación con su respectivo control (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efecto del consumo crónico de etanol sobre el peso corporal y el peso relativo del hígado de los ratones.

Grupo	Edad	Peso corporal (g)		Porcentaje del peso relativo del hígado
		Inicial	Final	
C	7S	15.28 ± 0.16	15.64 ± 0.14	5.53 ± 0.12
	12M	24.93 ± 2.60	29.92 ± 1.39 *	5.65 ± 0.66
	18M	32.00 ± 2.08	36.00 ± 1.05 *	4.38 ± 0.28
EHA	7S	17.66 ± 0.37	18.44 ± 0.30	4.97 ± 0.16
	12M	26.40 ± 0.58	30.34 ± 0.81 *	6.14 ± 0.31
	18M	26.92 ± 0.68	30.30 ± 0.47 *	6.25 ± 0.64 \$

Los valores representan la media ± ES. *Estadísticamente diferente del peso corporal inicial; \$Estadísticamente diferente de su respectivo grupo control; $p < 0.0001$.

7.2 El consumo crónico de etanol modifica los componentes de la MEC durante el envejecimiento

En el hígado normal, la arquitectura celular y los componentes de la MEC están perfectamente organizados en membranas basales que rodean los tractos portales y la vena central, estas membranas se componen principalmente de colágeno y laminina (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). El análisis histopatológico mediante la tinción de H&E mostró un leve infiltrado inflamatorio junto con una desorganización de los cordones hepáticos. Las células alteradas mostraron un aumento en el tamaño de sus núcleos y citoplasma con núcleos hipocromáticos en ratones de 18 meses de edad tanto del grupo control como del grupo de EHA (**Figura 8**).

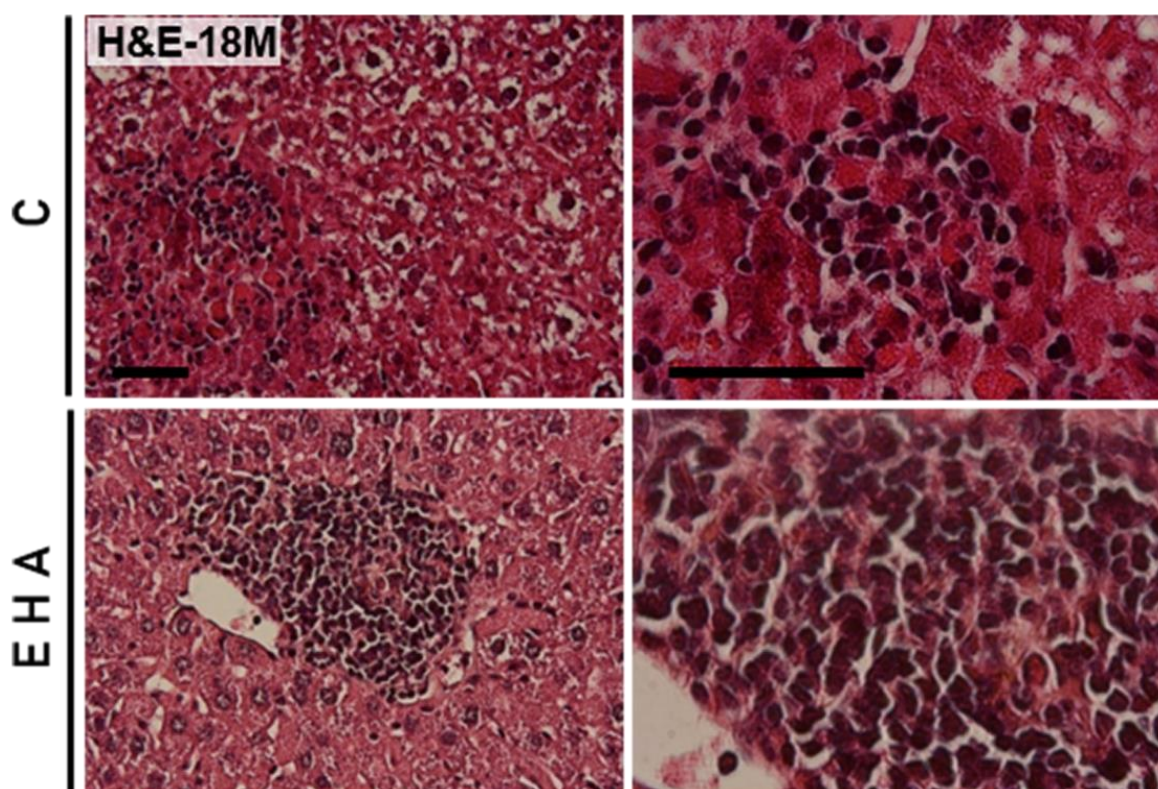


Figura 8. Determinación de la integridad del tejido hepático de ratones envejecidos. Tinción de H&E. La ampliación es de 40 y 100×. Barra indica 50 µm.

La fibrosis hepática y la cirrosis alcohólica son afecciones asociadas con una síntesis y depósito excesivos de componentes del tejido conectivo, especialmente colágenos fibrilares en el parénquima del tejido hepático (Hernandez-Gea & Friedman, 2011). Tanto la fibrosis hepática como la cirrosis alcohólica son enfermedades debilitantes y potencialmente mortales y conducir al desarrollo de CHC (Nangliya *et al.*, 2015). Las regiones fibróticas del hígado se visualizaron mediante el método T-Ms, que tiñe las fibras de colágeno de azul y los tejidos normales de rojo. Como se muestra en la **Figura 9**, la tinción T-Ms reveló una ligera señal de fibras de colágeno en los tejidos hepáticos de ratones de 18 meses sometidos al modelo de EHA.

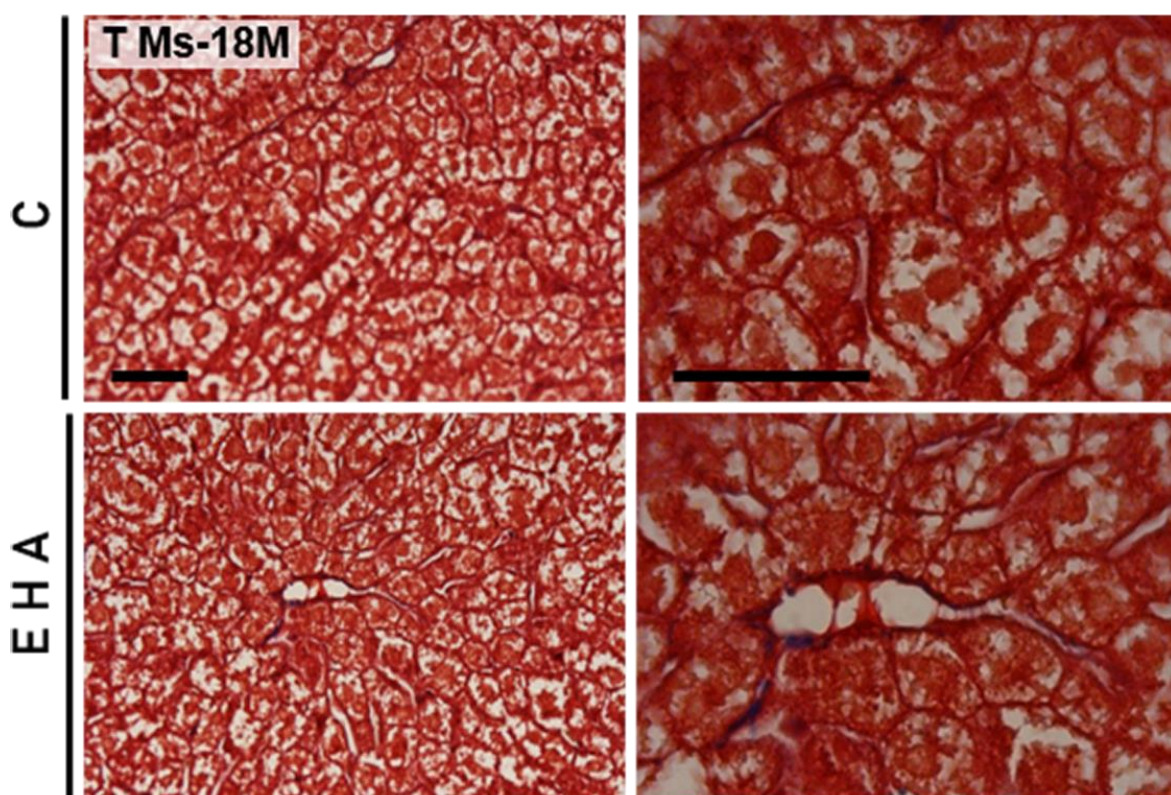


Figura 9. Determinación de los componentes de la MEC en el hígado de ratones envejecidos. Tinción de T Ms. La ampliación es de 40 y 100×. Barra de escala indica 50 μ m.

A continuación, mediante análisis de IHQ, analizamos los niveles de COL1A1 y COL3A1, dos componentes clave de la MEC alterados durante la progresión de la fibrosis hepática (Karsdal *et al.*, 2020). Como se muestra en la **Figura 10A**, el nivel de COL1A1 aumentó significativamente ($p = 0.0158$) en los ratones control de 12 meses en comparación con los ratones control jóvenes, es decir, ratones de 7 semanas; en particular, en el modelo de EHA, la COL1A1 aumentó en los ratones de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$). Por el contrario, el nivel de la COL3A1 (**Figura 10B**) en los ratones control de 12 y 18 meses aumentó significativamente (ambos $p < 0.0001$), pero en el modelo de EHA, el nivel de la COL3A1 disminuyó ($p < 0.0001$) en los ratones de 12 y 18 meses en comparación con los ratones jóvenes sometidos al modelo de EHA.

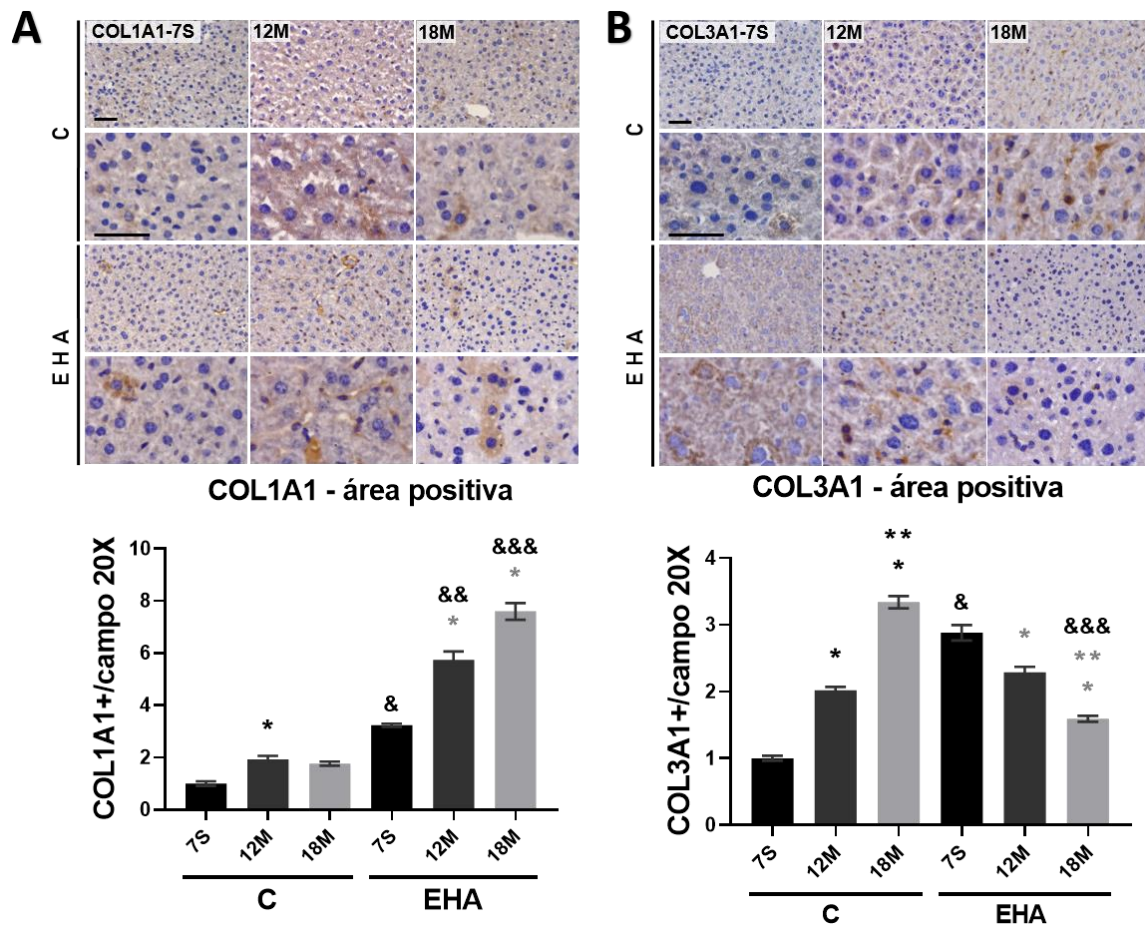


Figura 10. Determinación de los componentes de la MEC en el hígado de ratones envejecidos. Análisis de IHQ y cuantificación de la señal de las proteínas COL1A1 y COL3A1. La ampliación es de 40 y 100 $\times$. Barra indica 50 μ m. Las gráficas representan la media $\pm$ SE. *Significativamente diferente de 7W, **de 12M en comparación con el grupo C, *de 7W, **de 12M en comparación con el grupo EHA, & de 7W, && de 12M, &&& de 18M en comparación con el grupo de control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7W: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

7.3 La proliferación celular aumenta con el consumo crónico de etanol durante el envejecimiento

Está demostrado que la capacidad regenerativa del hígado disminuye con la edad (Tang *et al.*, 2022). Por lo tanto, para determinar el efecto del consumo crónico de etanol en hígados envejecidos, medimos los niveles de los marcadores de proliferación PCNA y KI67. El análisis de IF reveló que el número de células PCNA-positivas disminuyeron tanto en los ratones control de 12 como de 18 meses (ambos

$p < 0.0001$) en comparación con los animales control jóvenes; sin embargo, el modelo de EHA aumentó las células PCNA-positivas en los ratones de 18 meses ($p = 0.0472$), pero en los ratones de 12 meses disminuyó ($p = 0.0023$) en comparación con los animales jóvenes. Las células PCNA-positivas disminuyeron en los ratones de 7 semanas sometidos al modelo de EHA ($p < 0.0001$) en comparación con los respectivos controles jóvenes (**Figura 11**).

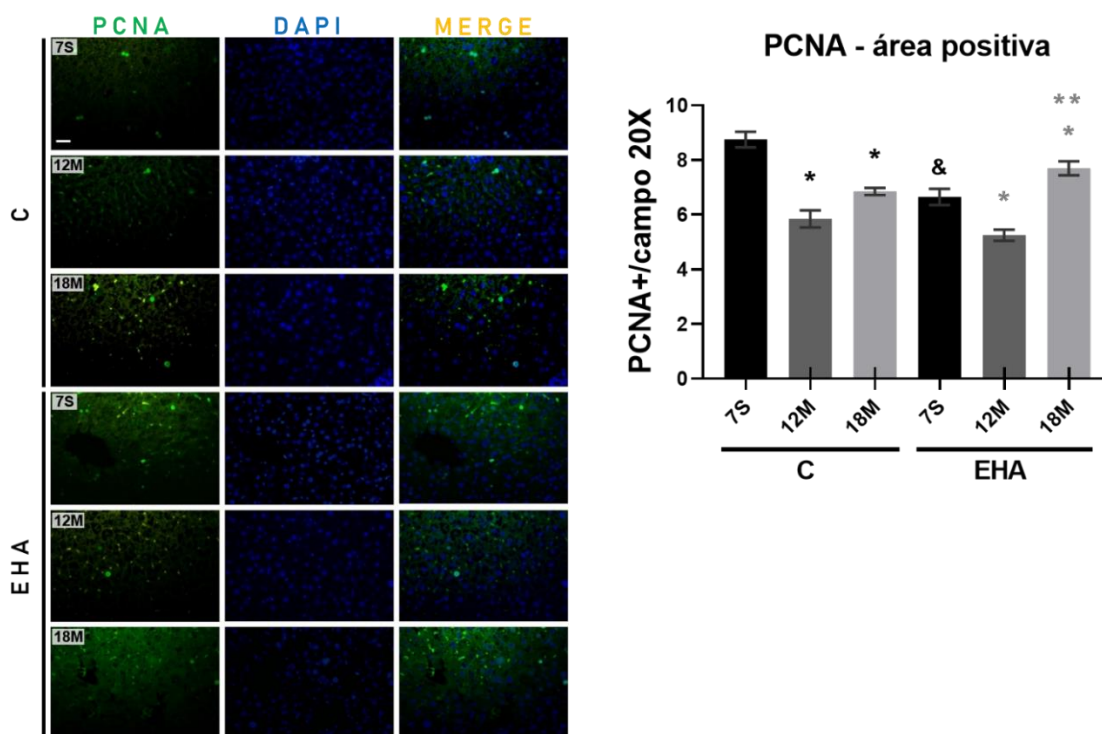


Figura 11. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la proliferación celular en el tejido hepático de ratones envejecidos. Análisis de IF y cuantificación de la señal de la proteína PCNA. La ampliación es de 20×. Barra indica 50 μ m. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo EHA, & de 7S de 18M en comparación con el grupo de control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

El análisis de IHQ reveló que el número de células KI67-positivas en los ratones control de 12 y 18 meses disminuyó (ambos $p < 0.0001$) en comparación con los animales control jóvenes, mientras que en el modelo de EHA, este número aumentó

($p < 0.0001$) en los ratones de 18 meses en comparación con los animales jóvenes. Por otra parte, los ratones jóvenes y los de 12 meses sometidos al modelo de EHA mostraron un número reducido de las células KI67-positivas ($p < 0.0001$ y $p = 0.0039$, respectivamente) en comparación con sus respectivos controles no tratados (Figura 12).

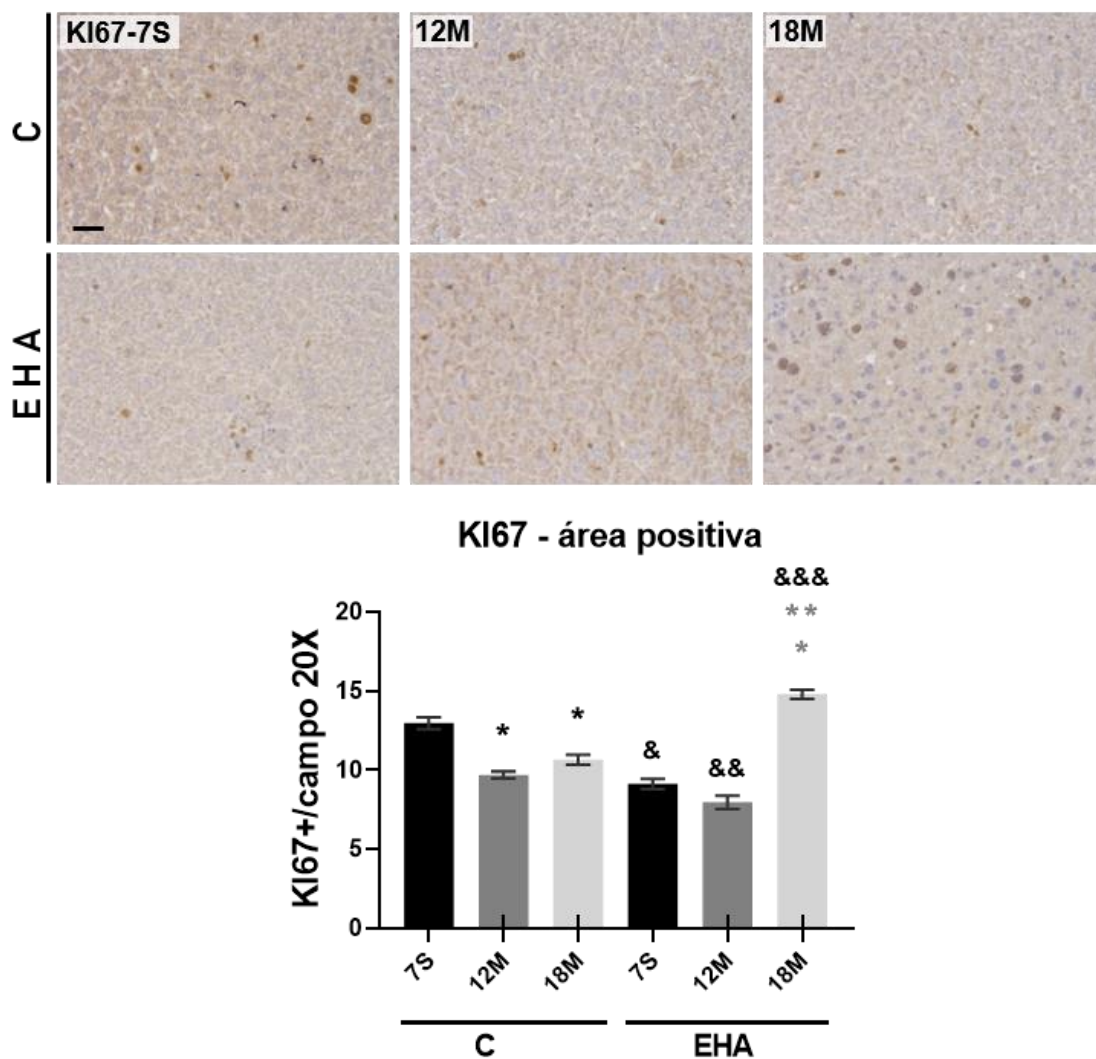


Figura 12. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la proliferación celular en el tejido hepático en ratones envejecidos. Análisis IHQ y cuantificación de la señal de la proteína KI67. La ampliación es de 20×. Barra de escala indica 50 μ m. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, & de 7S, && de 12M, &&& de 18M en comparación con el grupo control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

7.4 El consumo crónico de etanol incrementa un marcador de daño al ADN en el hígado de ratones envejecidos

Un acontecimiento temprano en la respuesta a la DSB es el rápido reclutamiento y activación de la Poly ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1), que resulta en la polimerización de la PAR, un marcador temprano de daño en el ADN, seguido por el reclutamiento de histonas en los sitios de daño para estimular la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN (Schreiber *et al.*, 2006). Para determinar el estado del daño en el ADN asociado al envejecimiento y/o promovido por el consumo crónico de etanol, cuantificamos las células PAR-positivas mediante análisis de IF. Los resultados mostraron que la PAR aumentó en los hígados de ratones control de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$) en comparación con los animales jóvenes. Cabe destacar que el modelo de EHA indujo niveles de la PAR en los hígados de ratones de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$) en comparación con los animales jóvenes, pero el modelo de EHA también indujo fuertemente los niveles de la PAR ($p < 0.0001$) en los ratones jóvenes en comparación con los animales control jóvenes, así como en los hígados de ratones de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$) en comparación con sus respectivos controles no tratados (Figura 13).

