



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA SOBRECARGA DE COLESTEROL EN LA PANCREATITIS  
AGUDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL  
P R E S E N T A

Biol.Exp: GENARO JOSUÉ ROSALES MUÑOZ

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORA: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ  
ASESOR: DR. MARIO CÉSAR PELÁEZ LUNA  
ASESORA: DRA. MAYREL PALESTINO DOMÍNGUEZ

JURADO

PRESIDENTE: DR. JULIO CÉSAR ALMANZA PÉREZ  
SECRETARIA: DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ  
VOCAL: DR. BENJAMIN PÉREZ AGUILAR  
VOCAL: DR. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA

Ciudad de México

Agosto 2023

## Declaración de originalidad

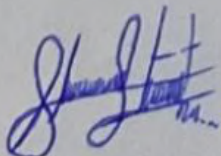
El que suscribe Genaro Josué Rosales Muñoz, alumno con numero de matrícula 2212801175, del Posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"Efecto de la sobrecarga de colesterol en la pancreatitis aguda"**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el Honorable Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 23 de Agosto del 2023.

Atentamente



Biol Exp Genaro Josué Rosales Muñoz

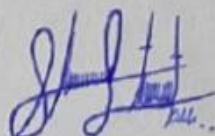
## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 23 de Agosto del 2023

Comisión Académica del Posgrado  
en Biología Experimental  
Presente

El que suscribe Genaro Josué Rosales Muñoz alumno con número de matrícula 2212801175, de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Efecto de la sobrecarga de colesterol en la pancreatitis aguda”** a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Biol Exp Genaro Josué Rosales Muñoz

**El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020**

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con un número de becario: 801664 y CVU: 1026410, en el periodo 2021-2023.

El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Medicina Experimental, de la Unidad de Medicina Traslacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/ Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la tesis titulada “Efecto de la sobrecarga de colesterol en la pancreatitis aguda”, que presenta Genaro Josué Rosales Muñoz con fecha de examen 14 de Septiembre del 2023.

### **MIEMBROS DEL JURADO**



Dr. Julio César Almanza Pérez

**PRESIDENTE**

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa

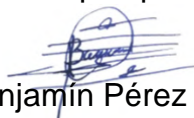


Dra. Leticia Bucio Ortiz

**SECRETARIA**

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa



Dr. Benjamín Pérez Aguilar

**VOCAL**

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa



Dr. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

**VOCAL**

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz  
Profesor Titular C, Tiempo Completo  
Área de Medicina Experimental y Traslacional  
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I  
Universidad Autónoma Metropolitana  
[mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

### ASESOR

Dr. Mario César Peláez Luna  
Departamento de Gastroenterología  
INCMNSZ  
[mariopl@prodigy.net.mx](mailto:mariopl@prodigy.net.mx)

### ASESORA

Dra. Mayrel Palestino Domínguez  
Laboratory of Molecular Biology  
CCR.NCI.NIH  
[mayrel.palestinodominguez@nih.gov](mailto:mayrel.palestinodominguez@nih.gov)

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
1.1. GENERALIDADES DEL PÁNCREAS.....	15
1.2. PANCREATITIS AGUDA .....	16
1.3. INFLAMACIÓN.....	17
1.4. EVENTOS MOLECULARES EN LA PA.....	18
1.5. EL COLESTEROL.....	20
1.6. NIVELES ELEVADOS DE LÍPIDOS, INCLUIDO EL COLESTEROL Y SU RELACIÓN CON LA PA.....	22
1.7. MODELO EXPERIMENTAL DE PANCREATITIS AGUDA .....	24
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>26</b>
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
6.3. ACTIVIDAD DE $\alpha$ -AMILASA.....	28
6.4. ACTIVIDAD DE LIPASA PANCREÁTICA .....	28
6.5. HISTOLOGÍA.....	29
6.6. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN TEJIDO .....	29
6.7. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN TEJIDO.....	30
6.8. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL SÉRICO .....	30
6.9. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS .....	30
6.10. INMUNOFLUORESCENCIA (IF) .....	30
TABLA 1.- ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE IF E IHC .....	31
6.11. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC).....	31
6.12. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA .....	32
6.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
7.1. LA DIETA HC INDUCE EL DEPÓSITO DE GRASA VISCERAL EN RATONES HC Y HC+CN PERO NO EN LA DIETA CHOW. ....	32
7.2. LA INGESTA ELEVADA DE COLESTEROL, PROMUEVE CAMBIOS HISTOLÓGICOS QUE PUEDEN RELACIONARSE CON PANCREATITIS AGUDA .....	34
7.3. LA DIETA HC Y LOS TRATAMIENTOS CON CN INDUCEN EL RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS DEL INFILTRADO INFLAMATORIO.....	35
7.4. LA INGESTA ELEVADA DE COLESTEROL, INCREMENTA LA ACTIVIDAD DE AMILASA Y LIPASA EN SUERO Y PROMUEVE DISRUPCIÓN DEL PARÉNQUIMA RELACIONADO CON LA PANCREATITIS AGUDA .....	37