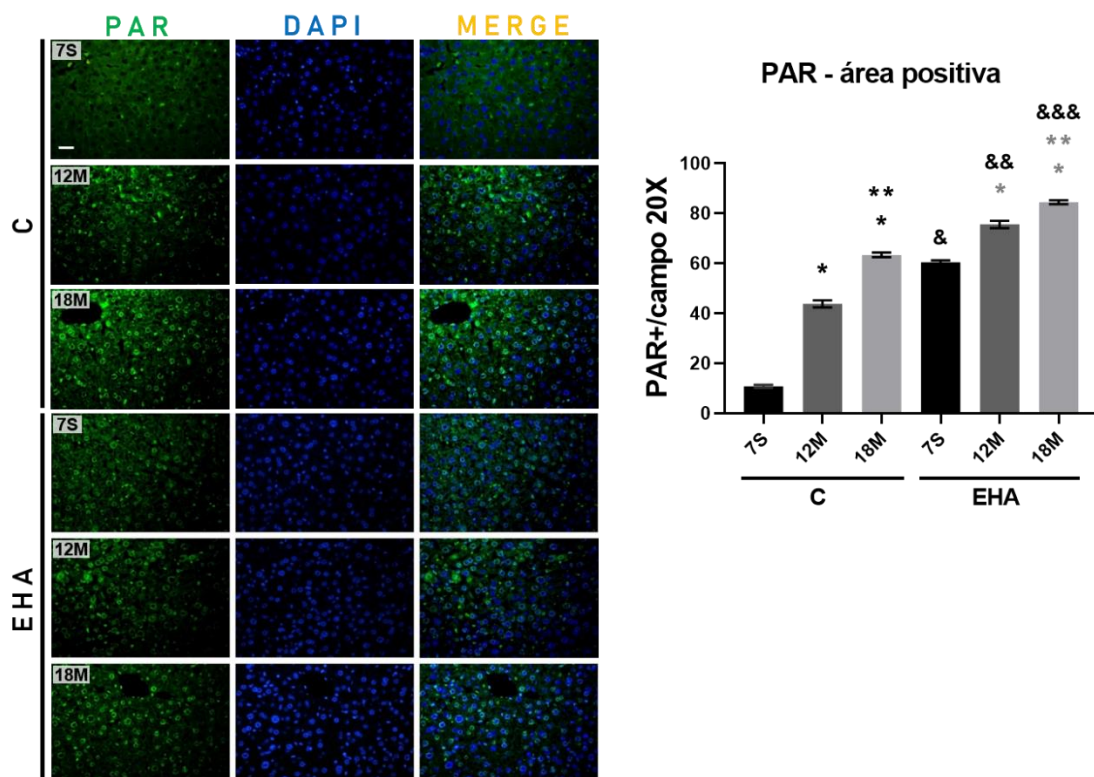


Figura 13. Determinación de marcadores de daño al ADN inducido por el consumo crónico de etanol en el hígado de ratones envejecidos. (A) Análisis IF y (B) cuantificación de la señal de la proteína PAR. La ampliación es de 20×. Barra de escala indica 50 μ m. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7W, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7W, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, & de 7W, && de 12M, &&& de 18M en comparación con su respectivo grupo control; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

7.5 El consumo crónico de etanol favorece la muerte de las células hepáticas de ratones envejecidos

El daño no resuelto al ADN puede afectar la función celular, promover el desarrollo de enfermedades y acelerar el envejecimiento (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Por lo tanto, determinamos la fragmentación del ADN, una característica clave de la apoptosis celular (Wang *et al.*, 2016), mediante el ensayo de TUNEL. Se detectó un aumento de células TUNEL-positivas en el hígado de los animales de 18 meses sometidos al modelo de EHA (**Figura 14**).

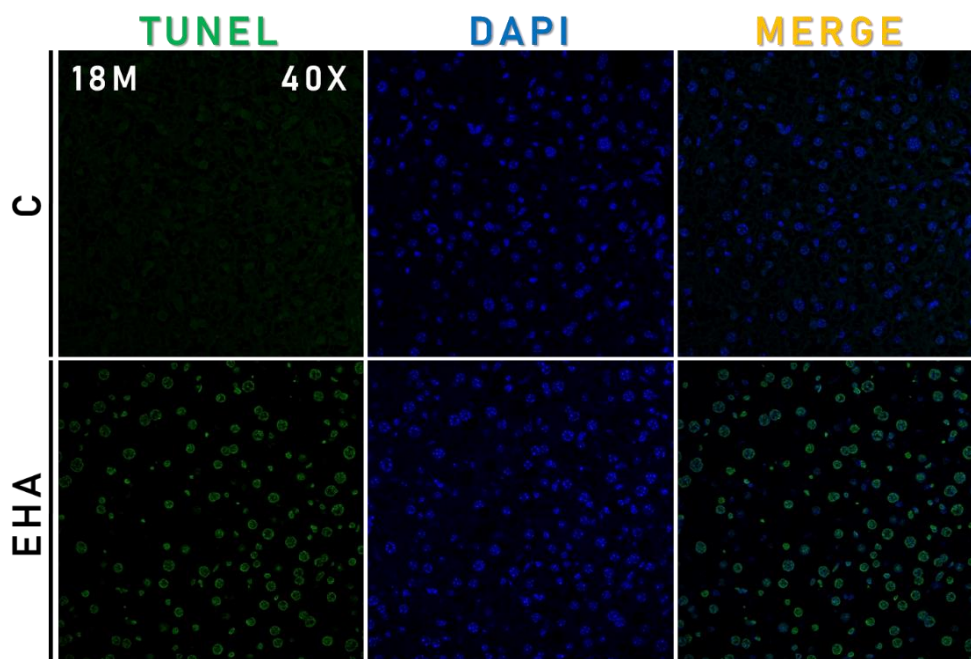


Figura 14. Efecto del modelo de EHA sobre la muerte celular en el hígado de ratones envejecidos. Ensayo de TUNEL. La ampliación es de 63×. Las imágenes muestran tejidos de ratones de 18 meses sin tratamiento y aquellos que se sometieron al modelo de EHA. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control. TUNEL: Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling.

7.6 El consumo crónico de etanol incrementa los marcadores de senescencia celular en el hígado de ratones envejecidos

Dado que no existe un único marcador inequívoco de senescencia celular, determinamos la presencia de varios marcadores bien conocidos asociados a este fenómeno, como la actividad de la SA- β -gal, la pH2A.X y la IL-6 (Kudlova *et al.*, 2022). Como era de esperar, el análisis histoquímico reveló que la actividad de la enzima SA- β -gal aumentó en los hígados de los ratones control de 18 meses de edad en comparación con los animales de 12 meses de edad y los animales jóvenes; curiosamente, la actividad de SA- β -gal fue fuertemente inducida en los hígados de los ratones de 12 y 18 meses de edad sometidos al modelo de EHA en comparación con los animales jóvenes y con sus respectivos controles no tratados

(Figura 15A). El análisis WB reveló que los niveles de la p^H2A.X aumentaron en los ratones control de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$); sin embargo, como se muestra en la Figura 15B, el consumo crónico de etanol indujo el nivel de esta proteína en todos los grupos de animales sometidos a este esquema, es decir, ratones de 7 semanas, 12 y 18 meses (todos $p < 0.0001$).

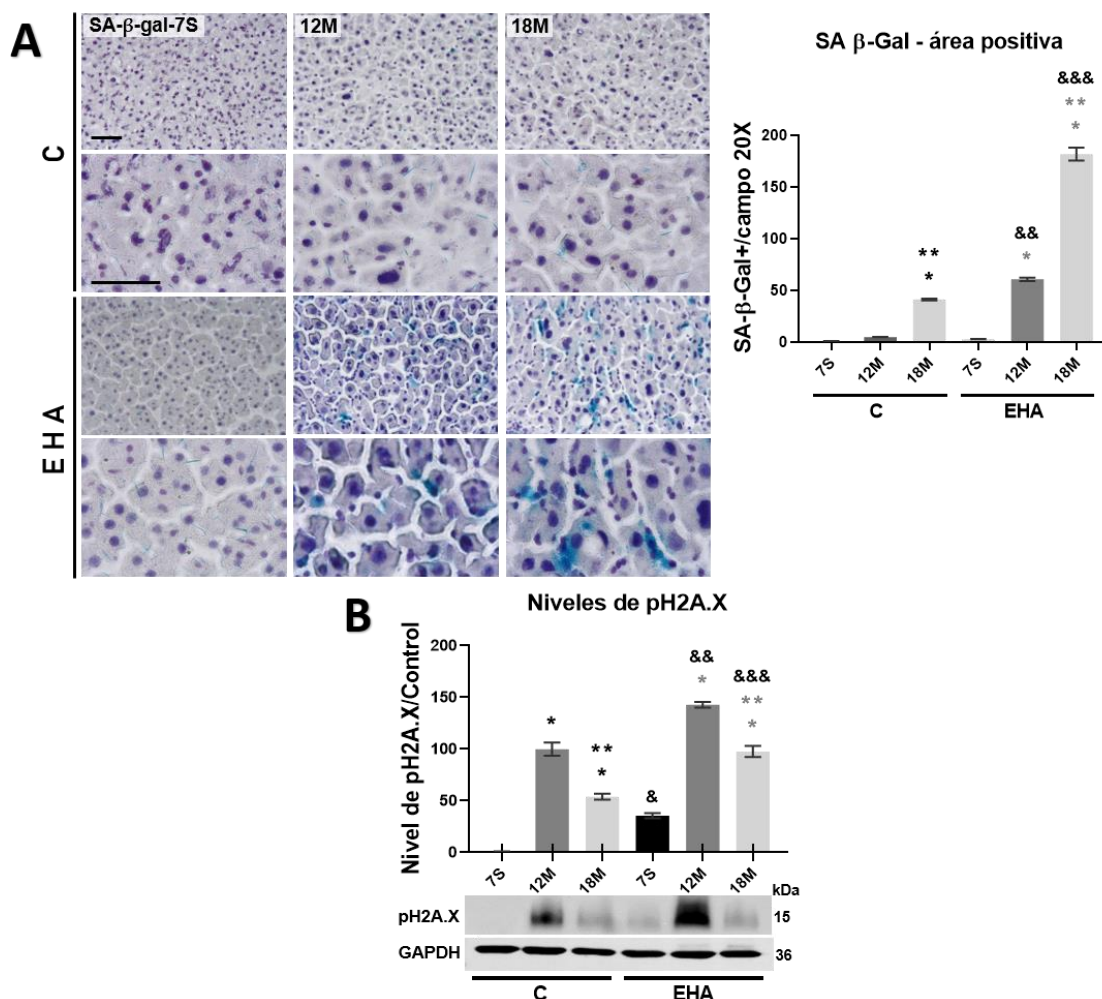


Figura 15. Determinación de marcadores de senescencia celular inducidos por el consumo crónico de etanol en el hígado de ratones envejecidos. (A) Análisis histoquímico y cuantificación de la señal de la actividad SA-β-gal. La ampliación es de 20 y 40×. Barra de escala indica 50 μm. (B) Análisis por WB y cuantificación de los niveles de la proteína p^H2A.X. Los niveles de proteína p^H2A.X se normalizaron con los de la proteína GAPDH, que se utilizó como control de carga. Las barras representan la media ± ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7W, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, & de 7W, && de 12M, &&& de 18M en comparación con su respectivo grupo control; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

La citocina proinflamatoria IL-6 está regulada positivamente en el SASP (Ghosh & Capell, 2016). El análisis de IHQ demostró que el área positiva para la IL-6 aumento en los hígados de los ratones control de 12 y 18 meses (ambos $p < 0.0001$) en comparación con los ratones jóvenes. El modelo de EHA aumentó su nivel sólo en los ratones de 18 meses ($p < 0.0001$) en comparación con los ratones de 7 semanas y 12 meses, así como con su respectivo control no tratado (**Figura 16**).

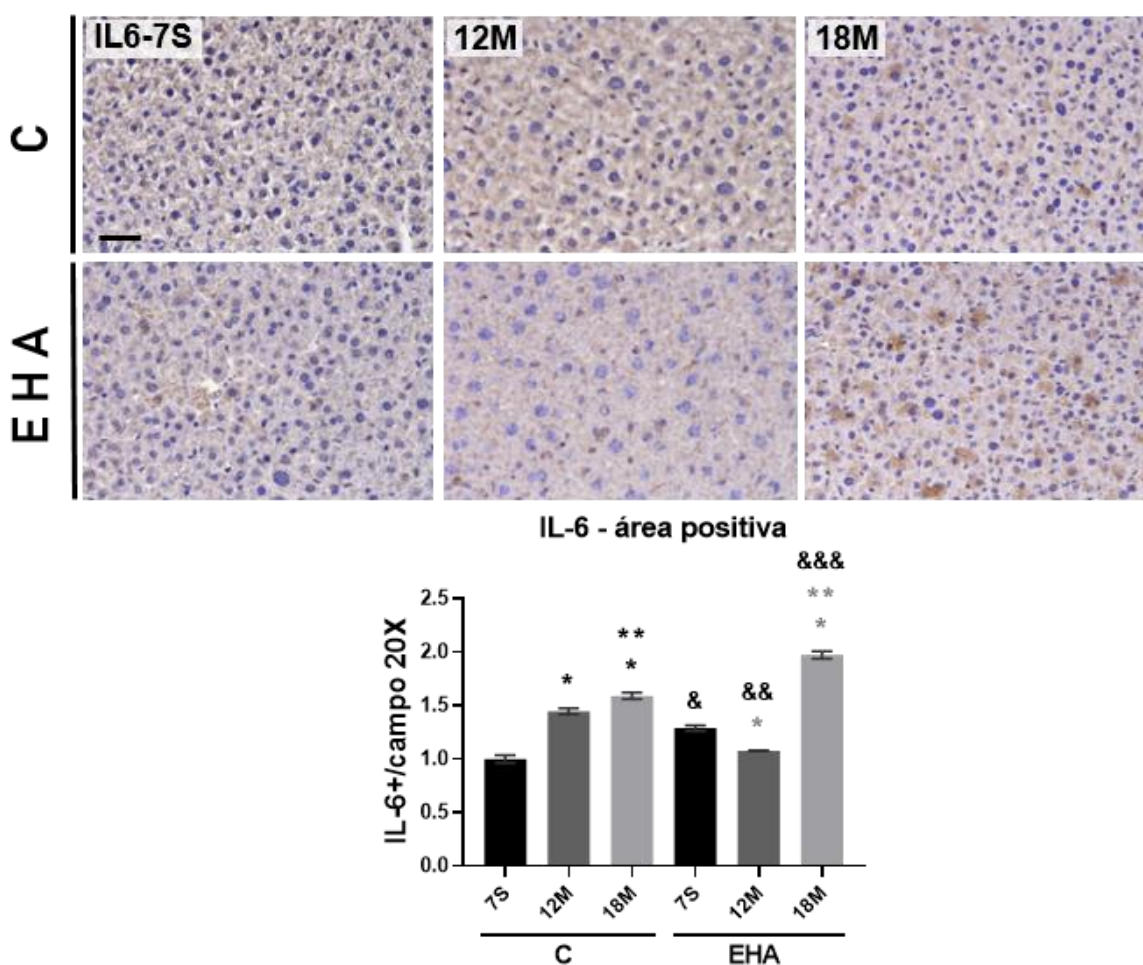


Figura 16. Determinación de un marcador del SASP inducido por el consumo crónico de etanol en el hígado de ratones envejecidos. Análisis IHQ y cuantificación de la señal de la proteína IL-6. La ampliación es de 20×. Barra de escala indica 50 μ m. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, & de 7S, && de 12M, &&& de 18M en comparación con su respectivo grupo control; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

7.7 El consumo crónico de etanol promueve la localización preferente de la NXN cerca de o en las células senescentes del hígado de ratones envejecidos

Con base en el aumento de la actividad de la enzima SA- β -gal en el hígado de ratones de 18 meses (**Figura 15A**) a continuación, determinamos si existía un posible vínculo entre los marcadores de senescencia y la NXN en el tejido hepático de ratones envejecidos. La doble tinción de la NXN con la proteína pH2A.X mediante el análisis de IF en el hígado de ratones de 18 meses, reveló que la NXN se localizó preferentemente en el núcleo y el citoplasma de las células senescentes o adyacentes en los animales sometidos al modelo de EHA (**Figura 17**).

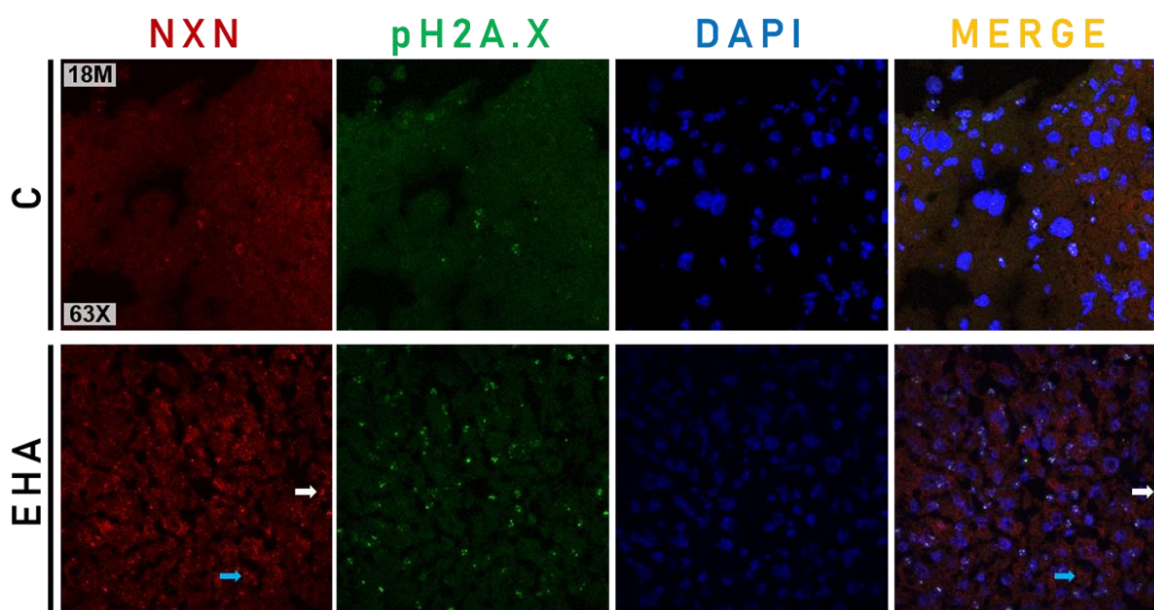


Figura 17. Co-marcaje de la NXN con pH2A.X en el hígado de ratones envejecidos. Doble tinción de las proteínas NXN y pH2A.X mediante análisis IF. Las flechas blanca y azul señalan la localización nuclear y citoplasmática de la NXN, respectivamente. La ampliación es de 63 $\times$. Las imágenes muestran tejidos de ratones de 18 meses. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control.

Adicionalmente, la doble tinción de la NXN con la actividad SA- β -gal mediante análisis de IHQ en el hígado de ratones de 18 meses, reveló que la NXN se localizó preferentemente en el núcleo y el citoplasma de las células senescentes o adyacentes en los animales sometidos al modelo de EHA (**Figura 18**).

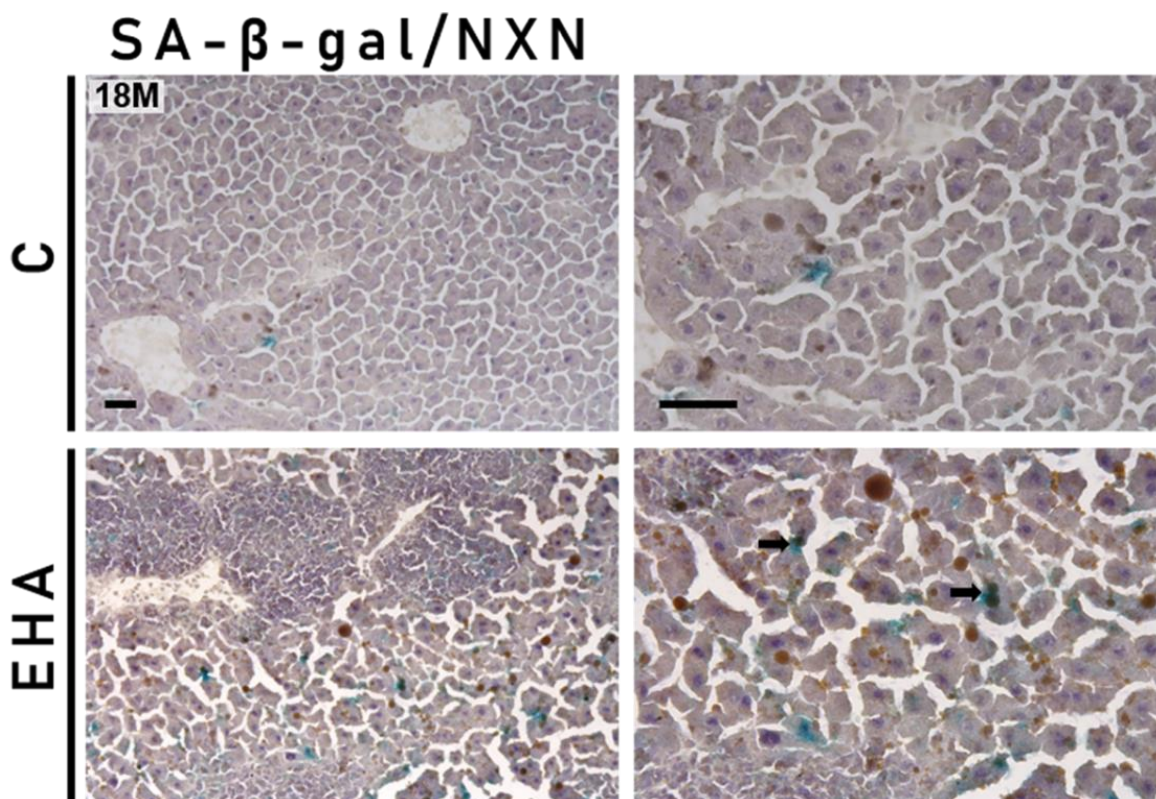


Figura 18. Co-manraje de NXN con la actividad SA- β -gal en el hígado de ratones envejecidos. Doble tinción de las proteínas NXN y pH2A.X mediante análisis IF. Las flechas blanca y azul señalan la localización nuclear y citoplasmática de la NXN, respectivamente. La ampliación es de 63 $\times$. Las imágenes muestran tejidos de ratones de 18 meses. EHA: modelo de enfermedad hepática por etanol; C: control.

7.8 El consumo crónico de etanol aumenta las proteínas carboniladas en el hígado de ratones envejecidos

Entre una amplia gama de modificaciones derivadas de las ERO, la carbonilación de biomoléculas es una de las principales características del estrés oxidante y

determina el grado de oxidación asociado con el daño celular, el envejecimiento y varios trastornos relacionados con la edad (Fedorova *et al.*, 2014). El análisis de las proteínas carboniladas mostró que en los ratones control de 18 meses incrementó ($p = 0.0197$) en comparación con los animales control jóvenes; curiosamente, el consumo crónico de etanol promovió el nivel de proteínas carboniladas en el hígado de todos los grupos de animales del modelo de EHA, es decir, ratones de 7 semanas, 12 y 18 meses ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p = 0.0006$, respectivamente) en comparación con sus respectivos grupos controles no tratados (**Figura 19**).

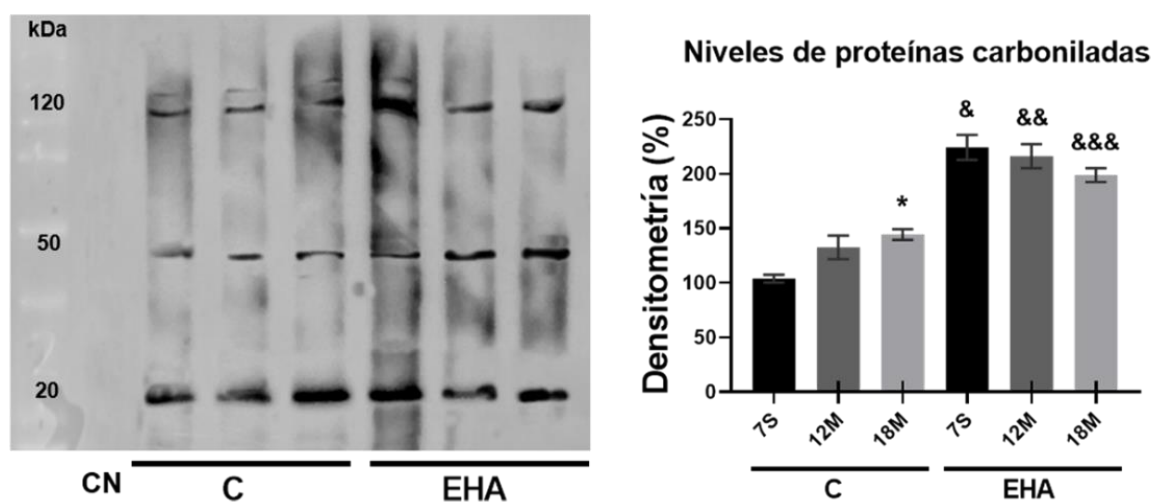


Figura 19. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la carbonilación de proteínas. Se hicieron dos pools de tres muestras individuales cada uno al mezclar cantidades iguales de proteínas. La determinación de las proteínas carboniladas fue mediante el análisis OxyBlot. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo EHA, & de 7S, && de 12M, &&& de 18M en comparación con su respectivo grupo control; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

Por otro lado, la medición del nivel de proteína de la NXN reveló que, si bien no se observaron cambios entre los grupos control, el consumo crónico de etanol estimuló su nivel en los ratones de 7 semanas sometidos al modelo de EHA ($p = 0.0047$); este fenómeno no se observó en los ratones de 12 y 18 meses (**Figura 20**).

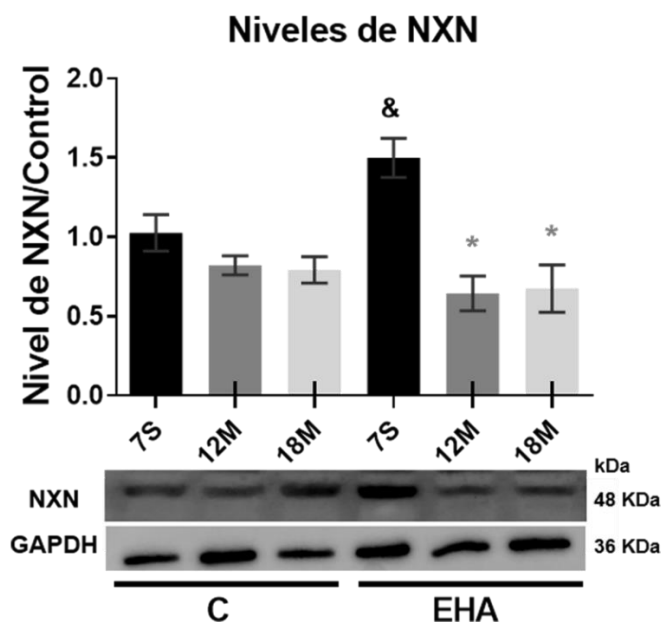


Figura 20. Efecto del consumo crónico de etanol sobre los niveles de la proteína NXN en el hígado de ratones envejecidos. Análisis por WB de la proteína NXN. El nivel de proteína de la NXN se normalizó con el de GAPDH, que se utilizó como control de carga. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo EHA, & de 7S, && de 12M, &&& de 18M en comparación con su respectivo grupo control; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

7.9 El consumo crónico de etanol potencia las alteraciones promovidas por el envejecimiento en las interacciones dependientes de la NXN en el hígado de ratón

Está bien establecido que la NXN interactúa de forma redox-dependiente con varias proteínas como FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1, entre otras, para regular la actividad río abajo de diferentes vías de señalización y, como consecuencia, contribuye a la homeostasis redox celular (Idelfonso-García *et al.*, 2022). Además, algunas de las interacciones de la NXN redox-sensibles se han visto afectadas por el consumo crónico de etanol (Arellanes-Robledo *et al.*, 2021; Arellanes-Robledo *et al.*, 2018). Por lo tanto, para determinar si el envejecimiento modifica la proporción de las

interacciones redox-sensibles de NXN/FLII, NXN/MYD88, NXN/CAMK2A y NXN/PFK1, y si el consumo crónico de etanol empeora las alteraciones inducidas por el envejecimiento en el hígado, realizamos análisis de IP a partir de extractos de proteínas totales.

Los resultados demostraron que la NXN fue inmunoprecipitada, y las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A, y PFK1 fueron eficientemente co-precipitadas. Cabe destacar que en los ratones control de 18 meses de edad, la proporción de interacción de NXN/FLII aumentó considerablemente ($p < 0.0001$), pero el mayor incremento de esta proporción de interacción se observó en los ratones de 7 semanas de edad sometidos al modelo de EHA, que disminuyó gradualmente en los ratones de 12 y 18 meses de edad (ambos $p < 0.0001$). En particular, en los ratones de 18 meses sometidos al consumo crónico de etanol, esta proporción de interacción también disminuyó ($p < 0.0001$) en comparación con su respectivo control no tratado (**Figura 21**).

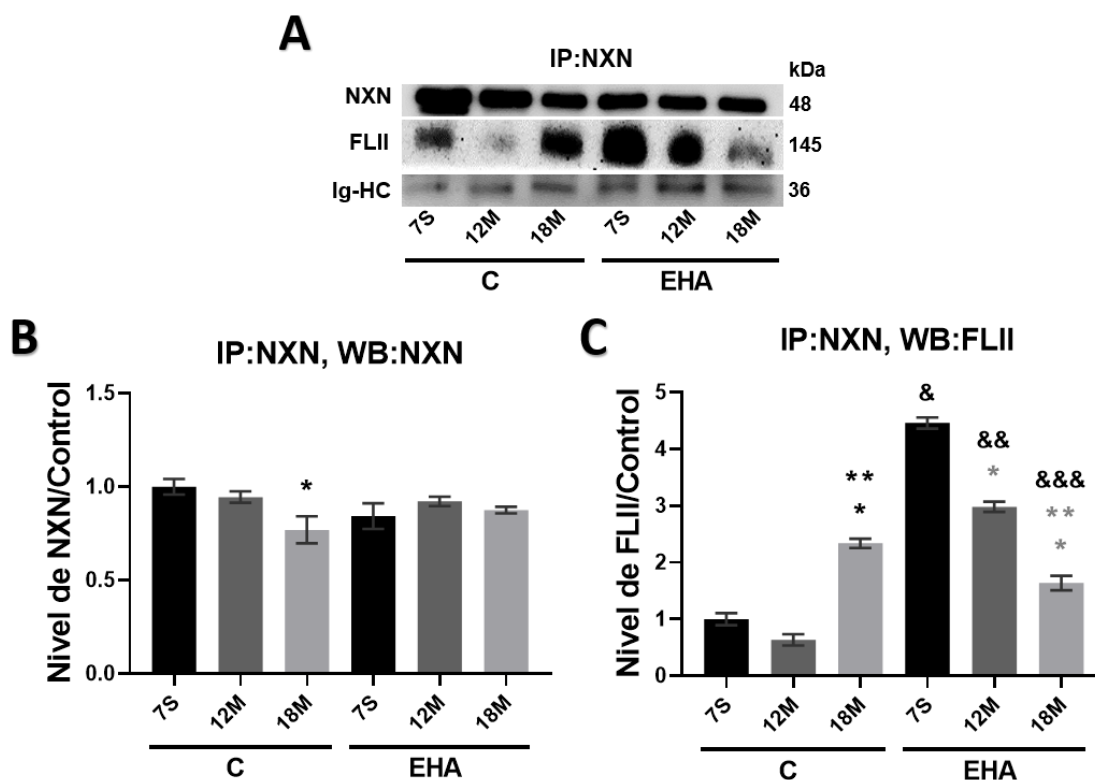


Figura 21. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la interacción NXN/FLII en el hígado de ratones envejecidos. La proteína total extraída de los ratones se incubó para precipitar la NXN en complejo con las proteínas que interactúa al utilizar un anticuerpo anti-NXN como se indica en la sección de materiales y métodos. Se hicieron dos grupos de tres muestras individuales cada uno con cantidades iguales de proteínas. (A) Se utilizó el análisis de WB para detectar el inmunoprecipitado de la NXN y la proteína FLII coprecipitada. (B) Cuantificación por densitometría de la intensidad de las proteínas NXN y FLII. Se detectaron bandas de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig-HC), utilizadas para el ensayo de IP, para normalizar los niveles de proteína. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, & de 7S, && de 12M, &&& de 18M en comparación con el grupo de control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

La proporción de interacción de NXN/MYD88 se encontró fuertemente disminuida ($p < 0.0001$) en los ratones control de 18 meses en comparación con los ratones control jóvenes y de 12 meses; sin embargo, se redujo de forma similar en ratones jóvenes y de edad sometidos al modelo de EHA, incluso por debajo de la proporción de interacción observada en sus respectivos controles, especialmente en ratones

de 7 semanas y de 12 meses ($p = 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente) en comparación con sus respectivos ratones control no tratados (**Figura 22**).

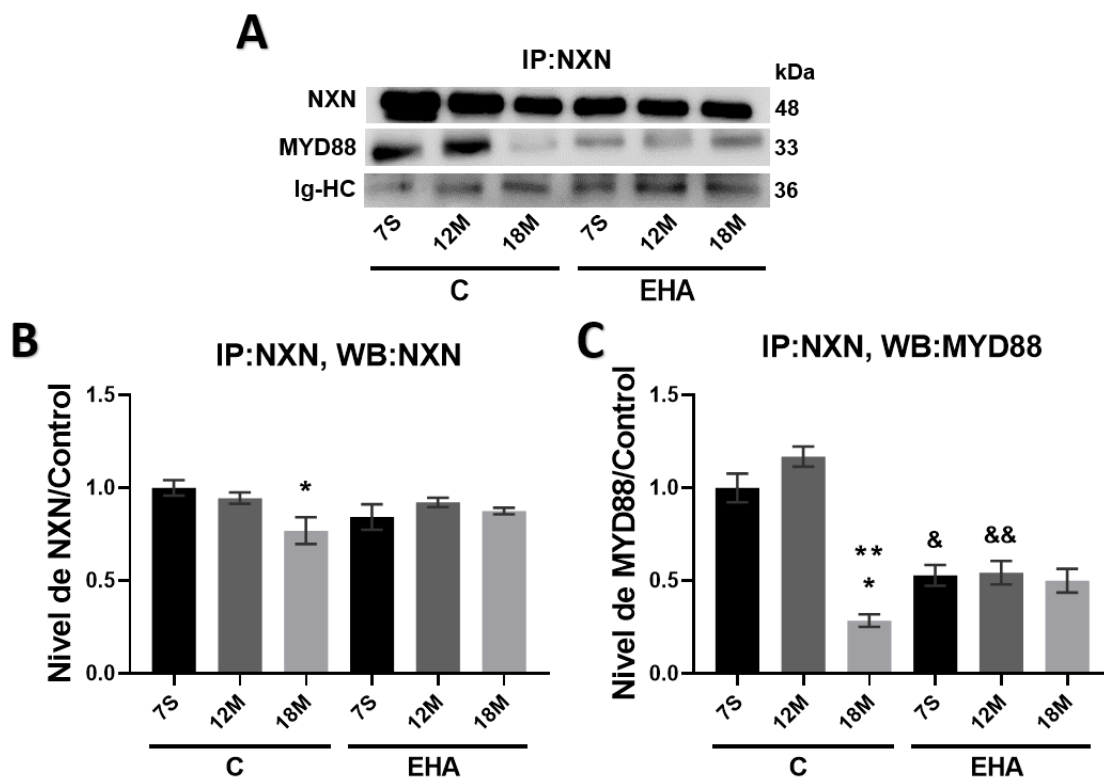


Figura 22. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la interacción NXN/MYD88 en el hígado de ratones envejecidos. La proteína total extraída de los ratones se incubó para precipitar la NXN en complejo con las proteínas que interactúa al utilizar un anticuerpo anti-NXN como se indica en la sección de materiales y métodos. Se hicieron dos grupos de tres muestras individuales cada uno con cantidades iguales de proteínas. (A) Se utilizó el análisis de WB para detectar el inmunoprecipitado de la NXN y la proteína MYD88 coprecipitada. (B) Cuantificación por densitometría de la intensidad de las proteínas NXN y MYD88. Se detectaron bandas de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig-HC), utilizadas para el ensayo de IP, para normalizar los niveles de proteína. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo C, & de 7S, && de 12M en comparación con el grupo de control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

Por otra parte, la proporción de interacción del complejo NXN/CAMK2A se indujo en ratones de 7 semanas de edad ($p = 0.0018$) del modelo de EHA en comparación con su control no tratado, pero disminuyó gradualmente, en los ratones de 18 meses de edad ($p = 0.0426$) en comparación con ratones de 7 semanas de edad. Los

controles no tratados mostraron una tendencia creciente no significativa durante el envejecimiento (Figura 23).

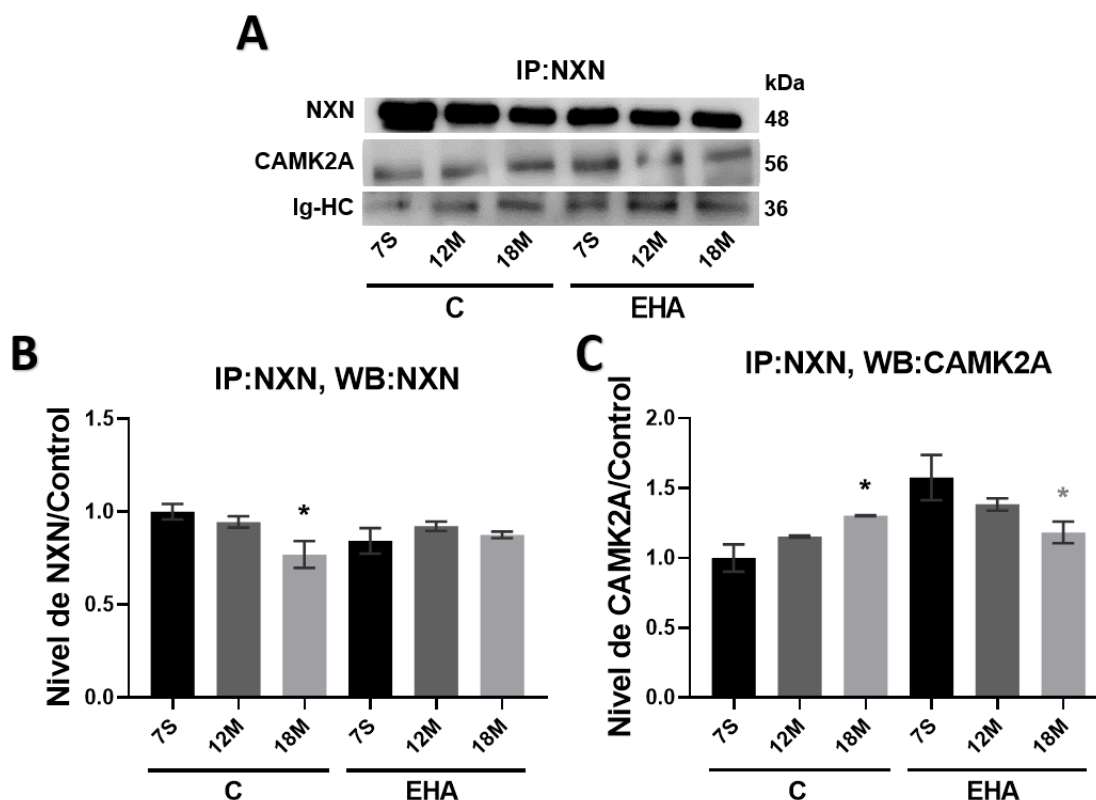


Figura 23. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la interacción NXN/CAMK2A en el hígado de ratones envejecidos. La proteína total extraída de los ratones se incubó para precipitar la NXN en complejo con las proteínas que interactúa al utilizar un anticuerpo anti-NXN como se indica en la sección de materiales y métodos. Se hicieron dos grupos de tres muestras individuales cada uno con cantidades iguales de proteínas. (A) Se utilizó el análisis de WB para detectar el inmunoprecipitado de la NXN y la proteína CAMK2A coprecipitada. (B) Cuantificación por densitometría de la intensidad de las proteínas NXN y CAMK2A. Se detectaron bandas de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig-HC), utilizadas para el ensayo de IP, para normalizar los niveles de proteína. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S en el grupo C, * de 7S en comparación con el grupo de EHA; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

Por último, la proporción de interacción del complejo NXN/PFK1 en los animales no tratados mostró una disminución gradual y significativa ($p = 0.0121$) en los ratones de 18 meses en comparación con los animales jóvenes; por el contrario, este complejo de interacción fue inducido por el consumo crónico de etanol en los

ratones de 18 meses ($p < 0.0001$) en comparación con su respectivo control no tratado ($p < 0.0001$), así como, en comparación con ratones de 7 semanas y 12 meses ($p = 0.0001$ y $p = 0.0011$, respectivamente) sometidos al modelo EHA (Figura 24).