<b>7.5. LA DIETA HC INDUCE EL DEPÓSITO DE GRASA EN EL PARÉNQUIMA PANCREÁTICO Y AUMENTA EL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS PANCREÁTICOS, MIENTRAS CN AUMENTA EL CONTENIDO DE COLESTEROL TOTAL.....</b>	<b>39</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>46</b>



## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz** por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y hacerme sentir cobijado en todo momento. Agradezco el apoyo, los consejos, la atención y el cariño que me brindo durante todo este tiempo. Así como ser mi guía en este camino llamado ciencia.

A la **Dra. Mayrel Palestino** y al **Dr. Mario Peláez** por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por todos los consejos, comentarios y aportes recibidos al trabajo.

Al **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz** por darme la oportunidad de trabajar con este fascinante proyecto, por educarme y apoyarme en el ámbito científico. Gracias por abrirme las puertas a su laboratorio.

Al **Dr. Benjamín**, la **Dra. Leti**, la **Dra. Vero** y la **Dra. Rox** por su aporte a este trabajo y por sus comentarios en los seminarios.

A mis compañeros y excompañeros del laboratorio a **Liss**, **Ale** y **Nat** por guiarme en el laboratorio, gracias por su amistad, comprensión y compañerismo ustedes también son parte muy importante de este trabajo. A **Pepe** quien fue mi primer maestro en el laboratorio, gracias por enseñarme y ayudarme en mi formación como científico.

A **Mari**, **Luis**, **Jessica**, **Irán**, **Melissa** y **Ulises** por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por todas las pláticas, las risas que compartimos, siempre hicieron más alegre los días de trabajo y las tardes de “capuchino”.

A **Jaqueline** por acompañarme y ayudarme en las noches de ensayos y experimentos de laboratorio. Gracias por siempre estar aun cuando yo no estaba, por animarme, por tu amistad, por escuchar, confiar y claro por las tardes de hamburguesas, papas y café.

## DEDICATORIAS

A mis padres **Minerva** e **Ismael** quienes son el pilar de todo lo que he logrado, por todo su sacrificio, por desvelarse esperando a que llegara a casa del laboratorio, por su apoyo, su confianza, su motivación y darme la oportunidad de seguir creciendo académica y profesionalmente. Gracias por tu cariño y comprensión mamá. Gracias por tu sacrificio y fuerza papá. Gracias a ambos por los valores que me inculcaron los cuales he empleado para continuar con mis estudios y lograr un objetivo más, por siempre tenerme paciencia. Este esfuerzo mío, es de ustedes y para ustedes. Infinitas gracias, los amo.

A mis hermanos **Eva Sara** y **Alejandro** por crecer conmigo, por acompañarme y no dejarme solo en este camino. Gracias por su apoyo incondicional y toda la confianza puesta en mí, por los sacrificios que tuvimos que hacer juntos durante toda nuestra educación. Espero sembrar en ustedes la semilla del éxito, la superación, el esfuerzo y la dedicación, además de la disciplina y la perseverancia que son necesarios para poder alcanzar cualquier meta que se propongan.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa** y al **Laboratorio de Fisiología Celular y Medicina Traslacional** del Área de Medicina Experimental y Traslacional, por ser los recintos donde yo pude hacer ciencia e investigación. Me siento muy orgulloso de haber podido trabajar en el laboratorio de la Dra. Conchita y el Dr. Quiroz.

*“A veces la ciencia es más arte que ciencia”*

## RESUMEN

El páncreas es un órgano que presenta una función mixta; una exocrina y una endocrina. Se denomina pancreatitis aguda a la inflamación del páncreas, en la cual, las enzimas producidas por dicho órgano se activan intracelularmente, provocando la digestión del propio tejido. El colesterol es un compuesto vital, esencial en la formación de la membrana celular, la producción de hormonas sexuales y la formación de sales biliares, entre otras funciones. Aunque cada lípido posee efectos específicos en células y tejidos, la acumulación de colesterol se considera dañino para el funcionamiento adecuado del organismo. A pesar de su relevancia, no existen estudios sobre el efecto que puede tener una dieta alta en colesterol en el inicio y progresión de la pancreatitis aguda. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la contribución del colesterol durante el desarrollo de la pancreatitis aguda en un modelo preclínico de pancreatitis inducida por ceruleína (Cn). Nuestros datos muestran que el tratamiento con una dieta alta en colesterol (HC) aumenta el contenido de grasa visceral en los animales, mientras que el tratamiento con ceruleína (Cn) y el cotratamiento (HC+Cn), incrementan el peso del páncreas. El análisis histológico realizado con tinción de H&E, muestra que la dieta HC y los tratamientos con Cn promueven la presencia de edema, daño celular y presencia de infiltrado inflamatorio, parámetros que se incrementan significativamente, sin embargo, solo la dieta HC causa el depósito de grasa en el parénquima. Por otro lado, nosotros encontramos por medio de análisis de IHC e IF, la presencia de células del infiltrado inflamatorio y una alteración en la distribución de la amilasa dentro del parénquima pancreático tanto en los grupos tratados con la dieta HC como en los tratados con Cn. El perfil bioquímico muestra sorpresivamente un incremento estadísticamente significativo en la actividad de la amilasa y la lipasa séricas en el grupo de dieta HC así como en todos los otros grupos de daño ( Cn, HC+Cn), respecto al control. El incremento en las enzimas pancreáticas en los animales HC, indica que el HC, sin necesidad de otra agresión está provocando pancreatitis aguda. En conclusión, este trabajo provee evidencia que indica que la dieta HC provoca un daño generalizado al páncreas en diferentes parámetros asociados con la pancreatitis aguda y que no es necesaria la inducción de la

pancreatitis con Cn ya que solo la ingesta de la dieta HC es suficiente para provocarla. Estos datos resultan de gran interés, debido a que una dieta alta en colesterol puede ser el agente inductor en el desarrollo de la pancreatitis aguda. Los datos obtenidos en el presente trabajo abren una nueva perspectiva a futuro, que sería la de evaluar el mecanismo molecular por el cual el colesterol induce la pancreatitis en el modelo murino utilizado.

## **ABSTRACT**

The pancreas is an organ that has a mixed function an exocrine and an endocrine one. Acute pancreatitis is the inflammation of the pancreas, in which the enzymes produced by the pancreas are activated intracellularly, causing the digestion of the tissue itself. Cholesterol is a vital compound, essential in the formation of the cell membrane, the production of sexual hormones, and the bile salts synthesis, among other functions. Although each lipid has physiological specific effects on cells and tissues, the accumulation of cholesterol has been considered harmful. Despite its relevance, there are no studies on the effect that a high-cholesterol diet could have on the onset and progression of acute pancreatitis. The present work aimed to determine the contribution of cholesterol during the development of acute pancreatitis in a preclinical model induced by cerulein (Cn). Our data show that high cholesterol (HC) diet increases visceral fat content in animals, while treatment with Cn and co-treatment (HC+Cn) increases pancreas weight. The histological analysis performed with H&E staining shows that HC diet and Cn treatments significantly increased the presence of edema, cell damage, and presence of inflammatory infiltrate. However, only HC diet group presents fat deposition in the pancreas parenchyma. On the other hand, we found through analysis of IHC and IF, an inflammatory infiltrate and an alteration in the distribution of amylase within the pancreatic parenchyma in all experimental groups.