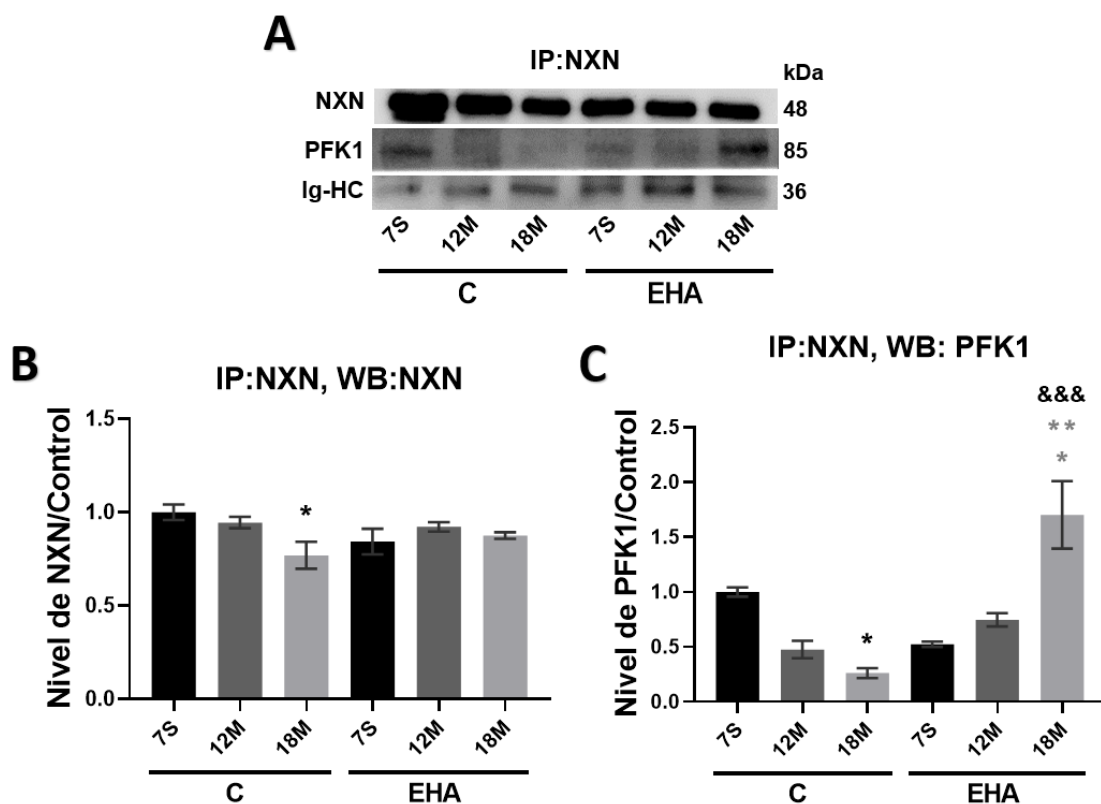


Figura 24. Efecto del consumo crónico de etanol sobre la interacción NXN/PFK1 en el hígado de ratones envejecidos. La proteína total extraída de los ratones se incubó para precipitar la NXN en complejo con las proteínas que interactúa al utilizar un anticuerpo anti-NXN como se indica en la sección de materiales y métodos. Se hicieron dos grupos de tres muestras individuales cada uno con cantidades iguales de proteínas. (A) Se utilizó el análisis de WB para detectar el inmunoprecipitado de la NXN y la proteína PFK1 coprecipitada. (B) Cuantificación por densitometría de la intensidad de las proteínas NXN y PFK1. Se detectaron bandas de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig-HC), utilizadas para el ensayo de IP, para normalizar los niveles de proteína. Las barras representan la media $\pm$ ES. * Significativamente diferente de 7S en el grupo C, * de 7S, ** de 12M en comparación con el grupo de EHA, *** de 18M en comparación con su grupo control respectivo; $p < 0.05$. $n = 5$ animales/grupo. EHA: modelo de enfermedad hepática alcohólica; C: control; 7S: ratones de 7 semanas; 12M: ratones de 12 meses; 18M: ratones de 18 meses.

8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El deterioro del funcionamiento del hígado debido al envejecimiento contribuye a la progresión de las enfermedades hepáticas relacionadas con la edad (Kim *et al.*, 2015). Un mecanismo bien descrito es que, durante el envejecimiento, las CEH adoptan cambios relacionados con el envejecimiento y secretan diversos factores inflamatorios y promotores de tumores, entre ellos la IL-1 β , la IL-6 y el ligando 7 de quimiocina (CXCL7), para inducir la infiltración de neutrófilos. A continuación, el estrés oxidante excesivo derivado de los neutrófilos induce la DSB y restringe la proliferación de células progenitoras hepáticas, lo que conduce al deterioro de la regeneración del hígado (Cheng *et al.*, 2017). Las evidencias indican que un hígado envejecido es más susceptible a los daños debidos al abuso del etanol (Seitz & Stickel, 2007), lo que exacerba el estrés oxidante y desequilibra el estado redox, al desempeñar un papel crítico en el destino celular mediado por el etanol (Fujino *et al.*, 2006). Dado que la NXN es una enzima redox sensible que se ha propuesto como regulador maestro de la homeostasis redox celular (Idelfonso-García *et al.*, 2022), en este estudio nos propusimos determinar la implicación de la NXN en el hígado de ratones envejecidos sometidos al consumo crónico de etanol, e identificamos que algunas interacciones redox de la NXN se sensibilizan con el envejecimiento y empeoran con el consumo crónico de etanol, lo que potencia el mal funcionamiento hepático, como se comenta adelante.

Tras un daño hepático, las CEH experimentan un complejo proceso de activación y se convierten en la principal fuente de deposición creciente e irregular de componentes de la MEC que conducen a la fibrosis (Osna *et al.*, 2017). Durante un proceso normal de fibrillogénesis, se ha identificado que mientras que el nivel de la

COL1A1 disminuye, el de la COL3A1 aumenta; sin embargo, en los tejidos fibróticos hepáticos esta proporción homeostática de colágeno I/III se invierte (Karsdal *et al.*, 2020). Esta proporción alterada puede encontrarse en el hígado de personas envejecidas y estar asociada a un estado proinflamatorio crónico de bajo grado (Adrover *et al.*, 2016). Aunque la tinción de T-Ms no detectó claramente la deposición de fibras de colágeno, los análisis de IHQ revelaron que el consumo crónico de etanol aumento el nivel de la COL1A1 y disminuyó el de la COL3A1 en el hígado de ratones envejecidos. Este fenómeno va acompañado de un leve infiltrado inflamatorio y una desorganización de los cordones hepáticos (**Figura 10**). Aunque las fibras de colágeno no se detectaron mediante la tinción de T-Ms, un procedimiento menos sensible que la inmunodetección, esta evidencia indica que tanto la inversión de la proporción de colágeno I/III como el leve infiltrado inflamatorio se vieron favorecidos por el envejecimiento en el hígado de animales sometidos al modelo de EHA. Ésta alteración inicial progresar a una peor condición si el hígado continúa expuesto a un insulto crónico por uno o múltiples factores promotores durante un tiempo prolongado.

La proliferación celular es un proceso esencial para el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Algunos marcadores de proliferación ampliamente utilizados, como las proteínas PCNA y KI67, han sido útiles para identificar alteraciones en el proceso de proliferación celular (Bologna-Molina *et al.*, 2013). Aunque el hígado es un órgano con un alto potencial proliferativo que favorece su regeneración tras la eliminación parcial de tejido o daño celular, un fenómeno conocido como proliferación compensatoria, su capacidad regenerativa disminuye con el envejecimiento (Pibiri, 2018). Se ha informado que el

consumo crónico de etanol durante 24 meses, aumenta la proliferación de células hepáticas desde el inicio hasta los 7 meses de consumo de etanol; curiosamente, a los 12 meses desaparece, pero a los 18 meses la proporción de proliferación es similar a los controles (Mendenhall *et al.*, 1993). Como era de esperarse, nuestros resultados muestran que los niveles de KI67 y PCNA disminuyeron en los animales envejecidos no tratados; es decir, ratones de 12 y 18 meses; sin embargo, el consumo crónico de etanol aumentó los niveles de estas proteínas en los ratones de 18 meses (**Figura 11 y 12**). Una explicación plausible para este resultado, contrastado con los datos reportados (Mendenhall *et al.*, 1993), es que la proliferación compensatoria inducida por los efectos hepatotóxicos del consumo crónico de etanol, se potencia en los momentos iniciales de la exposición al etanol y posteriormente, las células se adaptan a la citotoxicidad del etanol, como ocurre con la exposición a altos niveles de LPS promovida por la disfunción de la barrera intestinal inducida por el etanol (Rao, 2009). Esto se debe a que en el momento de la evaluación, en nuestro modelo de EHA, los animales habían sido sometidos al consumo de etanol sólo durante las primeras 8 semanas a los 18 meses de edad, pero en el estudio de Mendenhall y colaboradores (Mendenhall *et al.*, 1993), los animales habían sido alimentados con etanol durante 18 meses a la misma edad. Por lo tanto, la inducción de la proliferación compensatoria por el etanol está asociada al inicio de la exposición de las células hepáticas al consumo crónico de etanol.

El estrés oxidante inducido por el etanol conduce a la senescencia celular mediante el aumento de la producción de las ERO y la reducción de la actividad del sistema antioxidante celular, lo que aumenta el daño al ADN (Dey & Cederbaum, 2006). En

la DDR, la PARP dependiente del ADN, especialmente la PARP-1, reconoce rápidamente tanto los extremos de una sola hebra como los de la DSB. A continuación, se sintetiza PAR, una molécula de señalización del daño al ADN que permite una evaluación celular rápida y eficaz, y concentra factores clave de la vía de reparación de la rotura de la cadena sencilla en el lugar del daño (Schreiber *et al.*, 2006). Curiosamente, se ha informado de que la inactivación del gen PARP-1 en ratones conduce a la aceleración del envejecimiento (Piskunova *et al.*, 2008). Nuestro análisis de IF reveló que el nivel de PAR aumento significativamente en ratones envejecidos no tratados, pero se acrecentó con el consumo crónico de etanol tanto en ratones jóvenes como envejecidos (**Figura 13**). Los ensayos in vitro han demostrado que la senescencia, una respuesta al estrés que se produce universalmente en los tejidos en condiciones fisiopatológicas, es estimulada en los hepatocitos por el etanol, lo que sugiere que desempeña un papel clave en la EHA (Dong *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2018); además, en cultivos de hepatocitos expuestos a etanol aumenta la actividad SA- β -gal, un biomarcador ampliamente utilizado de senescencia celular (Lu *et al.*, 2023). Curiosamente, nuestros resultados mostraron que la actividad de la SA- β -gal aumento en los ratones de 18 meses no tratados, pero este incremento se observó a partir de los 12 meses y se potenció en ratones de 18 meses sometidos al modelo EHA (**Figura 15A**), lo que indica que el consumo crónico de etanol exacerbó la aparición de células senescentes en el hígado de ratones envejecidos.

El acortamiento de los telómeros es un acontecimiento importante en la senescencia, que se correlaciona con los SAFH, un dominio de heterocromatina facultativo asociado a la detención irreversible del ciclo celular (Narita *et al.*, 2006).

La pH2A.X, una histona de sustitución, es el segundo marcador más común de senescencia celular después de la actividad SA- β -gal, y es el marcador más sensible de DSB y acortamiento de telómeros (Sedelnikova *et al.*, 2004). Nuestros resultados demostraron que el nivel de la pH2A.X se inducía en los hígados de ratones de 12 y 18 meses tanto no tratados como tratados con etanol, pero era mayor en los tratados con etanol (**Figura 15B**). Además, la mayoría de las células senescentes pueden mostrar un SASP e incrementar la producción masiva de citosinas proinflamatorias y factores de crecimiento. La IL-6, es una de las citosinas proinflamatorias básicas de los componentes del SASP (Calder *et al.*, 2017). Se ha informado de que, en el hígado de ratas envejecidas, el ARNm de IL-6 aumenta principalmente en las CK, lo que sugiere que estas células son la fuente principal en los hígados envejecidos (Maeso-Diaz *et al.*, 2018). Además, se produce un daño agudo y el hígado pierde funciones hepatocelulares e induce una regeneración compensatoria; y la IL-6, junto con los factores de crecimiento, favorece la proliferación de los hepatocitos al aumentar tanto la síntesis de ADN como la inestabilidad genómica (Nechemia-Arbely *et al.*, 2011). Nuestros resultados mostraron que el consumo crónico de etanol aumento el nivel de IL-6 en ratones envejecidos (**Figura 16**). En conjunto, estos datos indican que el mecanismo de reparación del ADN se activa con el propio envejecimiento en un intento de revertir el daño celular, pero se potencia por el efecto citotóxico del consumo crónico de etanol, como un evento de daño temprano, tanto en las células hepáticas envejecidas como en las jóvenes; por lo tanto, este daño conduce al establecimiento de la senescencia celular, lo que contribuye a acelerar la progresión de la EHA durante el envejecimiento.

La oxidación provoca daños estructurales en las macromoléculas que se acumulan con la edad y contribuyen a alterar las vías de señalización, lo que provoca inadvertidamente el envejecimiento celular. Se ha demostrado que las redes de señalización reguladas por redox controlan el SASP, que desempeña un papel importante en la conducción de las enfermedades relacionadas con la edad (Chandrasekaran *et al.*, 2017). La NXN es una enzima sensible al redox que mantiene la homeostasis redox, regula varias vías de señalización y elimina ERO (Idelfonso-García *et al.*, 2022). Por lo tanto, determinamos el co-marcaje de la NXN con la pH2A.X y la SA- β -gal mediante análisis de IF e IHQ, respectivamente, para identificar una posible relación entre la senescencia celular y la presencia de la NXN, una enzima redox sensible que no se había asociado previamente con este proceso celular. Nuestros resultados mostraron que la NXN se co-localizo o detecto preferentemente junto a las células senescentes (**Figura 17 y 18**). Dado que la NXN elimina ERO (Idelfonso-García *et al.*, 2022), estas pruebas sugieren claramente que la NXN se localiza dentro o cerca de las células senescentes para protegerlas del estrés oxidante producido por las propias células senescentes y/o por el metabolismo del etanol.

La carbonilación de proteínas es una modificación oxidativa postraducciona irreversible e irreparable que produce una fracción reactiva de carbonilo. Se ha demostrado que la carbonilación de proteínas está asociada a varias enfermedades, aumenta con la edad y está relacionada con el desgaste de enzimas específicas dependiente de la edad (Dalle-Donne *et al.*, 2003). En particular, la carbonilación de proteínas aumenta en el hígado de ratones jóvenes expuestos al consumo crónico de etanol durante cuatro meses (Shearn *et al.*, 2018). Observamos que la

carbonilación de proteínas aumentaron en ratones de 18 meses no tratados, pero el consumo de etanol administrado durante sólo ocho semanas, aumentó el nivel de proteínas carboniladas en el hígado de ratones jóvenes y envejecidos; esto indica que la carbonilación de proteínas es una modificación oxidativa temprana inducida por el etanol, y el envejecimiento contribuyó a potenciar este fenómeno (**Figura 19**). Un mecanismo plausible en los hígados envejecidos es que el aumento de la producción de las ERO por el consumo de etanol deteriora la estructura y la función de las mitocondrias y aumenta el contenido de proteínas carboniladas en estos organelos, pero no en el citosol celular, como se informó anteriormente (Dey & Cederbaum, 2006). Por otro lado, aunque la NXN no ha sido implicado en la senescencia celular, puede contribuir en base a su papel en la regulación de las ERO y de la homeostasis redox celular (Idelfonso-García *et al.*, 2022). Nuestros resultados mostraron que el nivel de proteína de la NXN fue fuertemente inducido en el hígado de ratones jóvenes tratados con etanol, pero no en ratones envejecidos (**Figura 20**). Una explicación plausible de este fenómeno es que, en los animales jóvenes, la NXN todavía tiene plena capacidad para combatir el aumento del estrés oxidante para revertir el daño oxidante inducido por el etanol. Sin embargo, la actividad enzimática de la NXN ya había disminuido en los ratones envejecidos, como ocurre con las enzimas hepáticas metabolizadoras del etanol en las personas de edad avanzada (Meier & Seitz, 2008). Este declive generara la modificación oxidativa de la enzima NXN promovida por la carbonilación inducida por el consumo crónico de etanol, una hipótesis intrigante que necesita ser abordada.

La NXN interactúa de manera redox-dependiente con siete proteínas hasta el momento, regula varios procesos celulares y se ha asociado a diferentes patologías

(Idelfonso-García *et al.*, 2022). Como primera aproximación para dilucidar si sus relaciones de interacción proteína-proteína se modifican con el envejecimiento, evaluamos el estado de interacción de la NXN con las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1, que regulan la inmunidad innata, la inflamación, la plasticidad neuronal y la glucólisis, respectivamente. Mientras que el MYD88 se considera un eje de las vías de señalización inflamatoria río abajo de los TLR y otros receptores (Deguine & Barton, 2014), FLII, que también interactúa con MYD88, la cual es una proteína multifuncional y recientemente ha sido identificada como un regulador emergente de la inflamación (Ruzehaji *et al.*, 2013). Durante un estímulo proinflamatorio, MYD88 se une a TLR4, lo que provoca la activación del NF- κ B para transcribir genes implicados en la inmunidad innata y la inflamación; sin embargo, para evitar la hiperactivación innecesaria de la vía TLR4/MYD88, FLII secuestra MYD88 de TLR4 a través de la NXN, al formar el complejo FLII/NXN/MYD88. (Hayashi *et al.*, 2010). Encontramos que FLII incremento la proporción de interacción con la NXN en el hígado de ratones jóvenes, pero esta interacción disminuyó fuertemente en los ratones de edad sometidos al modelo de EHA, mientras que la proporción de interacción de MYD88 no cambio en estos grupos de animales; cabe destacar que, en los ratones de edad de 18 meses no tratados, la proporción de interacción FLII/NXN aumento (**Figura 21**). Esta evidencia sugiere que el consumo crónico de etanol disminuye la eficiencia de la NXN para interactuar con FLII, probablemente por el aumento de la carbonilación de proteínas inducida por el consumo crónico de etanol que afecta a las proteínas redox sensibles, como la NXN; un fenómeno que se sensibiliza por el envejecimiento, pero es exacerbado por el consumo crónico de etanol.

Recientemente, se informó que la NXN interactúa con CAMK2A y la oxida para mantener su estado oxidante y su actividad en las neuronas (Tran *et al.*, 2021). La CAMK2A, una serina/treonina quinasa, es muy abundante en el cerebro y desempeña varias funciones mediadas por la regulación del Ca^{2+} intracelular, como la síntesis de neurotransmisores, la regulación de canales iónicos, la división celular, la contractilidad muscular y la transcripción génica (Idelfonso-García *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2021); sin embargo, hasta donde sabemos, no se ha investigado su función en el hígado. Observamos que la proporción de interacción NXN/CAMK2A disminuye en ratones envejecidos sometidos al modelo de EHA (**Figura 23**), como consecuencia del deterioro de la capacidad oxidasa de la NXN iniciado por el envejecimiento y aumentado por el consumo crónico de etanol, al modificar funciones dependientes de CAMK2A en el hígado que quedan por investigar.

La PFK1 es una enzima reguladora crucial de la glucólisis asociada a la promoción de la proliferación de células cancerosas ya que se encuentra elevada en los tejidos cancerosos (Yalcin *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la NXN interactúa con la PFK1 y estabiliza su oligomerización para regular su actividad catalítica. Dado que la deficiencia de la NXN aumenta el NADPH y reduce los niveles de glutatión, dos importantes antioxidantes celulares generados a través de la vía de la pentosa fosfato, se ha propuesto que la PFK1 hace que las células sean más resistentes al estrés oxidante. Aunque aún se desconoce cómo la NXN estabiliza la oligomerización de la PFK1, se ha propuesto que existe un efecto conjunto entre la actividad de la NXN, la glicosilación, la fosforilación y la acilación, ya que la PFK1 también está sujeta a estas modificaciones postraduccionales (Funato *et al.*, 2013). Descubrimos que la proporción de interacción NXN/PFK1 disminuyó en los ratones

envejecidos no tratados, pero aumento en los sometidos a consumo crónico de etanol (**Figura 24**). Por lo tanto, esta evidencia sugiere que un mecanismo por el cual el consumo crónico de etanol durante el envejecimiento aumenta la proliferación celular (**Figura 11 y 12**), es a través de la estabilización de PFK1 por la contribución de la NXN, así como, por algunas modificaciones post-traduccionales. Futuros análisis confirmarán esta propuesta.

9 CONCLUSIONES

En resumen, demostramos el papel de la NXN durante el consumo crónico de etanol en el hígado de ratones envejecidos. Aportamos pruebas que demuestran que el consumo crónico de etanol empeora la alteración de las interacciones redox-sensibles dependientes de la NXN promovidas por el envejecimiento en el hígado del ratón, como la de la NXN con las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1. Aunque la capacidad de interacción de la NXN ya había disminuido para proteger el tejido hepático de los efectos adversos del consumo crónico de etanol, se localizó preferentemente en las células senescentes o junto a ellas. Esto estuvo acompañado de un aumento de la actividad SA- β -gal, de los niveles de PAR, pH2A.X e IL-6, de la carbonilación de proteínas y de la proliferación celular, así como de la modificación de la proporción de colágeno I y colágeno III (**Figura 25**). Además, dado que esta evidencia hasta donde sabemos, es la primera que demuestra la implicación de la NXN en el envejecimiento, nuestro hallazgo abre una ventana para intensificar la investigación dirigida en dilucidar hasta qué punto las interacciones de la NXN y sus vías de señalización río abajo están implicadas en el envejecimiento y en los retos a los que se enfrenta el hígado al ser expuesto a agentes tóxicos, como el etanol. En particular, como es bien sabido en la población general, el consumo de etanol es un predictor independiente de otras enfermedades hepáticas, como la cirrosis y el CHC en pacientes portadores de una infección crónica por el VHC, y de muerte en pacientes portadores de una infección por el VHC o B (Bellentani *et al.*, 2010). Por lo tanto, es plausible que la alteración de las interacciones de la NXN pueda verse potenciada por los efectos concomitantes de la ingesta crónica de etanol y la infección por los virus de la hepatitis. Aunque esta

propuesta no fue abordada y ser una limitante de nuestra investigación, también es una hipótesis alentadora que surge de los hallazgos actuales. Por lo tanto, la implicación de la NXN en el envejecimiento representa un fenómeno emergente y atractivo que debería seguir investigándose.

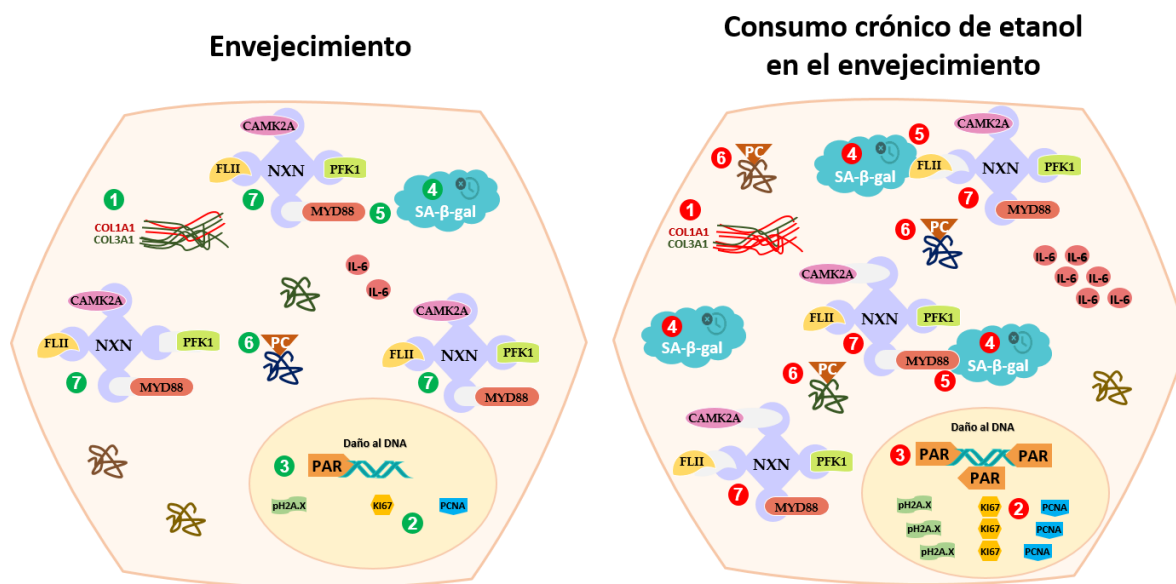


Figura 25. Resumen esquemático de los efectos del consumo crónico de etanol sobre las interacciones redox-sensibles dependientes de la NXN durante el envejecimiento. El consumo crónico de etanol empeora los efectos adversos del envejecimiento en (1) la proporción del COL1A1/COL3A1, (2) la proliferación celular, (3) el daño al ADN, (4) la actividad de la SA-β-gal, (5) el nivel y la localización de la proteína NXN, (6) la carbonilación de proteínas y, (7) la interacción de NXN con las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1 en el hígado de ratón. CAMK2A, proteína quinasa II alfa dependiente de calcio/calmodulina; COL1A1, colágeno 1 alfa 1; COL3A1, colágeno 3 alfa 1; PC, proteína carbonilada; FLII, Flightless-I; IL-6, interleucina 6; MYD88, Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide; NXN, nucleorredoxina; PAR, poli (ADP-ribosa); PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación; PFK1, fosfofructoquinasa 1; pH2A.X, fosfo-H2A.X(Ser139); SA-β-gal, actividad de la β-galactosidasa asociada a la senescencia.

10 PERSPECTIVAS

Evaluar cambios de la expresión génica alterados por la enfermedad hepática alcohólica durante el envejecimiento y la posible regulación dependiente de la NXN.

11 BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>

Adrover, J. M., Nicolas-Avila, J. A., & Hidalgo, A. (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol*, 37(5), 334-345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.005>

Aini, W., Miyagawa-Hayashino, A., Ozeki, M., Adeeb, S., Hirata, M., Tamaki, K., Uemoto, S., & Haga, H. (2014). Accelerated telomere reduction and hepatocyte senescence in tolerated human liver allografts. *Transpl Immunol*, 31(2), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2014.06.008>

Albillos, A., de Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*, 72(3), 558-577. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>

Anderson, R. M., & Weindruch, R. (2010). Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab*, 21(3), 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.005>

Aravinthan, A., Pietrosi, G., Hoare, M., Jupp, J., Marshall, A., Verrill, C., Davies, S., Bateman, A., Sheron, N., Allison, M., & Alexander, G. J. (2013). Hepatocyte expression of the senescence marker p21 is linked to fibrosis and an adverse liver-related outcome in alcohol-related liver disease. *PLoS One*, 8(9), e72904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072904>

Arellanes-Robledo, J., Ibrahim, J., Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Leckey, L., & Lakshman, M. R. (2021). Flightless-I is a potential biomarker for the early detection of alcoholic liver disease. *Biochem Pharmacol*, 183, 114323. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114323>

Arellanes-Robledo, J., Reyes-Gordillo, K., Ibrahim, J., Leckey, L., Shah, R., & Lakshman, M. R. (2018). Ethanol targets nucleoredoxin/dishevelled interactions and stimulates phosphatidylinositol 4-phosphate production in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol*, 156, 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.021>

Arellanes-Robledo, J., Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Dominguez-Rosales, J. A., Hernandez-Nazara, Z. H., Ramirez, F., Rojkind, M., & Lakshman, M. R. (2013). Fibrogenic actions of acetaldehyde are beta-catenin dependent but Wingless independent: a critical role of nucleoredoxin and reactive oxygen species in human hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med*, 65, 1487-1496. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.017>

Baek, J. H., Son, H., Jeong, Y. H., Park, S. W., & Kim, H. J. (2019). Chronological Aging Standard Curves of Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number

in Twelve Tissues of C57BL/6 Male Mouse. *Cells*, 8(3).
<https://doi.org/10.3390/cells8030247>

Bahn, Y. J., Lee, K. P., Lee, S. M., Choi, J. Y., Seo, Y. S., & Kwon, K. S. (2015). Nucleoredoxin promotes adipogenic differentiation through regulation of Wnt/beta-catenin signaling. *J Lipid Res*, 56(2), 294-303. <https://doi.org/10.1194/jlr.M054056>

Bao, H., Cao, J., Chen, M., Chen, M., Chen, W., Chen, X., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Z., Chhetri, J. K., Ding, Y., Feng, J., Guo, J., Guo, M., He, C., Jia, Y., Jiang, H., Jing, Y., . . . Liu, G. H. (2023). Biomarkers of aging. *Sci China Life Sci*, 66(5), 893-1066. <https://doi.org/10.1007/s11427-023-2305-0>

Basso, A., Piantanelli, L., Rossolini, G., & Roth, G. S. (1998). Reduced DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from old mice is restored by thymus grafts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 53(2), B111-116.
<https://doi.org/10.1093/gerona/53a.2.b111>

Bellentani, S., Scaglioni, F., Ciccia, S., Bedogni, G., & Tiribelli, C. (2010). HCV, HBV and alcohol - the Dionysos study. *Dig Dis*, 28(6), 799-801.
<https://doi.org/10.1159/000324288>

Benayoun, B. A., Pollina, E. A., & Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(10), 593-610. <https://doi.org/10.1038/nrm4048>

Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*, 9(16), 715-732. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>

Bitto, A., Wang, A. M., Bennett, C. F., & Kaeberlein, M. (2015). Biochemical Genetic Pathways that Modulate Aging in Multiple Species. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025114>

Bochkis, I. M., Przybylski, D., Chen, J., & Regev, A. (2014). Changes in nucleosome occupancy associated with metabolic alterations in aged mammalian liver. *Cell Rep*, 9(3), 996-1006. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.048>

Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A. D., & Sanchez-Acuna, G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18(2), e174-179. <https://doi.org/10.4317/medoral.18573>

Bradley, K. A., Badrinath, S., Bush, K., Boyd-Wickizer, J., & Anawalt, B. (1998). Medical risks for women who drink alcohol. *J Gen Intern Med*, 13(9), 627-639.
<https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.1998.cr187.x>

Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*, 59(3), 583-594.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033>

Burke-Gaffney, A., Callister, M. E., & Nakamura, H. (2005). Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends Pharmacol Sci*, 26(8), 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.06.005>

Burton, D. G., & Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*, 71(22), 4373-4386. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3>

Calder, P. C., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Capuron, L., Delzenne, N., Dore, J., Franceschi, C., Lehtinen, M. J., Recker, T., Salvioli, S., & Visioli, F. (2017). Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev*, 40, 95-119. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.001>

Capri, M., Olivieri, F., Lanzarini, C., Remondini, D., Borelli, V., Lazzarini, R., Graciotti, L., Albertini, M. C., Bellavista, E., Santoro, A., Biondi, F., Tagliafico, E., Tenedini, E., Morsiani, C., Pizza, G., Vasuri, F., D'Errico, A., Dazzi, A., Pellegrini, S., . . . Grazi, G. L. (2017). Identification of miR-31-5p, miR-141-3p, miR-200c-3p, and GLT1 as human liver aging markers sensitive to donor-recipient age-mismatch in transplants. *Aging Cell*, 16(2), 262-272. <https://doi.org/10.1111/ace.12549>

Ceni, E., Mello, T., & Galli, A. (2014). Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*, 20(47), 17756-17772. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17756>

Chandrasekaran, A., Idelchik, M., & Melendez, J. A. (2017). Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*, 11, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>

Cheng, Y., Wang, X., Wang, B., Zhou, H., Dang, S., Shi, Y., Hao, L., Luo, Q., Jin, M., Zhou, Q., & Zhang, Y. (2017). Aging-associated oxidative stress inhibits liver progenitor cell activation in mice. *Aging (Albany NY)*, 9(5), 1359-1374. <https://doi.org/10.18632/aging.101232>

Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., & Lowe, S. W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*, 17(4), 376-387. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.023>

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*, 9(4), 169-176. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00031-5)

Dawson, D. A. (2011). Defining risk drinking. *Alcohol Res Health*, 34(2), 144-156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330212>

Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep*, 6, 97. <https://doi.org/10.12703/P6-97>

Dey, A., & Cederbaum, A. I. (2006). Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S63-74. <https://doi.org/10.1002/hep.20957>

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., & et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

Ding, S., Li, C., Cheng, N., Cui, X., Xu, X., & Zhou, G. (2015). Redox Regulation in Cancer Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 750798. <https://doi.org/10.1155/2015/750798>

Dong, R., Wang, X., Wang, L., Wang, C., Huang, K., Fu, T., Liu, K., Wu, J., Sun, H., & Meng, Q. (2021). Yangonin inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via miR-194/FXR axis. *Eur J Pharmacol*, 890, 173653. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173653>

Fafian-Labora, J. A., & O'Loughlen, A. (2020). Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. *Trends Cell Biol*, 30(8), 628-639. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.05.003>

Fedorova, M., Bollineni, R. C., & Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*, 33(2), 79-97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>

Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22(3), 377-388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>

Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*, 16(6), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.09.003>

Funato, Y., Hayashi, T., Irino, Y., Takenawa, T., & Miki, H. (2013). Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 440(4), 737-742. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.138>

Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol*, 8(5), 501-508. <https://doi.org/10.1038/ncb1405>

Funato, Y., & Miki, H. (2007). Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal*, 9(8), 1035-1057. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1550>

Garcia-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernandez-Checa, J. C. (2013). Role of Mitochondria in Alcoholic Liver Disease. *Curr Pathobiol Rep*, 1(3), 159-168. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0021-z>

Gaviria C, M. M., Correa Arango, G., & Navas N, M. C. (2016). Alcohol, cirrosis y predisposición genética. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 31, 27-35. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572016000100005&nrm=iso

Ghosh, K., & Capell, B. C. (2016). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *J Invest Dermatol*, 136(11), 2133-2139. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.06.621>

Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I. C. M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jedrak, P., Pierzynowska, K., Szymanski, J., Wang, D. Q., Portincasa, P., Wegrzyn, G., Zischka, H., Dobrzyn, P., Bonora, M., Duszynski, J., Rimessi, A., . . . Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol*, 340, 209-344. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006>

Gregg, S. Q., Gutierrez, V., Robinson, A. R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M. A., Michalopoulos, G. K., Rigatti, L., Rothermel, C. E., Kamileri, I., Garinis, G. A., Stolz, D. B., & Niedernhofer, L. J. (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*, 55(2), 609-621. <https://doi.org/10.1002/hep.24713>

Hayashi, T., Funato, Y., Terabayashi, T., Morinaka, A., Sakamoto, R., Ichise, H., Fukuda, H., Yoshida, N., & Miki, H. (2010). Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J Biol Chem*, 285(24), 18586-18593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106468>

Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 6, 425-456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>

Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(7), 421-435. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>

Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., Figueroa, M. E., & Passegue, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, 543(7644), 205-210. <https://doi.org/10.1038/nature21388>

Hubbard, B. P., & Sinclair, D. A. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 35(3), 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>

Huda, N., Liu, G., Hong, H., Yan, S., Khambu, B., & Yin, X. M. (2019). Hepatic senescence, the good and the bad. *World J Gastroenterol*, 25(34), 5069-5081. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i34.5069>

Hudgins, A. D., Tazearslan, C., Tare, A., Zhu, Y., Huffman, D., & Suh, Y. (2018). Age- and Tissue-Specific Expression of Senescence Biomarkers in Mice. *Front Genet*, 9, 59. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00059>

Hunt, N. J., Kang, S. W. S., Lockwood, G. P., Le Couteur, D. G., & Cogger, V. C. (2019). Hallmarks of Aging in the Liver. *Comput Struct Biotechnol J*, 17, 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.021>

Idelfonso-García, O. G., Alarcón-Sánchez, B. R., Vásquez-Garzón, V. R., Baltiérrez-Hoyos, R., Villa-Treviño, S., Muriel, P., Serrano, H., Pérez-Carreón, J. I., & Arellanes-Robledo, J. (2022). Is Nucleoredoxin a Master Regulator of Cellular Redox Homeostasis? Its Implication in Different Pathologies. *Antioxidants (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antiox11040670>

Idelfonso-Garcia, O. G., Pacheco-Rivera, R., Alarcon-Sanchez, B. R., Serrano-Luna, J., Baltierrez-Hoyos, R., Vasquez-Garzon, V. R., Muriel, P., Villa-Trevino, S., Perez-Carreon, J. I., & Arellanes-Robledo, J. (2024). Protocol to detect senescence-associated beta-galactosidase and immunoperoxidase activity in fresh-frozen murine tissues. *STAR Protoc*, 5(2), 103009. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103009>

Jiang, X., Charlat, O., Zamponi, R., Yang, Y., & Cong, F. (2015). Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*, 58(3), 522-533. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.015>

Jin, H., Lian, N., Bian, M., Zhang, C., Chen, X., Shao, J., Wu, L., Chen, A., Guo, Q., Zhang, F., & Zheng, S. (2018). Oroxylin A inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via YAP pathway. *Cell Prolif*, 51(3), e12431. <https://doi.org/10.1111/cpr.12431>

Kang, D., Zhao, D., Ryu, S., Guallar, E., Cho, J., Lazo, M., Shin, H., Chang, Y., & Sung, E. (2020). Perceived stress and non-alcoholic fatty liver disease in apparently healthy men and women. *Sci Rep*, 10(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57036-z>

Karsdal, M. A., Daniels, S. J., Holm Nielsen, S., Bager, C., Rasmussen, D. G. K., Loomba, R., Surabattula, R., Villesen, I. F., Luo, Y., Shevell, D., Gudmann, N. S., Nielsen, M. J., George, J., Christian, R., Leeming, D. J., & Schuppan, D. (2020). Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int*, 40(4), 736-750. <https://doi.org/10.1111/liv.14390>

Karunadharma, P. P., Basisty, N., Dai, D. F., Chiao, Y. A., Quarles, E. K., Hsieh, E. J., Crispin, D., Bielas, J. H., Ericson, N. G., Beyer, R. P., MacKay, V. L., MacCoss, M. J., & Rabinovitch, P. S. (2015). Subacute calorie restriction and rapamycin discordantly alter mouse liver proteome homeostasis and reverse aging effects. *Aging Cell*, 14(4), 547-557. <https://doi.org/10.1111/accel.12317>

- Khambu, B., Wang, L., Zhang, H., & Yin, X. M. (2017). The Activation and Function of Autophagy in Alcoholic Liver Disease. *Curr Mol Pharmacol*, 10(3), 165-171. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150817112654>
- Kim, I. H., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2015). Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(3), 184-191. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000176>
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161, III-XIII, 1-151. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56553-3>
- Kudlova, N., De Sanctis, J. B., & Hajduch, M. (2022). Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*, 24(22), 2463-2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*, 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Lasry, A., & Ben-Neriah, Y. (2015). Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol*, 36(4), 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.009>
- Lawless, C., Jurk, D., Gillespie, C. S., Shanley, D., Saretzki, G., von Zglinicki, T., & Passos, J. F. (2012). A stochastic step model of replicative senescence explains ROS production rate in ageing cell populations. *PLoS One*, 7(2), e32117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032117>
- Lebel, M., de Souza-Pinto, N. C., & Bohr, V. A. (2011). Metabolism, genomics, and DNA repair in the mouse aging liver. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2011, 859415. <https://doi.org/10.1155/2011/859415>
- Lechward, K., Sugajska, E., de Baere, I., Goris, J., Hemmings, B. A., & Zolnierowicz, S. (2006). Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett*, 580(15), 3631-3637. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.101>
- Li, N., Muthusamy, S., Liang, R., Sarojini, H., & Wang, E. (2011). Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech Ageing Dev*, 132(3), 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.12.004>
- Li, R., & Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci*, 92(13), 747-751. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.014>

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Lu, C., Ge, T., Shao, Y., Cui, W., Li, Z., Xu, W., & Bao, X. (2023). ZNF281 drives hepatocyte senescence in alcoholic liver disease by reducing HK2-stabilized PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Cell Prolif*, 56(3), e13378. <https://doi.org/10.1111/cpr.13378>

Maeso-Diaz, R., Ortega-Ribera, M., Fernandez-Iglesias, A., Hide, D., Munoz, L., Hessheimer, A. J., Vila, S., Frances, R., Fondevila, C., Albillos, A., Peralta, C., Bosch, J., Tacke, F., Cogger, V. C., & Gracia-Sancho, J. (2018). Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell*, 17(6), e12829. <https://doi.org/10.1111/acer.12829>

Manzano-Lopez, J., & Monje-Casas, F. (2020). Asymmetric cell division and replicative aging: a new perspective from the spindle poles. *Curr Genet*, 66(4), 719-727. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01074-y>

Martins, R., Lithgow, G. J., & Link, W. (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 15(2), 196-207. <https://doi.org/10.1111/acer.12427>

Mathurin, P., & Bataller, R. (2015). Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *J Hepatol*, 62(1 Suppl), S38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.006>

Meer, M. V., Podolskiy, D. I., Tyshkovskiy, A., & Gladyshev, V. N. (2018). A whole lifespan mouse multi-tissue DNA methylation clock. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.40675>

Meier, P., & Seitz, H. K. (2008). Age, alcohol metabolism and liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11(1), 21-26. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f30564>