The biochemical profile surprisingly shows a statistically significant increase in serum amylase and lipase activity in all groups (HC, Cn, HC + Cn), compared to the control. The increase in pancreatic enzymes in HC animals indicates that HC, without the need for other aggression, is able to induce pancreatitis. In conclusion, this work provides evidence indicating that the HC diet causes widespread damage to the pancreas in different parameters associated with acute pancreatitis. These data are of great interest because a high-cholesterol diet could be the inductor of acute pancreatitis. The data obtained in the present work open a new perspective for the future, which would be to

determine the molecular mechanism by which cholesterol induces pancreatitis in the murine model used.

## **1.-Introducción**

### **1.1. Generalidades del páncreas**

El páncreas es un órgano que pertenece al sistema digestivo, el cual anatómicamente se ubica en el retroperitoneo y está dividido en tres secciones: cabeza, cuerpo y cola, la cabeza del páncreas colinda con el duodeno y la cola con el bazo (Figura 1). El páncreas cumple con dos funciones, una exocrina y una endocrina, la función exocrina del páncreas, lleva a cabo la síntesis de enzimas digestivas, como la lipasa, amilasa y tripsina, las cuales son enzimas encargadas de la hidrólisis de lípidos, carbohidratos y proteínas, mientras que la función endocrina se encarga de producir hormonas como la insulina y el glucagón, las cuales ayudan a mantener la homeostasis de la glucosa sérica. (Takita et al., 2019).

El parénquima pancreático está formado por diferentes estructuras celulares entre las que destacan: los islotes de Langerhans, los ductos del páncreas y finalmente los acinos pancreáticos, estas estructuras se componen de células endocrinas, ductales y acinares, respectivamente (Beger, 2018) (Figura 1). La mayor parte del páncreas se compone por las células exocrinas, del 100% de tejido exocrino, el 80% corresponde a las células acinares, mientras que el 20% restante lo conforman las células ductales y células estelares pancreáticas. Solo el 2% del tejido pancreático total, corresponde al páncreas endocrino es decir a las células de los islotes de Langerhans (Leung, 2010)

Las células acinares son el tipo celular más abundante del parénquima pancreático y son las encargadas de llevar a cabo la función exocrina del páncreas, por lo tanto el mal funcionamiento de estas células, puede inducir una respuesta patológica conocida como pancreatitis aguda (PA), la cual se caracteriza por ser una enfermedad que puede ocasionar una falla multiorgánica grave y que requiere de hospitalización y cuidados intensivos (Alvarez et al., 2023).