Mendenhall, C. L., Rouster, S. D., Roselle, G. A., Grossman, C. J., Ghosn, S., & Gartside, P. (1993). Impact of chronic alcoholism on the aging rat: changes in nutrition, liver composition, and mortality. *Alcohol Clin Exp Res*, 17(4), 847-853. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1993.tb00852.x>

Meng, F., Lorenzo, S. R., Francis, H., Glaser, S., & Alpini, G. (2017). Characterization of cellular senescence mechanisms in alcoholic liver injury. *The FASEB Journal*, 31(S1), 804.803-804.803. https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.804.3

Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biom10030420>

Mueller, S., Peccerella, T., Qin, H., Glassen, K., Waldherr, R., Flechtenmacher, C., Straub, B. K., Millonig, G., Stickel, F., Bruckner, T., Bartsch, H., & Seitz, H. K. (2018). Carcinogenic Etheno DNA Adducts in Alcoholic Liver Disease: Correlation with Cytochrome P-4502E1 and Fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*, 42(2), 252-259. <https://doi.org/10.1111/acer.13546>

Mulligan, J. D., Gonzalez, A. A., Kumar, R., Davis, A. J., & Saupe, K. W. (2005). Aging elevates basal adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activity and eliminates hypoxic activation of AMPK in mouse liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60(1), 21-27. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.1.21>

Nagy, L. E., Ding, W. X., Cresci, G., Saikia, P., & Shah, V. H. (2016). Linking Pathogenic Mechanisms of Alcoholic Liver Disease With Clinical Phenotypes. *Gastroenterology*, 150(8), 1756-1768. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.035>

Nakao, L. S., Everley, R. A., Marino, S. M., Lo, S. M., de Souza, L. E., Gygi, S. P., & Gladyshev, V. N. (2015). Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins. *J Biol Chem*, 290(9), 5685-5695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597245>

Nangliya, V., Sharma, A., Yadav, D., Sunder, S., Nijhawan, S., & Mishra, S. (2015). Study of trace elements in liver cirrhosis patients and their role in prognosis of disease. *Biol Trace Elem Res*, 165(1), 35-40. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0237-3>

Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S. A., Myers, M. P., & Lowe, S. W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*, 126(3), 503-514. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.052>

Navarro, A., & Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(5), R1244-1249. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00226.2004>

Nechemia-Arbely, Y., Shriki, A., Denz, U., Drucker, C., Scheller, J., Raub, J., Pappo, O., Rose-John, S., Galun, E., & Axelrod, J. H. (2011). Early hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy is modulated by IL-6 trans-signaling and PI3K/AKT activation. *J Hepatol*, 54(5), 922-929. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.017>

Niccoli, T., & Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*, 22(17), R741-752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>

Nie, X., Li, C., Hu, S., Xue, F., Kang, Y. J., & Zhang, W. (2017). An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochem Biophys Res*, 12, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.09.001>

Niemann, J., Johne, C., Schroder, S., Koch, F., Ibrahim, S. M., Schultz, J., Tiedge, M., & Baltrusch, S. (2017). An mtDNA mutation accelerates liver aging by interfering with the ROS response and mitochondrial life cycle. *Free Radic Biol Med*, 102, 174-187. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.035>

Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 19(16), 4309-4314. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1424>

Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellscheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., von Zglinicki, T., & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*, 8, 15691. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>

Ohashi, K., Pimienta, M., & Seki, E. (2018). Alcoholic liver disease: A current molecular and clinical perspective. *Liver Res*, 2(4), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.11.002>

Osna, N. A., Donohue, T. M., Jr., & Kharbanda, K. K. (2017). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res*, 38(2), 147-161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28988570>

Paradis, V., Youssef, N., Dargere, D., Ba, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J., & Bedossa, P. (2001). Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol*, 32(3), 327-332. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.22747>

Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B., & von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*, 6, 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>

Pibiri, M. (2018). Liver regeneration in aged mice: new insights. *Aging (Albany NY)*, 10(8), 1801-1824. <https://doi.org/10.18632/aging.101524>

Piskunova, T. S., Yurova, M. N., Ovsyannikov, A. I., Semenchenko, A. V., Zabezhinski, M. A., Popovich, I. G., Wang, Z. Q., & Anisimov, V. N. (2008). Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2008, 754190. <https://doi.org/10.1155/2008/754190>

Rao, R. (2009). Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 50(2), 638-644. <https://doi.org/10.1002/hep.23009>

Rey, S., Quintavalle, C., Burmeister, K., Calabrese, D., Schlageter, M., Quagliata, L., Cathomas, G., Diebold, J., Molinolo, A., Heim, M. H., Terracciano, L. M., & Matter, J. (2017). The liver is a major site of senescence-associated secretory phenotype (SASP) in aging mice. *Cell*, 171(2), 475-487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.025>

M. S. (2017). Liver damage and senescence increases in patients developing hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 32(8), 1480-1486. <https://doi.org/10.1111/jgh.13717>

Reznick, R. M., Zong, H., Li, J., Morino, K., Moore, I. K., Yu, H. J., Liu, Z. X., Dong, J., Mustard, K. J., Hawley, S. A., Befroy, D., Pypaert, M., Hardie, D. G., Young, L. H., & Shulman, G. I. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*, 5(2), 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.008>

Rippo, M. R., Olivieri, F., Monsurro, V., Prattichizzo, F., Albertini, M. C., & Procopio, A. D. (2014). MitomiRs in human inflamm-aging: a hypothesis involving miR-181a, miR-34a and miR-146a. *Exp Gerontol*, 56, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.002>

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>

Ruzehaji, N., Mills, S. J., Melville, E., Arkell, R., Fitridge, R., & Cowin, A. J. (2013). The influence of Flightless I on Toll-like-receptor-mediated inflammation in a murine model of diabetic wound healing. *Biomed Res Int*, 2013, 389792. <https://doi.org/10.1155/2013/389792>

Schneider, J. L., Villarroya, J., Diaz-Carretero, A., Patel, B., Urbanska, A. M., Thi, M. M., Villarroya, F., Santambrogio, L., & Cuervo, A. M. (2015). Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell*, 14(2), 249-264. <https://doi.org/10.1111/acel.12310>

Schottker, B., Zhang, Y., Heiss, J. A., Butterbach, K., Jansen, E. H., Bewerunge-Hudler, M., Saum, K. U., Holleczer, B., & Brenner, H. (2015). Discovery of a novel epigenetic cancer marker related to the oxidative status of human blood. *Genes Chromosomes Cancer*, 54(9), 583-594. <https://doi.org/10.1002/gcc.22271>

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 517-528. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>

Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 6(2), 168-170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>

Seitz, H. K., & Stickel, F. (2007). Alcoholic liver disease in the elderly. *Clin Geriatr Med*, 23(4), 905-921, viii. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2007.06.010>

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166(4), 822-839. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>

Sharma, P., & Arora, A. (2020). Clinical presentation of alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease: spectrum and diagnosis. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 5, 19. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.10.02>

Shearn, C. T., Pulliam, C. F., Pedersen, K., Meredith, K., Mercer, K. E., Saba, L. M., Orlicky, D. J., Ronis, M. J., & Petersen, D. R. (2018). Knockout of the Gsta4 Gene in Male Mice Leads to an Altered Pattern of Hepatic Protein Carbonylation and Enhanced Inflammation Following Chronic Consumption of an Ethanol Diet. *Alcohol Clin Exp Res*, 42(7), 1192-1205. <https://doi.org/10.1111/acer.13766>

Singh, S., Osna, N. A., & Kharbanda, K. K. (2017). Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol*, 23(36), 6549-6570. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>

Stickel, F., Datz, C., Hampe, J., & Bataller, R. (2017). Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. *Gut Liver*, 11(2), 173-188. <https://doi.org/10.5009/gnl16477>

Takahashi, R., Toyoda, E., Aoki, Y., Suzuki, K. T., & Goto, S. (2002). Paradoxical increase of heat-shock response with age in a substrain of F344 rats: comparison between F344/DuCrj and F344/Jcl. *Mech Ageing Dev*, 123(12), 1605-1615. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00096-9](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00096-9)

Tang, C., Chen, H., Jiang, L., & Liu, L. (2022). Liver Regeneration: Changes in Oxidative Stress, Immune System, Cytokines, and Epigenetic Modifications Associated with Aging. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 9018811. <https://doi.org/10.1155/2022/9018811>

Tran, B. N., Valek, L., Wilken-Schmitz, A., Fuhrmann, D. C., Namgaladze, D., Wittig, I., & Tegeder, I. (2021). Reduced exploratory behavior in neuronal nucleoredoxin knockout mice. *Redox Biol*, 45, 102054. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102054>

Victoria, B., Nunez Lopez, Y. O., & Masternak, M. M. (2017). MicroRNAs and the metabolic hallmarks of aging. *Mol Cell Endocrinol*, 455, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.021>

Wakabayashi, S., & Yoshida, H. (2013). The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Comput Struct Biotechnol J*, 6, e201303010. <https://doi.org/10.5936/csbj.201303010>

Wan, Y., McDaniel, K., Wu, N., Ramos-Lorenzo, S., Glaser, T., Venter, J., Francis, H., Kennedy, L., Sato, K., Zhou, T., Kyritsi, K., Huang, Q., Annable, T., Wu, C., Glaser, S., Alpini, G., & Meng, F. (2017). Regulation of Cellular Senescence by miR-34a in Alcoholic Liver Injury. *Am J Pathol*, 187(12), 2788-2798. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.027>

Wang, S., Pacher, P., De Lisle, R. C., Huang, H., & Ding, W. X. (2016). A Mechanistic Review of Cell Death in Alcohol-Induced Liver Injury. *Alcohol Clin Exp Res*, 40(6), 1215-1223. <https://doi.org/10.1111/acer.13078>

White, R. R., Milholland, B., de Bruin, A., Curran, S., Laberge, R. M., van Steeg, H., Campisi, J., Maslov, A. Y., & Vijg, J. (2015). Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing. *Nat Commun*, 6, 6790. <https://doi.org/10.1038/ncomms7790>

Xiao, M., Chen, W., Wang, C., Wu, Y., Zhu, S., Zeng, C., Cai, Y., Liu, C., & He, Z. (2018). Senescence and cell death in chronic liver injury: roles and mechanisms underlying hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 9(9), 8772-8784. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23622>

Xu, Q., Fu, Q., Li, Z., Liu, H., Wang, Y., Lin, X., He, R., Zhang, X., Ju, Z., Campisi, J., Kirkland, J. L., & Sun, Y. (2021). The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. *Nat Metab*, 3(12), 1706-1726. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00491-8>

Yalcin, A., Telang, S., Clem, B., & Chesney, J. (2009). Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol*, 86(3), 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.01.003>

Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*, 26(3), 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>

Zhang, L., & Wang, H. H. (2016). The essential functions of endoplasmic reticulum chaperones in hepatic lipid metabolism. *Dig Liver Dis*, 48(7), 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.03.016>

Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, 20(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9769-1>

12 ANEXOS

12.1 Publicaciones

Fuentes-Hernández S, Alarcón-Sánchez BR, Guerrero-Escalera D, Montes-Aparicio AV, Castro-Gil MP, **Idelfonso-García OG**, Rosas-Madrigal S, Aparicio-Bautista DI, Pérez-Hernández JL, Reyes-Gordillo K, Lakshman MR, Vásquez-Garzón VR, Baltiérrez-Hoyos R, López-González ML, Sierra-Santoyo A, Villa-Treviño S, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2019** Sep 1; 378:114611. doi: 10.1016/j.taap.2019.114611. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31176654. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176654/>

Contribución de la publicación

En esta investigación proponemos un modelo de CHC; en resumen, nuestros resultados demuestran que el DEN administrado crónicamente a 20 mg/kg induce el CHC, mientras que el DEN a 2,5 y 5 mg/kg es de utilidad para dilucidar su efecto sinérgico con otros agentes hepatotóxicos en ratones.

Estos parámetros se establecieron mediante la evaluación de cambios histopatológicos, marcadores del CHC, como la enzima glutatión S-transferasa placentaria-1 (GSTP1), la citoqueratina-19 (CK19) y la prostaglandina reductasa-1 (PTGR1); la evaluación del CYP2E1, una enzima metabolizadora de DEN; y la expresión del marcador de proliferación Ki67.



Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice

Sergio Fuentes-Hernández^a, Brisa Rodope Alarcón-Sánchez^{a,i}, Dafne Guerrero-Escalera^a, Alexia Viridiana Montes-Aparicio^a, María Paulette Castro-Gil^a, Osiris Germán Idelfonso-García^a, Sandra Rosas-Madrigal^b, Diana Ivette Aparicio-Bautista^c, José Luis Pérez-Hernández^d, Karina Reyes-Gordillo^e, M. Raj Lakshman^e, Verónica Rocío Vásquez-Garzón^{f,g}, Rafael Baltiérrez-Hoyos^{f,g}, Ma. de Lourdes López-González^h, Adolfo Sierra-Santoyo^h, Saúl Villa-Treviñoⁱ, Julio Isael Pérez-Carreón^a, Jaime Arellanes-Robledo^{a,f,*}

^a Laboratorio de Enfermedades Hepáticas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, CDMX, Mexico

^b Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto Nacional de Medicina Genómica, CDMX, Mexico

^c Unidad de Proteómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica, CDMX, Mexico

^d Servicios de Gastroenterología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", CDMX, Mexico

^e Lipid Research Laboratory, VA Medical Center, and Department of Biochemistry and Molecular Medicine, The George Washington University Medical Center, Washington, DC, USA

^f Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CDMX, Mexico

^g Facultad de Medicina, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oax, Mexico

^h Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CDMX, Mexico

ⁱ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cyp2e1 Activity
Hepatocellular Carcinoma
Liver Fibrosis
Proliferation
Reactive Oxygen Species

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) arises after a long period of exposition to etiological factors that might be either independent or collectively contributing. Several rodent models resemble human HCC; however, the major limitation of these models is the lack of chronic injury that reproducibly mimics the molecular alterations as it occurs in humans. Thus, we hypothesized that chronic administration of different DEN treatments identifies the best-fit dose to induce the HCC and/or to determine whether small DEN doses act synergistically with other known hepatotoxins to induce HCC in mice. C57BL/6J male mice were intraperitoneally injected twice a week for 6 weeks with different DEN doses ranging from 2.5 to 40 mg/kg body weight; then, selected doses (2.5, 5 and 20 mg/kg) for 6, 10, 14, and 18 weeks. We demonstrated that DEN at 20 mg/kg promoted reactive oxygen species and 4-hydroxynonenal production, cell proliferation inflammatory infiltrate, and fibrosis, which in turn induced liver cancer by week 18. These parameters were established by evaluating histopathological changes, HCC markers such as glutathione S-transferase placental-1 (Gstp1), Cytokeratin-19 (Ck19) and prostaglandin reductase-1 (Ptgr1); that of Cyp2e1, a DEN metabolizing enzyme; and the expression of the proliferation marker Ki67. While DEN at 2.5 and 5 mg/kg increased Gstp1 and Ck19, DEN at 20 mg/kg decreased them and Cyp2e1 expression and activity. In summary, our results demonstrate that DEN chronically administered at 20 mg/kg induces the HCC, while DEN at 2.5 and 5 mg/kg could be useful in elucidating its synergistic effect with other hepatotoxic agents in mice.

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver

cancer and second cause of cancer related mortality, and represents a major health problem worldwide (Llovet et al., 2016). Cirrhosis is the most common chronic liver disease that results from a long-term liver

Abbreviations: 4-HNE, 4-hydroxynonenal; DEN, Diethylnitrosamine; HCC, Hepatocellular carcinoma; ROS, Reactive Oxygen Species

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Medicina Genómica – INMEGEN, Periférico Sur # 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, CP: 14610 CDMX, Mexico.

E-mail address: jarellanes@inmegen.gob.mx (J. Arellanes-Robledo).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114611>

Received 6 April 2019; Received in revised form 31 May 2019; Accepted 3 June 2019

Available online 06 June 2019

0041-008X/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Zepeda-Bastida A, Ocampo-López J, Alarcón-Sánchez BR, **Idelfonso-García OG**, Rosas-Madrigal S, Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo J. Aqueous extracts from *Tenebrio molitor* larval and pupal stages inhibit early hepatocarcinogenesis in vivo. J Zhejiang Univ Sci B. **2021** Dec 15;22(12):1045-1052. English. doi: 10.1631/jzus. B2100201. PMID: 34904416; PMCID: PMC8669325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34904416/>

Contribución de la publicación

Hemos documentado que los extractos acuosos de los estadios larvario y de pupa de *T. molitor* tuvieron propiedades quimioprotectoras durante la hepatocarcinogénesis temprana en ratones. Estos extractos acuosos bloquearon las alteraciones tempranas que preceden al establecimiento del CHC y aquellas asociadas a la aparición del CHC, como el desorden de la arquitectura hepática, la hipertrofia de los hepatocitos y la fibrogénesis, así como la proliferación celular.

Nuestros resultados sugieren que las larvas de *T. molitor*, pero aún más notablemente las pupas, contienen compuestos bioactivos adicionales que están ausentes en la etapa adulta y exhiben potencial terapéutico contra las alteraciones tempranas que eventualmente conducen a la carcinogénesis hepática. Nuestros hallazgos alientan el consumo de larvas de *T. molitor* en poblaciones de alto riesgo de CHC, como estrategia preventiva.



Correspondence

<https://doi.org/10.1631/jzus.B2100201>

Aqueous extracts from *Tenebrio molitor* larval and pupal stages inhibit early hepatocarcinogenesis in vivo

Armando ZEPEDA-BASTIDA^{2,✉}, Juan OCAMPO-LÓPEZ², Brisa Rodope ALARCÓN-SÁNCHEZ^{1,3},
Osiris Germán IDELFONSO-GARCÍA¹, Sandra ROSAS-MADRIGAL⁴, Diana Ivette APARICIO-BAUTISTA⁵,
Julio Isael PÉREZ-CARREÓN¹, Saúl VILLA-TREVIÑO³, Jaime ARELLANES-ROBLEDO^{1,6,✉}

¹Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine-INMEGEN, CDMX 14610, Mexico

²Institute of Agricultural Sciences, Autonomous University of Hidalgo State-ICAP-UAEH, Hidalgo 43600, Mexico

³Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute-CINVESTAV-IPN, CDMX 07360, Mexico

⁴Laboratory of Cardiovascular Diseases, National Institute of Genomic Medicine-INMEGEN, CDMX 14610, Mexico

⁵Proteomics Unit, National Institute of Genomic Medicine-INMEGEN, CDMX 14610, Mexico

⁶Directorate of Cátedras, National Council of Science and Technology-CONACYT, CDMX 03940, Mexico

Hepatocellular carcinoma (HCC), which is the most frequent primary liver malignancy, is ranked as the sixth most common cancer and the third leading cause of cancer-related deaths worldwide, with its incidence expected to continue rising. One of the reasons is that most patients are diagnosed at an advanced stage when therapeutic options are ineffective. The development of HCC is attributed to a chronic exposition to either one or a combination of low amounts of different hepatotoxins, such as in hepatitis virus infection, alcohol consumption, aflatoxin from contaminated foods, metabolic factors, and exposure to chemical carcinogens from tobacco smoke (Forner et al., 2018). Integrative studies combining exome sequencing, transcriptome analysis, and the genomic characterization of HCC have shown that these etiological factors may raise the frequency of particular genetic alterations, resulting in intra-tumor heterogeneity that presents a huge challenge for treatment. For example, mutations in the catenin β -1 (*CTNNB1*) gene (a proto-oncogene in the WNT signaling pathway that encodes the β -catenin transcription factor) are strongly associated with alcohol-related

HCC, whereas mutations in the telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter and tumor protein p53 (*TP53*) genes are the most commonly observed in hepatitis B virus (HBV)-associated HCC (Calderaro et al., 2017; Cancer Genome Atlas Research Network, 2017). The above findings emphasize the molecular diversity of HCC and the associations of different etiologies with distinct mechanisms in HCC progression. Consequently, prevention strategies are still attractive for HCC management.

Historically, edible insects have been consumed for thousands of years because of their nutritional and medicinal properties. Insects are rich in proteins, essential amino acids, and unsaturated fatty acids, and some species further contain substantial amounts of minerals and vitamins. The antibacterial and anticancer potential of either the whole insect body or isolated bioactive compounds has also been investigated (Ratcliffe et al., 2011). *Tenebrio molitor* is a coleopteran insect of the Tenebrionidae family, and is considered as a harmful pest of stored grain worldwide (Gao et al., 2018). The development of *T. molitor* includes four life stages: egg, larva, pupa, and adult. The larvae and adults of *T. molitor* are commonly known as yellow mealworms and mealworm beetles, respectively. Owing to their high nutritional value, mealworm beetles have been used as food and medicine in various forms, such as protein powder, oil, chitin, and a whole worm (Gao et al., 2018). Interestingly, the oil extract of *T.*

✉ Jaime ARELLANES-ROBLEDO, jarellanes@inmegen.gob.mx

Armando ZEPEDA-BASTIDA, azepeda@uaeh.edu.mx

✉ Jaime ARELLANES-ROBLEDO, <https://orcid.org/0000-0001-7363-4870>

Armando ZEPEDA-BASTIDA, <https://orcid.org/0000-0003-0572-5206>

Received Feb. 28, 2021; Revision accepted Aug. 23, 2021;

Crosschecked Nov. 17, 2021

© Zhejiang University Press 2021

Idelfonso-García OG, Alarcón-Sánchez BR, Vásquez-Garzón VR, Baltiérrez-Hoyos R, Villa-Treviño S, Muriel P, Serrano H, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Is Nucleoredoxin a Master Regulator of Cellular Redox Homeostasis? Its Implication in Different Pathologies. *Antioxidants* (Basel). **2022** Mar 30;11(4):670. doi: 10.3390/antiox11040670. PMID: 35453355; PMCID: PMC9030443. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35453355/>

Contribución de la publicación

Hemos resumido la multifuncionalidad de la NXN en la fisiología celular y su implicación en diferentes patologías.