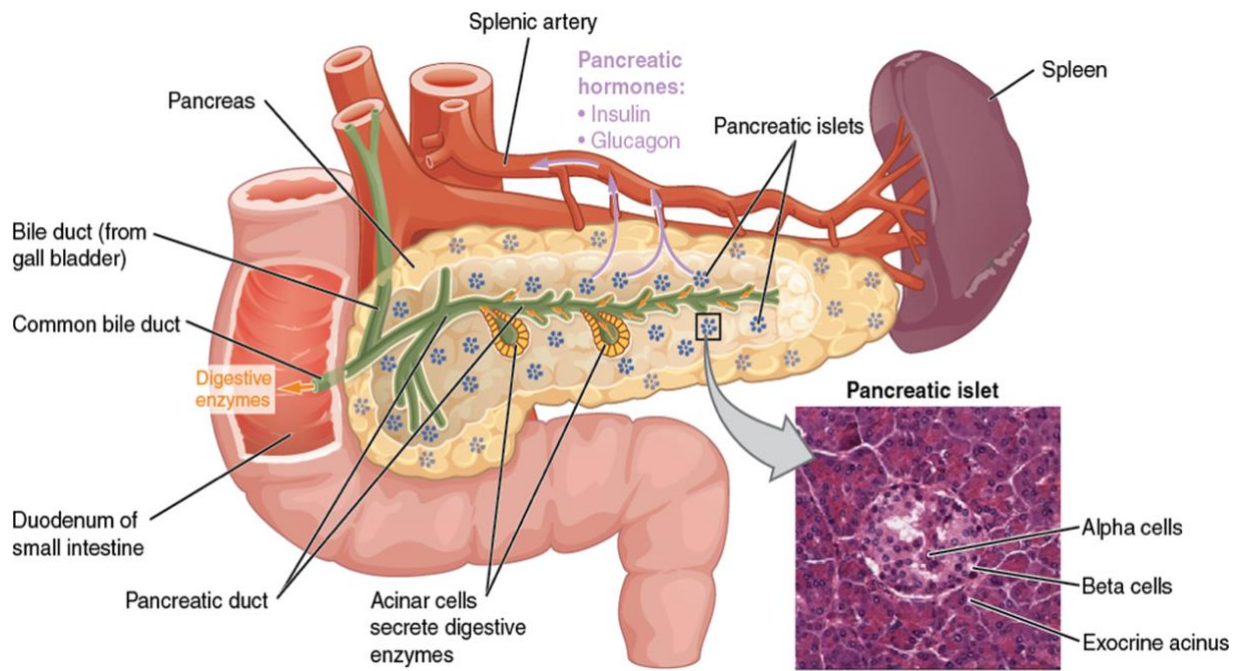


Figura 1.- **Anatomía del páncreas.** Tomada de <https://www.share4rare.org/es/library/pancreatic-rare-tumours/introduccion-al-pancreas>, Enero 2023

## 1.2. Pancreatitis aguda

Se denomina pancreatitis aguda a la inflamación del páncreas, en la cual las enzimas hidrolíticas se activan intracelularmente, provocando la digestión del propio tejido pancreático y es una de las enfermedades gastrointestinales que, con mayor frecuencia, requieren de atención hospitalaria (Ramanathan & Aadam, 2019). Se caracteriza por ser una enfermedad de carácter inflamatorio a nivel local y sistémico (Banks et al., 2013). El diagnóstico clínico de la PA, se basa en el análisis sérico de los niveles de amilasa y lipasa pancreáticas, apoyado de estudios de imagen, como ultrasonido y radiografías (Ahmed Ali et al., 2016). La etiología más común de la pancreatitis aguda es la obstrucción del conducto pancreático causada por cálculos biliares, también puede deberse al consumo de alcohol, así como a intervenciones quirúrgicas, como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE). Otros factores que pueden provocar pancreatitis aguda, aunque en menor proporción, son la hiperlipidemia, las infecciones virales, algunos fármacos, así como la hipercalcemia (Senosiain et al., 2013; Wang et al., 2009). Durante la agresión al páncreas se producen alteraciones moleculares en las vías de señalización y disfunción de los



organelos que inducen una falla en la función celular (Figura 2) (Ramanathan & Adam, 2019).

### **1.3. Inflamación**

Entre las características más importantes de la pancreatitis aguda están la inflamación, con reclutamiento de leucocitos. Los mediadores inflamatorios parecen jugar un papel crítico en la patogenia de la PA y determinar la gravedad de la enfermedad. En etapas tempranas de la PA, la lesión de las células acinares conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios, infiltración de células inmunitarias e inflamación (Watanabe et al., 2017). Los macrófagos y los neutrófilos, representan la mayoría de las células reclutadas durante la inflamación en la PA (Pastor et al., 2003; Pittman & Kubes, 2013; Watanabe et al., 2017) (Figura 2).

Los macrófagos son las principales células inmunes innatas reclutadas en la respuesta temprana de la en la patogénesis de la PA (Pastor et al., 2003; Sakai et al., 2003; Sandler et al., 2018). La detección de células positivas para F4/80 o células positivas para CD68 en el páncreas mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica es el método principal para detectar infiltrado de macrófagos en ratones (Vrolyk & Singh, 2020; J. Wu et al., 2019). Los neutrófilos son un tipo de células inmunes polimorfonucleares y representan el 60-70% de los leucocitos circulantes (Castanheira & Kubes, 2019; Pittman & Kubes, 2013). Los neutrófilos son reclutados en los sitios de inflamación, limpiando el parénquima de las células necróticas y promueven la reparación del tejido. Para los modelos murinos de PA, se considera que las células positivas para mieloperoxidasa (MPO) o las células positivas para la proteína G6d del complejo de antígeno de linfocitos (Ly6G), son indicadoras de infiltrado de neutrófilos y pueden detectarse mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o análisis sérico (Castanheira & Kubes, 2019; Gámez-Belmonte et al., 2018; Murthy et al., 2019). La activación descontrolada del sistema inmune, conduce a la inflamación sistémica asociada con la PA, lo que conlleva a una falla orgánica múltiple, agravando la

enfermedad y pudiendo causar la posible muerte del paciente (Dawra et al., 2011; Pastor et al., 2003; Watanabe et al., 2017).

Diversos reportes indican que una dieta alta en lípidos puede exacerbar notablemente la respuesta inflamatoria en la PA (Hong et al., 2020). Se ha reportado que los niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y colesterol provocan isquemia local en el tejido, la cual provoca un incremento de los niveles de lactato, causando acidosis celular, por lo que, la toxicidad de los ácidos grasos libres aumenta y esto constituye un evento clave para la activación prematura de tripsinógeno a tripsina (Scherer, Singh, Pitchumoni, & Yadav, 2014). La tripsina se activa prematuramente en las células acinares y activa otras hidrolasas digestivas de forma patológica, culminando finalmente en la "digestión" de las células acinares (Saluja et al., 2019) (Figura 2). Una dieta alta en lípidos puede exacerbar notablemente la respuesta inflamatoria en enfermedades de este tipo (Hong et al., 2020).

#### **1.4. Eventos moleculares en la PA**

Los principales eventos moleculares que ocurren en las células acinares durante la pancreatitis aguda incluyen la señalización sostenida del calcio intracelular (Murphy et al., 2008; Wen et al., 2015), disfunción mitocondrial (Biczko et al., 2018; Mukherjee et al., 2016), activación prematura del tripsinógeno (Dawra et al., 2011; Halangk et al., 2000; Saluja et al., 2019), estrés de retículo endoplásmico (RE), una deficiente respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés unfolded protein response) (Lugea et al., 2011, 2017; J. S. Wu et al., 2016) y una autofagia alterada (Biczko et al., 2018; Mareninova et al., 2020) (Figura 2). Sin embargo, no se conoce el efecto que puede tener una dieta alta en colesterol en los principales eventos moleculares que caracterizan a la pancreatitis aguda.

La respuesta inflamatoria también se incrementa en la PA, se encuentra una producción aumentada de citocinas inflamatorias, como la interleucina (IL)-1, IL-6, y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Esta producción de citocinas inflamatorias se

debe a la disrupción de los acinos pancreáticos, formados por células acinares, las cuales son las encargadas de producir los zimógenos de las enzimas digestivas. En presencia de daño al tejido pancreático, estas enzimas se activan de manera temprana en el interior de la célula acinar, causando la digestión del propio tejido y la producción de las citocinas inflamatorias (Bhatia et al., 2005).

Otro de los principales eventos de daño que ocurren en la pancreatitis aguda es el estrés de retículo endoplásmico, el cual es causado por el incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  es un ion cuya concentración está fuertemente regulada en las células pancreáticas (Wen et al., 2016). En estado de reposo, las células acinares presentan oscilaciones pequeñas en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones fisiológicas, la estimulación máxima de estas células por sustancias como la acetilcolina o la colecistocinina se asocia con aumento en la frecuencia de estas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin cambios significativos en su amplitud; este aumento de frecuencia desencadena activación de cinasas dependientes de calcio como la calmodulina, y que llevan a cabo procesos de exocitosis (Alvarez Aguilar & Dobles Ramírez, 2023). En contraste, las concentraciones elevadas de secretagogos se asocian con espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  de mayor amplitud, las cuales bloquean subsecuentes oscilaciones a nivel intracelular de calcio e inhiben la secreción de vesículas por distintos mecanismos (P. Singh & Garg, 2016).

Debido al aumento desregulado en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por factores tóxicos y estrés celular ocurre el estrés del retículo endoplásmico (Figura 2), lo cual conlleva a la activación de la UPR (Lugea et al., 2017; J. S. Wu et al., 2016). La UPR está regulada por la actividad de la enzima que requiere inositol 1 (IRE1), y por la proteína cinasa de retículo de tipo ARN (PERK), la activación persistente de PERK induce una regulación positiva de la proteína homóloga C / EBP (CHOP) que conlleva a eventos de muerte celular, lo cual puede agravar la pancreatitis aguda (Lugea et al., 2017).