La NXN, una enzima oxidorreductasa, contribuye la homeostasis redox celular al regular diferentes vías de señalización de manera redox dependiente. Al interactuar con siete proteínas, hasta ese momento; como son DVL, PP2A, PFK1, SEC63, MYD88, FLII y la CAMK2A. En conjunto, esta evidencia sitúa a la NXN como un fuerte candidato para ser un regulador redox maestro de la fisiología celular y como el centro de diferentes vías de señalización sensibles a redox y patologías asociadas.



Review

Is Nucleoredoxin a Master Regulator of Cellular Redox Homeostasis? Its Implication in Different Pathologies

Osiris Germán Idelfonso-García ^{1,2}, Brisa Rodope Alarcón-Sánchez ^{1,3}, Verónica Rocío Vázquez-Garzón ^{4,5}, Rafael Baltiérrez-Hoyos ^{4,5}, Saúl Villa-Treviño ³, Pablo Muriel ⁶, Héctor Serrano ², Julio Isael Pérez-Carreón ¹ and Jaime Arellanes-Robledo ^{1,5,*}

- ¹ Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine-INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico; oidelfonso@inmegen.edu.mx (O.G.I.-G.); brisa.alarcon@cinvestav.mx (B.R.A.-S.); jiperez@inmegen.gob.mx (J.I.P.-C.)
 - ² Department of Health Sciences, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Mexico City 09340, Mexico; hser@xanum.uam.mx
 - ³ Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute-CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico; svilla@cell.cinvestav.mx
 - ⁴ Laboratory of Fibrosis and Cancer, Faculty of Medicine and Surgery, 'Benito Juárez' Autonomous University of Oaxaca-UABJO, Oaxaca 68020, Mexico; vrvasquezga@conacyt.mx (V.R.V.-G.); rbaltierrezho@conacyt.mx (R.B.-H.)
 - ⁵ Directorate of Cátedras, National Council of Science and Technology-CONACYT, Mexico City 03940, Mexico
 - ⁶ Laboratory of Experimental Hepatology, Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute-CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico; pmuriel@cinvestav.mx
- * Correspondence: jarellanes@inmegen.gob.mx; Tel.: +52-55-5350-1900 (ext. 1218)



Citation: Idelfonso-García, O.G.;

Alarcón-Sánchez, B.R.;

Vázquez-Garzón, V.R.;

Baltiérrez-Hoyos, R.; Villa-Treviño, S.;

Muriel, P.; Serrano, H.; Pérez-Carreón, J.I.; Arellanes-Robledo, J. Is

Nucleoredoxin a Master Regulator of

Cellular Redox Homeostasis? Its

Implication in Different Pathologies.

Antioxidants **2022**, *11*, 670. <https://doi.org/10.3390/antiox11040670>

Academic Editor: Eva-Maria Hanschmann

Received: 28 February 2022

Accepted: 28 March 2022

Published: 30 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nucleoredoxin (NXN), an oxidoreductase enzyme, contributes to cellular redox homeostasis by regulating different signaling pathways in a redox-dependent manner. By interacting with seven proteins so far, namely disheveled (DVL), protein phosphatase 2A (PP2A), phosphofructokinase-1 (PFK1), translocation protein SEC63 homolog (SEC63), myeloid differentiation primary response gene-88 (MYD88), flightless-I (FLII), and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II type alpha (CAMK2A), NXN is involved in the regulation of several key cellular processes, including proliferation, organogenesis, cell cycle progression, glycolysis, innate immunity and inflammation, motility, contraction, protein transport into the endoplasmic reticulum, neuronal plasticity, among others; as a result, NXN has been implicated in different pathologies, such as cancer, alcoholic and polycystic liver disease, liver fibrogenesis, obesity, Robinow syndrome, diabetes mellitus, Alzheimer's disease, and retinitis pigmentosa. Together, this evidence places NXN as a strong candidate to be a master redox regulator of cell physiology and as the hub of different redox-sensitive signaling pathways and associated pathologies. This review summarizes and discusses the current insights on NXN-dependent redox regulation and its implication in different pathologies.

Keywords: oxidative stress; oxidoreductase; redox regulation; thioredoxin

1. Introduction

Thioredoxins (TRX) are small thiol-oxidoreductase enzymes that regulate cellular redox homeostasis, and their functioning depend on the cyclic reduction-oxidation of a single disulfide group in the enzymes [1]. TRX superfamily includes conventional TRX, glutaredoxin, protein disulfide isomerase and NXN [2]. NXN gene was first cloned and overexpressed in cell cultures and, since NXN was identified as a nuclear protein, it was named nucleoredoxin, the first member of the TRX superfamily localized into the nucleus. Further analysis revealed that NXN shuttles between the cytosol and nucleus despite the lack of the typical nuclear localization signal and nuclear export signal sequences [3–5]. NXN is an antioxidant enzyme that participates in the regulation of several cell processes

Idelfonso-García OG, Alarcón-Sánchez BR, Guerrero-Escalera D, López-Hernández NA, Pérez-Hernández JL, Pacheco-Rivera R, Serrano-Luna J, Resendis-Antonio O, Muciño-Olmos EA, Aparicio-Bautista DI, et al. Nucleoredoxin Redox Interactions Are Sensitized by Aging and Potentiated by Chronic Ethanol Consumption in the Mouse Liver. *Antioxidants*. **2024**; 13(3):257. <https://doi.org/10.3390/antiox13030257>

Contribución de la publicación

Demostramos un fenómeno emergente asociado con la homeostasis redox alterada durante el envejecimiento, como lo demuestra la capacidad cada vez menor de la NXN para interactuar con proteínas asociadas, que se ve potenciado por el consumo crónico de etanol en el hígado del ratón. Esta evidencia abre una ventana atractiva para dilucidar las consecuencias del envejecimiento y el consumo crónico de etanol río abajo de las vías de señalización que son reguladas por interacciones redox sensibles dependientes de la NXN.



Article

Nucleoredoxin Redox Interactions Are Sensitized by Aging and Potentiated by Chronic Alcohol Consumption in the Mouse Liver

Osiris Germán Idelfonso-García ^{1,2,*}, Brisa Rodope Alarcón-Sánchez ^{1,3}, Dafne Guerrero-Escalera ¹, Norma Arely López-Hernández ¹, José Luis Pérez-Hernández ⁴, Ruth Pacheco-Rivera ⁵, Jesús Serrano-Luna ³, Osbaldo Resendis-Antonio ^{6,7}, Erick Andrés Muciño-Olmos ⁸, Diana Ivette Aparicio-Bautista ⁹, Gustavo Basurto-Islas ¹⁰, Rafael Baltiérrez-Hoyos ^{11,12}, Verónica Rocío Vásquez-Garzón ^{11,12}, Saúl Villa-Treviño ³, Pablo Muriel ¹³, Héctor Serrano ², Julio Isael Pérez-Carreón ¹ and Jaime Arellanes-Robledo ^{1,12,*}

- ¹ Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine—INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico; brisa.alarcon@cinvestav.mx (B.R.A.-S.); dguerrero@inmegen.gob.mx (D.G.-E.); nalopez@inmegen.gob.mx (N.A.L.-H.); jperez@inmegen.gob.mx (J.L.P.-C.)
 - ² Department of Health Sciences, Div CBS, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus, Mexico City 09340, Mexico; hser@xanum.uam.mx
 - ³ Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute—CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico; jesus.serrano@cinvestav.mx (J.S.-L.); svilla@cell.cinvestav.mx (S.V.-T.)
 - ⁴ Department of Gastroenterology and Hepatology, Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, Mexico City 06720, Mexico; jose.luis.perezhe@pemex.com
 - ⁵ Laboratory of Molecular Diagnostics, Department of Biochemistry, National School of Biological Sciences of the National Polytechnic Institute, Mexico City 07738, Mexico; rpachecor@ipn.mx
 - ⁶ Laboratory of Human Systems Biology, National Institute of Genomic Medicine—INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico; oresendis@inmegen.gob.mx
 - ⁷ Coordination of Scientific Research—CIC, Research Support Network—RAI, Center for Complexity Sciences—C3, National Autonomous University of Mexico—UNAM, Mexico City 04510, Mexico
 - ⁸ Division of Translational Cancer Research, Department of Laboratory Medicine, Lund University, 22381 Lund, Sweden; erick.mucino_olmos@med.lu.se
 - ⁹ Laboratory of Genomics of Bone Metabolism, National Institute of Genomic Medicine—INMEGEN, Mexico City 14610, Mexico; daparicio@inmegen.gob.mx
 - ¹⁰ Department of Science and Engineering, University of Guanajuato, Leon 37670, Guanajuato, Mexico; gustavo.basurto@ugto.mx
 - ¹¹ Laboratory of Fibrosis and Cancer, Faculty of Medicine and Surgery, ‘Benito Juárez’ Autonomous University of Oaxaca—UABJO, Oaxaca 68120, Mexico; rbaltierrezho@conacyt.mx (R.B.-H.); vrvasquezga@conacyt.mx (V.R.V.-G.)
 - ¹² Deputy Directorate of Humanistic and Scientific Research, National Council of Humanities, Sciences and Technologies—CONAHCYT, Mexico City 03940, Mexico
 - ¹³ Laboratory of Experimental Hepatology, Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute—CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico; pmuriel@cinvestav.mx
- * Correspondence: oidefonso@inmegen.edu.mx (O.G.I.-G.); jarellanes@inmegen.gob.mx (J.A.-R.); Tel.: +52-55-5350-1900 (ext. 1218) (J.A.-R.)



Citation: Idelfonso-García, O.G.;

Alarcón-Sánchez, B.R.;

Guerrero-Escalera, D.;

López-Hernández, N.A.;

Pérez-Hernández, J.L.;

Pacheco-Rivera, R.; Serrano-Luna, J.;

Resendis-Antonio, O.; Muciño-Olmos,

E.A.; Aparicio-Bautista, D.I.; et al.

Nucleoredoxin Redox Interactions

Are Sensitized by Aging and

Potentiated by Chronic Alcohol

Consumption in the Mouse Liver.

Antioxidants **2024**, *13*, 257. [https://](https://doi.org/10.3390/antiox13030257)

doi.org/10.3390/antiox13030257

Academic Editor: Marco Fiore

Received: 29 January 2024

Revised: 10 February 2024

Accepted: 14 February 2024

Published: 20 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

Abstract: Aging is characterized by increased reactive species, leading to redox imbalance, oxidative damage, and senescence. The adverse effects of alcohol consumption potentiate aging-associated alterations, promoting several diseases, including liver diseases. Nucleoredoxin (NXN) is a redox-sensitive enzyme that targets reactive oxygen species and regulates key cellular processes through redox protein–protein interactions. Here, we determine the effect of chronic alcohol consumption on NXN-dependent redox interactions in the liver of aged mice. We found that chronic alcohol consumption preferentially promotes the localization of NXN either into or alongside senescent cells, declines its interacting capability, and worsens the altered interaction ratio of NXN with FLII, MYD88, CAMK2A, and PFK1 proteins induced by aging. In addition, carbonylated protein and cell proliferation increased, and the ratios of collagen I and collagen III were inverted. Thus, we demonstrate an emerging phenomenon associated with altered redox homeostasis during aging, as shown by the declining capability of NXN to interact with partner proteins, which is enhanced

Idelfonso-García OG, Pacheco-Rivera R, Alarcón-Sánchez BR, Serrano-Luna J, Baltiérrez-Hoyos R, Vásquez-Garzón VR, Muriel P, Villa-Treviño S, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Protocol to detect senescence-associated β -galactosidase and immunoperoxidase activity in fresh-frozen murine tissues. STAR Protoc. **2024** Apr 10;5(2):103009. doi: 10.1016/j.xpro.2024.103009. Epub ahead of print. PMID: 38602869; PMCID: PMC11017356.

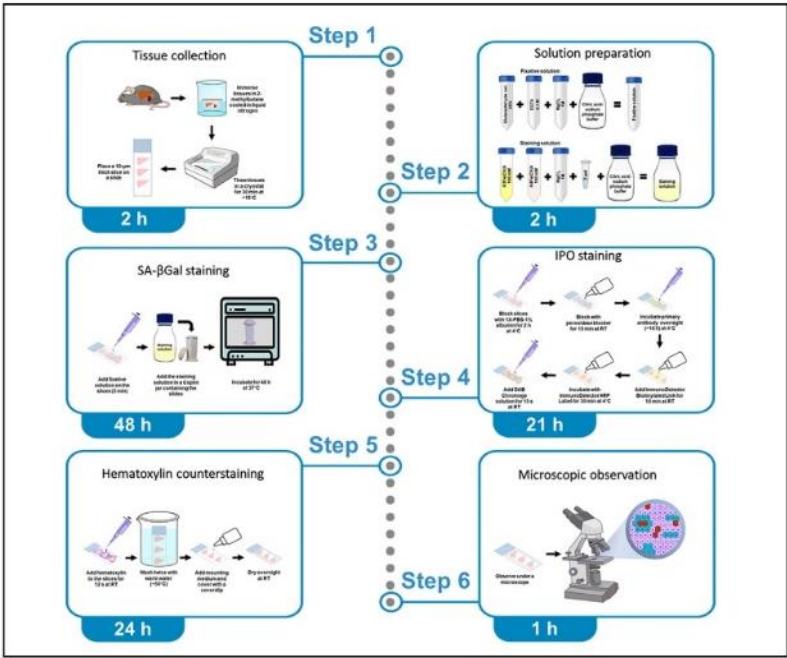
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38602869/>

Contribución de la publicación

En esta investigación proponemos un protocolo de doble marcaje para detectar *in situ* diferentes proteínas junto con la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β Gal) en tejidos murinos recién congelados; en resumen, describimos los pasos para la colección de tejido, la preparación de las soluciones, la tinción con SA- β Gal, la tinción con inmunoperoxidasa, la contratinción con hematoxilina, la observación microscópica y la cuantificación de la señal de la SA- β Gal con la de la proteína de interés.

Protocol

Protocol to detect senescence-associated β -galactosidase and immunoperoxidase activity in fresh-frozen murine tissues



Double labeling to identify different markers in the same tissue section represents a useful tool either for *in situ* diagnosis or characterization of molecular associations. Here, we present a protocol to detect senescence-associated β -galactosidase (SA- β Gal) and immunoperoxidase (IPO) activity in fresh-frozen murine tissues. We describe steps for tissue collection, solution preparation, SA- β Gal staining, IPO staining, hematoxylin counterstaining, microscopic observation, and signal quantification. This protocol can be used to detect *in situ* proteins alongside SA- β Gal activity.

Publisher's note: Undertaking any experimental protocol requires adherence to local institutional guidelines for laboratory safety and ethics.

Osiris Germán
Idelfonso-García,
Ruth Pacheco-
Rivera, Brisa Rodope
Alarcón-Sánchez, ...,
Saúl Villa-Treviño,
Julio Isael Pérez-
Carreón, Jaime
Arellanes-Robledo

oidelfonso@inmegen.
edu.mx (O.G.I.-G.)
jarellanes@inmegen.gob.
mx (J.A.-R.)

Highlights

A protocol to detect
in situ different
proteins alongside
SA- β Gal activity

Steps for tissue
collection, solution
preparation, and SA-
 β Gal and IPO staining

Instructions for tissue
contrasting and
visualizing and signal
quantification

Idelfonso-García et al., STAR
Protocols 5, 103009
June 21, 2024 © 2024 The
Authors. Published by Elsevier
Inc.
[https://doi.org/10.1016/
j.xpro.2024.103009](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103009)

Alarcón-Sánchez BR, **Idelfonso-García OG**, Guerrero-Escalera D, Piña-Vázquez C, de Anda-Jáuregui G, Pérez-Hernández JL, de la Garza M, García-Sierra F, Sánchez-Pérez Y, Baltiérrez-Hoyos R, Vásquez-Garzón VR, Muriel P, Pérez-Carreón JI, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo J. A model of alcoholic liver disease based on different hepatotoxics leading to liver cancer. *Biochem Pharmacol.* **2024** Apr 16:116209. doi: 10.1016/j.bcp.2024.116209. Epub ahead of print. PMID: 38621424.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38621424/>

Contribución de la publicación

En esta investigación proponemos un modelo útil para explorar las alteraciones y etapas cronológicas asociadas a la enfermedad hepática alcohólica (ALD) así como para abordar enfoques terapéuticos. Demostramos que el modelo de ALD de múltiples hepatotóxicos (MHT-ALD) induce a la Alcohol Deshidrogenasa 1A, un metabolizador de etanol y a la Nucleorredoxina, una enzima redox sensible; promueve la esteatosis asociada con la formación de gotas lipídicas, incrementa la inflamación identificada por la infiltración de neutrófilos hepáticos, aumenta el nivel de MYD88, una proteína involucrada en la respuesta inflamatoria, y la aparición temprana de senescencia celular. También, el MHT-ALD induce la fibrosis hepática acompañada de un desbalance entre la muerte celular y la proliferación compensatoria; adicionalmente, induce rasgos histopatológicos de malignidad que correlaciona con el incremento del marcador de carcinoma hepatocelular, GSTP1.



A model of alcoholic liver disease based on different hepatotoxics leading to liver cancer

Brisa Rodope Alarcón-Sánchez^{a,b,*}, Osiris Germán Idelfonso-García^b, Dafne Guerrero-Escalera^b, Carolina Piña-Vázquez^a, Guillermo de Anda-Jáuregui^{c,d}, José Luis Pérez-Hernández^e, Mireya de la Garza^a, Francisco García-Sierra^a, Yesennia Sánchez-Pérez^f, Rafael Baltiérrez-Hoyos^{g,d}, Verónica Rocío Vásquez-Garzón^{d,g}, Pablo Muriel^h, Julio Isael Pérez-Carreón^b, Saúl Villa-Treviño^a, Jaime Arellanes-Robledo^{b,d,*}

^a Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute – CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

^b Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine – INMEGEN, Mexico City, Mexico

^c Computational Genomics Division, National Institute of Genomic Medicine – INMEGEN, Mexico City, Mexico

^d Deputy Directorate of Humanistic and Scientific Research, National Council of Humanities, Sciences and Technologies – CONAHCYT, Mexico City, Mexico

^e Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Mexico “Dr. Eduardo Liceaga”, Mexico City, Mexico

^f Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología – INCan, Mexico City, Mexico

^g Laboratory of Fibrosis and Cancer, Faculty of Medicine and Surgery, “Benito Juárez” Autonomous University of Oaxaca – UABJO, Oaxaca, Mexico

^h Laboratory of Experimental Hepatology, Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute – CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Alcohol consumption
Animal model
Cellular senescence
Diethylnitrosamine
Lipopolysaccharide
Sucrose

ABSTRACT

The worst-case scenario related to alcoholic liver disease (ALD) arises after a long period of exposure to the harmful effect of alcohol consumption along with other hepatotoxics. ALD encompasses a broad spectrum of liver-associated disorders, such as steatosis, steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Based on the chronic administration of different hepatotoxics, including ethanol, sucrose, lipopolysaccharide, and low doses of diethylnitrosamine over a short period, here we aimed to develop a multiple hepatotoxic (MHT)-ALD model in the mouse that recapitulates the human ALD-associated disorders. We demonstrated that the MHT-ALD model induces ADH1A and NXN, an ethanol metabolizer and a redox-sensor enzyme, respectively; promotes steatosis associated with the induction of the lipid droplet forming FSP27, inflammation identified by the infiltration of hepatic neutrophils-positive to LY-6G marker, and the increase of MYD88 level, a protein involved in inflammatory response; and stimulates the early appearance of cellular senescence identified by the senescence markers SA- β -gal activity and p-H2A.X^{Ser139}. It also induces fibrosis associated with increased desmin, a marker of hepatic stellate cells whose activation leads to the deposition of collagen fibers, accompanied by cell death and compensatory proliferation revealed by increased CASP3-mediated apoptosis, and Ki67- and PCNA-proliferation markers, respectively. It also induces histopathological traits of malignancy and the level of

Abbreviations: ALD, alcoholic liver disease; BW, body weight; CEC, chronic ethanol consumption; DEN, diethylnitrosamine; DSC, DEN-sucrose control; H&E, hematoxylin and eosin; HCC, hepatocellular carcinoma; HSC, hepatic stellate cells; IHC, immunohistochemistry; LPS, lipopolysaccharides; M'sT, Masson's trichrome; MHT, multiple hepatotoxic; epMHT, endpoint MHT approach; stMHT, short-term MHT approach; NTC, nontreated control; epNTC, endpoint NTC; stNTC, short-term NTC; ROS, reactive oxygen species; SA- β -gal, senescence-associated β -galactosidase; SC, sucrose control; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling; WB, western blot. **Symbols:** ADH1A, alcohol dehydrogenase 1A; CASP3, caspase-3; CYP2E1, cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1; FSP27, fat-specific protein 27; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSTP1, glutathione S-transferase Pi-1; p-H2A.X^{Ser139}, histone H2A.X phosphorylated at Serine139; Ki67, proliferation marker protein Ki-67; LY-6G, lymphocyte antigen 6 family member G6D; MYD88, myeloid differentiation primary response gene 88; NXN, nucleoredoxin; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TLR, toll-like receptor.

* Corresponding authors at: Department of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, Mexico City 07360, Mexico (B.R. Alarcón-Sánchez), Laboratory of Liver Diseases, INMEGEN, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Mexico City 14610, Mexico (J. Arellanes-Robledo).

E-mail addresses: brisa.alarcon@cinvestav.mx (B.R. Alarcón-Sánchez), jarellanes@inmegen.gob.mx (J. Arellanes-Robledo).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116209>

Received 16 January 2024; Received in revised form 2 April 2024; Accepted 12 April 2024

Available online 16 April 2024

0006-2952/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

12.2 Congresos

2023. Nucleoredoxin-dependent functioning is dysregulated by chronic ethanol consumption and is associated with the establishment of cellular senescence in the liver of aged mice

O.G. Idelfonso-García, B.R. Alarcón-Sánchez, Héctor Serrano, V.R. Vásquez-Garzón, S. Villa-Treviño, Pablo Muriel, J.I. Pérez-Carreón, J. Arellanes-Robledo.

Aportación del trabajo en el congreso

Demostramos que, durante el envejecimiento el consumo crónico de etanol exacerba la senescencia celular, aumenta el estrés oxidante, disminuye el nivel de la proteína NXN, altera las interacciones proteínicas dependientes de la NXN y modifica el perfil de expresión génica en el hígado.

Además, nuestros resultados sugieren que la NXN desempeña un papel central en la protección de las células hepáticas frente al estrés oxidante exacerbado por el consumo crónico de etanol en ratones jóvenes, pero no en ratones envejecidos.



CERTIFICATE OF PRESENTATION

Geneva, Friday 07 July 2023

The European Association for the Study of the Liver (EASL) organised the EASL Congress 2023 held in Vienna from 21 to 24 June 2023.

EASL certifies that the abstract number **FRI-426-YI** co-authored by Osiris German Idelfonso García, Brisa Alarcón-Sánchez, Verónica Rocío Vásquez-Garzón, Saúl Villa-Treviño, Pablo Muriel, Héctor Serrano, Julio Israel Pérez-Carreón, Jaime Arellanes-Robledo entitled ***“Nucleoredoxin-dependent functioning is dysregulated by chronic alcohol consumption and is associated with the establishment of cellular senescence in the liver of aged mice”*** was presented as poster by **Osiris German Idelfonso García** on Friday 23 June 2023 in the poster area.

In addition, EASL certifies that **Osiris German Idelfonso García** has been granted a Trainees and Postdocs bursary to attend the congress. The bursary included: travel grant, congress waved registration fee and free EASL membership for one year.

On behalf of the scientific committee, we would like to thank you again for your important contribution to the EASL Congress 2023.

Céline Santo

Céline Santo
Scientific Programme Coordinator



Nucleoredoxin-dependent functioning is dysregulated by chronic alcohol consumption and is associated with the establishment of cellular senescence in the liver of aged mice

O.G. Iñeloro-García^{1,2}, B.R. Alarcón-Sánchez^{1,3}, Héctor Serrano², V.R. Vázquez-García⁴, S. Villa-Treviño³, Pablo Murfies⁵, J.L. Pérez-Carrón¹, J. Avelino-Robledo^{6,7}

1. Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Genomic Medicine – INMIGEN, Mexico City 14810, Mexico
2. Department of Health Sciences, Metropolitan Autonomous University-Tlalcala Campus, Mexico City 09340, Mexico
3. Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute – CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico
4. Laboratory of Fibrosis and Cancer, Faculty of Medicine and Surgery, Benito Juárez Autonomous University of Oaxaca – UABJO, Oaxaca 68020, Mexico
5. Laboratory of Experimental Hepatology, Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico
6. National Council of Science and Technology – CONACYT, Directorate of Catedras, Mexico City 03940, Mexico
7. Casa abierta al tiempo, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Introduction

Aging is a natural process that causes progressive loss of tissue and organ function over time (1). Several altered molecular mechanisms triggering human aging have been reported, such as oxidative stress, DNA damage response, among others (2), promoting some tissues to enter into a permanent cell cycle arrest. Most cells in these tissues cannot proliferate but remain metabolically active for an extended period of time, which are called senescent cells (3). Aging exacerbate the progression of alcoholic liver disease (ALD), which is associated with a progressive and generalized deterioration of cellular functions, thereby leading to the development of age-related liver disease (4). When reactive oxygen species (ROS) produced by ethanol metabolism exceed the capacity of the endogenous antioxidant system, the cells exposed to oxidative stress undergo either necrosis or apoptosis. ROS also induce oxidative modifications of proteins, lipids, and nucleic acids, leading to the formation of ROS. Nucleoredoxin (NXN), a redox-sensitive endonuclease that targets ROS, plays a central role in maintaining the integrity of the antioxidant system by regulating key cellular processes through redox-sensitive interactions (5); however, the NXN involvement in cellular senescence promoted during ALD progression, has not been investigated.

Aim

To determine the involvement of NXN in ALD progression during aging in the mouse liver.

Method

ALD was recapitulated in 7-week-old (young) C57BL/6J female mice, 12-month-old (adult) and 18-month-old (aged) by the chronic ethanol (20%) consumption in 20% of sucrose for eight weeks and a single dose of lipopolysaccharide (1 mg/kg). We evaluated cellular senescence markers, NXN protein level and NXN-dependent protein-protein interaction status, as well as, gene expression profile changes by transcriptomic analysis.

Conclusions

During aging, the chronic alcohol consumption exacerbates cellular senescence, increases oxidative stress, decreases NXN protein level, disrupts NXN-dependent protein interactions, and modifies the gene expression profile in the liver compared with protein levels in young mice. NXN is preferentially localized into the nuclei of senescent cells. Our results strongly suggest that NXN-dependent protein-protein interactions in senescent liver cells from exacerbated oxidative stress produced by chronic alcohol consumption in young but not in aged mice.

Acknowledgements

O.G.I.G. and B.R.A.S. thank to CONACYT-Mexico for awarding the doctoral fellowship No. 431419, and the masters and doctoral fellowships No. 484737 and 752715, respectively. J.A.R. thanks to Catedras-CONACYT program. This work was funded by CONACYT (Grant No. CF2019-53358) and INMIGEN (Grant No. 06/20171) to J.A.R.

References

1. Flatt T. A new definition of aging? Front Genet. 2012;3:148.
2. Sharkey AH, LeClerc AC. Genetic factors associated with longevity: a review of recent findings. Ageing Res Rev. 2016;16:1-7.
3. S. Sharpless. Cellular senescence in human aging and disease. Cell. 2017;169(6):1004-1016.
4. A. Serrano. Senescence and the hallmarks of aging. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(5):275-282.
5. Kurokawa H, et al. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. Genomics. 1997;39(3):331-9.

Contact information

E-mail: odelinoro@imigen.edu.mx; Tel.: +52-55-5919-2079

Results

During aging, chronic alcohol consumption exacerbates cellular senescence and NXN is preferentially localized into the nuclei of senescent cells

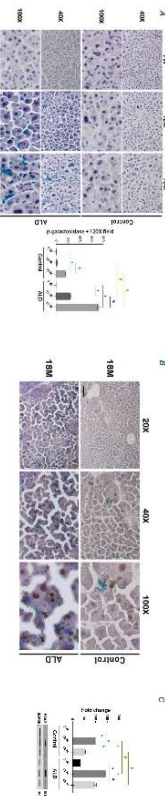


Figure 1. Effect of chronic alcohol consumption on cellular senescence during aging in the mouse liver. (A) Histomorphology and quantification of liver. (B) Immunofluorescence images of liver. (C) Quantification of NXN nuclear localization. Micrographs from young (7w), adult (12m), and aged (18m) mice. Scale bars: 100 µm. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Chronic alcohol consumption increases protein oxidation and decreases NXN protein level during aging in the mouse liver

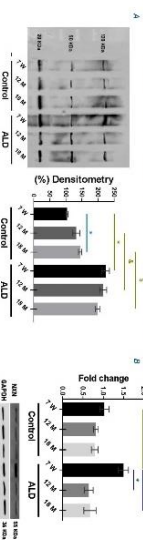


Figure 2. Effect of chronic alcohol consumption on protein oxidation and NXN protein level. (A) Western blot analysis and densitometry images showing protein levels of NXN and GAPDH. (B) Densitometry images showing protein levels of NXN and GAPDH. Scale bars: 100 µm. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Chronic alcohol consumption disrupts the interaction of NXN with proteins involved in various cellular processes during aging in mice liver

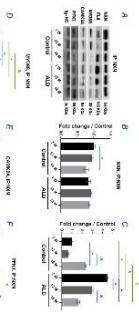


Figure 3. Effect of chronic alcohol consumption on the interaction of NXN with proteins involved in various cellular processes during aging in mice liver. (A) Co-immunoprecipitation analysis. (B) Densitometry images showing protein levels of NXN and GAPDH. Scale bars: 100 µm. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Chronic alcohol consumption modifies the gene expression profile in the liver of aged mice

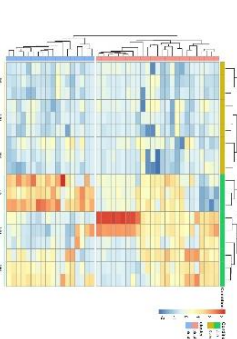


Figure 4. Effect of chronic alcohol consumption on the gene expression profile in the liver of aged mice. (A) Heatmap showing the expression profile of various genes. (B) Bar graph showing the quantification of gene expression changes. Scale bars: 100 µm. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.



2023. Low doses of different hepatotoxins induce ethanol-related liver disease and drive hepatocellular carcinoma

B.R. Alarcón-Sánchez, **O.G. Idelfonso-García**, V.R. Vásquez-Garzón, P. Muriel, J.I. Pérez-Carreón, S. Villa-Treviño, J. Arellanes-Robledo.

Aportación del trabajo en el congreso

Aportamos pruebas que demuestran que la administración simultánea de etanol disuelto en sacarosa y dosis bajas de LPS y DEN exacerba las alteraciones asociadas a la EHA al producir efectos deletéreos progresivos en el hígado que conducen al CHC.

Adicionalmente, introducimos un modelo prometedor de EHA por múltiples hepatotóxicos para recapitular con mayor precisión la patogénesis asociada a la EHA y eventualmente, identificar dianas terapéuticas para el tratamiento de los diferentes estadios por los que cursa la EHA.



CERTIFICATE OF PRESENTATION

Geneva, Friday 07 July 2023

The European Association for the Study of the Liver (EASL) organised the EASL Congress 2023 held in Vienna from 21 to 24 June 2023.

EASL certifies that the abstract **FRI-414-YI** co-authored by Brisa Alarcón-Sánchez, Osiris German Idelfonso García, Verónica Rocío Vásquez-Garzón, Pablo Muriel, Julio Isael Pérez-Carreón, Saúl Villa-Treviño, Jaime Arellanes-Robledo entitled ***“Low doses of different hepatotoxins induce alcohol-related liver disease and drive hepatocellular carcinoma”*** was presented as poster by **Brisa Rodope Alarcón-Sánchez** on Friday 23 June 2023 in the poster area.

In addition, EASL certifies that **Brisa Rodope Alarcón-Sánchez** has been granted a Trainees and Postdocs bursary to attend the congress. The bursary included: congress waved registration fee and free EASL membership for one year.

On behalf of the scientific committee, we would like to thank you again for your important contribution to the EASL Congress 2023.

Céline Santo

Céline Santo
Scientific Programme Coordinator



Low doses of different hepatotoxins induce alcohol-related liver disease and drive hepatocellular carcinoma

B.R. Alarcón-Sánchez^{1,2}, V.R. Vásquez-García³, P. Murriel⁴, J.I. Pérez-Carreón³, S. Villa-Treviño¹, J. Arellanes-Robledo^{2,3}

¹Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute – CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico
²Laboratory of Liver Diseases, National Institute of Gastroenterology – INMEGEN, Mexico City, Mexico
³Laboratory of Fibrosis and Cancer, Faculty of Medicine and Surgery, Benito Juárez Autonomous University of Oaxaca – UABJO, Oaxaca, Mexico
⁴Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute – CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico
⁵Directorate of Catedras, National Council of Science and Technology – CONACYT, Mexico City, Mexico



Cinvestav



Instituto Nacional de Medicina Genómica
MEXICO

Introduction

Chronic alcohol abuse is one of the main causes of morbidity and mortality since promotes alcohol-related liver disease (ALD) worldwide. This condition may be attributed to multiple hits driving several liver alterations^{1,2}. Excessive ethanol intake promotes the production of reactive oxygen species (ROS) and increases both portal and systemic circulation of lipopolysaccharides (LPS), which exacerbate ROS and potentiate the liver damage³. Since hepatocellular carcinoma (HCC) may be the late ALD stage, the synergistic effect of ethanol and diethylstilbestrol (DES), a hepatic carcinogen, has been tested⁴; however, the combined effect of different hepatotoxins has been limited.

Aim

The aim of this work was to determine if the administration of ethanol dissolved in sucrose and low doses of LPS and DEN induces HCC, as an *in vivo* model of ALD induced by multiple hepatotoxins (MHT model), as occurs in humans.

Method

C57BL/6J female mice were administered with ethanol and low doses of LPS and DEN. Firstly, after an ethanol adaptation period, mice were allowed to drink *ad libitum* a mixture of 20% (w/v) sucrose containing 20% ethanol for 18 weeks as the only source of drinking fluid, and DEN and LPS were dissolved in PBS and intraperitoneally injected twice a week. While DEN was administered at 1 mg/kg body weight (BW) for 15 weeks during ethanol consumption, LPS was administered at 1 mg/kg BW alongside the period of time ethanol consumption. In addition, animals subjected to MHT model were divided into three groups: DEN plus LPS (DSC), DEN plus DEN (DSC+DEN), and low-dose LPS (DSC+LPS). While MHT groups were euthanized at 6, 9, 12, 15, 18 and 25 weeks, SC, DSC and NTC groups were euthanized at 18 and/or 25 weeks.

Conclusions

Considering that ALD progression naturally occurs as the result of combined effects of multiple hits, we provide evidence showing that the simultaneous administration of ethanol dissolved in sucrose, and low doses of LPS and DEN exacerbates ALD-associated alterations by producing progressive deleterious effects on the liver driving the HCC. Thus, here we introduce a promising multi-hit ALD model to better recapitulate ALD-associated pathogenesis and eventually, to identify therapeutic targets for the treatment of ALD stages.

Acknowledgements

B.R. Alarcón-Sánchez gives thanks to CONACYT-Mexico for awarding the master and doctoral fellowships No. 484737 and 752715, respectively. O.G. Iñárriz-García gives thanks to CONACYT-Mexico for awarding the doctoral fellowship No. 431419. J. Arellanes-Robledo expresses his sincere thanks to Catedras-CONACYT program. This work was funded by the CONACYT grant No. CF2019-53358 and the INMEGEN grant No. 0620171 to J. Arellanes-Robledo.

References

1. Saito H. K. *et al.* Alcohol liver disease. Nature reviews Disease primers 4, 16 (2018).
2. Bishoffert F. *et al.* Alcohol and Gut-Derived Inflammation. Alcohol research current reviews 38, 163-171 (2017).
3. Schaffert C. S. *et al.* Alcohol metabolism and lipopolysaccharide roles in the development and progression of alcoholic liver disease. World journal of gastroenterology 15, 1208-1218 (2009).
4. Fuentes-Hernández S. *et al.* Chronic administration of diethylstilbestrol to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. Toxicol Appl Pharmacol 378, 114611 (2019).

Contact information

E-mail: brisa.alarcon@cinvestav.mx; Tel.: +52-55-57-47-3600 (ext. 5510)

Results

Chronic ethanol, sucrose, DEN and LPS administration (MHT model) interferes with BW gain and induces liver structural disarrangement, collagen deposition and steatosis.

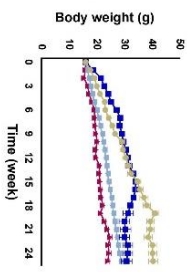


Figure 1. Effect of MHT model on mice body weight. Mice were weekly received 18 g of sucrose dissolved in 20 ml of water (20% w/v) and 20% ethanol (20% v/v) for 18 weeks. Body weight was measured weekly. * indicates significant difference from NTC group. $p < 0.05$.

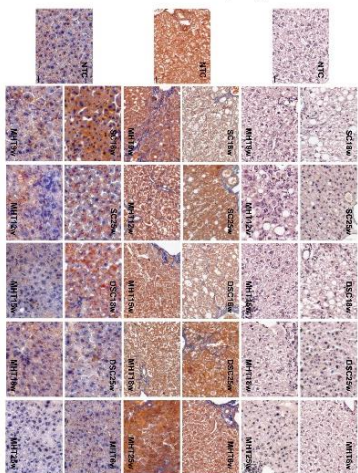


Figure 2. Histopathological alterations induced by MHT model. Image shows histopathological analysis from H&E. Mice were weekly received 18 g of sucrose dissolved in 20 ml of water (20% w/v) and 20% ethanol (20% v/v) for 18 weeks. * indicates significant difference from NTC group. $p < 0.05$.

MHT model increases proliferation, ethanol metabolism, LPS-inducible inflammation, and hepatocarcinogenesis markers

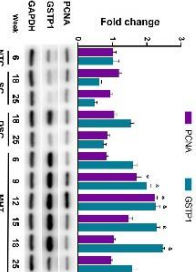


Figure 3. Proliferation and hepatocarcinogenesis markers. Liver tissue was analyzed by Western blot for PCNA, GSPT1, and GAPDH. * indicates significant difference from NTC group. $p < 0.05$.

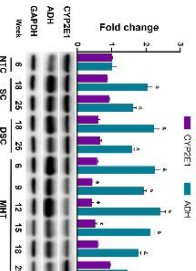


Figure 4. Ethanol metabolism markers. Liver tissue was analyzed by Western blot for CYP2E1, ADH, and GAPDH. * indicates significant difference from NTC group. $p < 0.05$.

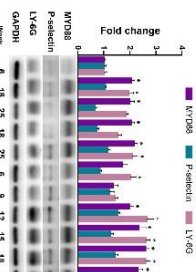


Figure 5. LPS-inducible inflammation markers. Liver tissue was analyzed by Western blot for p-ERK, p-Akt, and GAPDH. * indicates significant difference from NTC group. $p < 0.05$.



2023. Nucleoredoxin activity is altered by oxidative stress generated by chronic ethanol consumption and is associated with increased cellular senescence in the liver of aged mice

OG. Idelfonso García, BR. Alarcón-Sánchez, VR. Vásquez-Garzón, S. Villa-Treviño, Pablo Muriel, Héctor Serrano, JI. Pérez-Carreón, J. Arellanes-Robledo.

Aportación del trabajo en el congreso

Nuestros resultados demostraron que el modelo de EHA aumenta el estrés oxidante durante el envejecimiento. El nivel de la enzima NXN se redujo en el hígado de ratones envejecidos sometidos al modelo de EHA, pero lo más interesante es que la proporción de interacción de las proteínas reguladas por la NXN, como FLII, fue modificado de forma importante por el modelo de EHA. Esta evidencia sugirió que las ERO producidas por la EHA oxidan las proteínas y sensibilizan las células hepáticas y como resultado, se altera la regulación dependiente de la NXN, un fenómeno que acelera el establecimiento de la senescencia celular en el hígado de ratones envejecidos.

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Osiris Germán Idelfonso García

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

Nucleoredoxin activity is altered by oxidative stress generated by chronic alcohol consumption and is associated with increased cellular senescence in the liver of aged mice

Por:

Osiris Germán Idelfonso García, Brisa Rodope Alarcón-Sánchez, Verónica Rocío Vásquez-Garzón, Saúl Villa-Treviño, Pablo Murie, Héctor Serrano, Julio Isael Pérez-Carreón, Jaime Arellanes-Robledo

En la modalidad de cartel en el VIII Congreso de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina
26 - 29 de septiembre de 2023, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Atentamente

Por el Comité Organizador



Dra. Mina Königsberg Fainstein





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00154

Matrícula: 2191800078

Respuesta de las interacciones redox sensibles de la nucleorredoxina ante el estrés oxidante producido por la enfermedad hepática alcohólica durante el envejecimiento en el hígado del ratón.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE
DR. GERARDO BLANCAS FLORES
DR. JULIO ISABEL PEREZ CARREON

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: OSIRIS GERMAN IDELFONSO GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE

VOCAL

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

SECRETARIO

DR. JULIO ISABEL PEREZ CARREON