Se ha observado que los niveles anormales de  $\text{Ca}^{2+}$  causan también disfunción mitocondrial, por la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Todo esto lleva a una secreción ductal y acinar anormal, activación intracelular de

zimógenos y la disfunción de organelos y necrosis (Bhatia et al., 2005; Maléth & Hegyi, 2016). Sin embargo, el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) en la pancreatitis ha demostrado tener un efecto protector al controlar el estrés oxidante y la respuesta inflamatoria al inducir la expresión de superóxido dismutasa y reducir el nivel de amilasa (Fu et al., 2020).

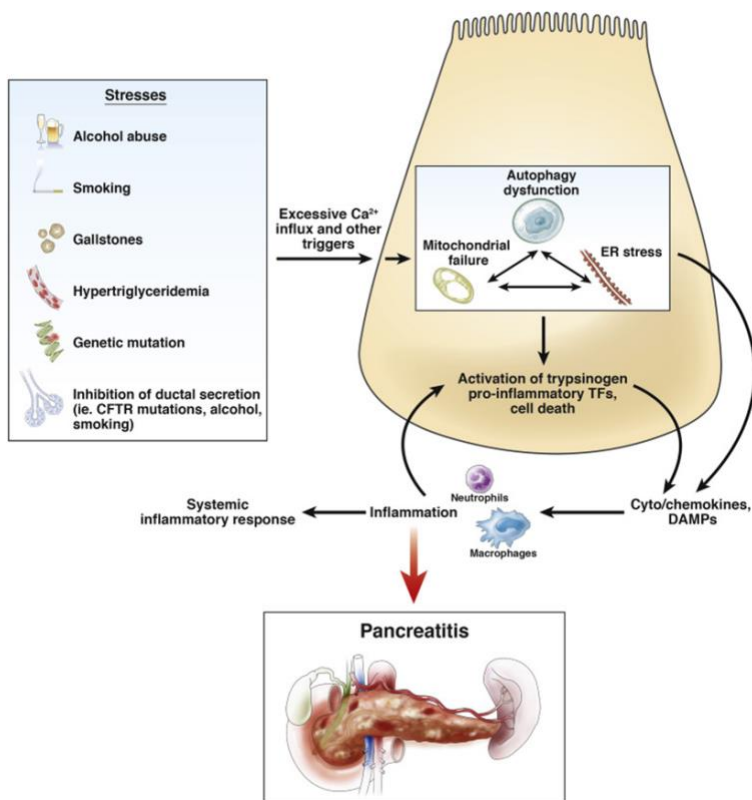


Figura 2.- **Etiologías y principales mecanismos moleculares en el desarrollo de la pancreatitis aguda.** Tomada de Saluja, et al., 2019.

### 1.5. El colesterol

El colesterol es un componente estructural vital de las membranas celulares que ayuda a mantener la fluidez adecuada en la membrana. Es precursor de la síntesis de las hormonas sexuales, corticosteroides, ácidos biliares y vitamina D (Cortes, 2014). Existen 2 fuentes para obtener el colesterol que el organismo requiere, una fuente exógena que proviene de la dieta, y una endógena cuyo principal órgano productor y regulador de su homeostasis es el hígado, aunque todas las células del organismo

tienen capacidad de sintetizarlo (Cofan Pujol, 2014). La homeostasis del colesterol se logra equilibrando la síntesis endógena, la absorción intestinal y la secreción de ácidos biliares y colesterol. Dado que los ácidos biliares son reabsorbidos eficientemente y una parte del colesterol biliar es reabsorbido en el intestino, el balance global del colesterol depende de las entradas, es decir por la síntesis y lo ingerido por la dieta (Luo et al., 2020). Brevemente, la síntesis de colesterol comienza a partir de acetil-CoA e involucra acciones concertadas de más de 20 enzimas, la mayoría de las cuales se localizan en la membrana del retículo endoplásmico liso (REL) (Black et al., 2005). El colesterol ingerido en la dieta es absorbido por la proteína Niemann-Pick tipo C1 (NPC1), en la superficie apical de los enterocitos en el intestino (Altmann et al., 2004), posteriormente el colesterol de la dieta es liberado al torrente en forma de quilomicrones, los cuales serán absorbidos por el hígado; El hígado es el sitio principal de la biosíntesis del colesterol y entrega tanto el colesterol sintetizado endógenamente como el colesterol adquirido exógenamente al torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales en el torrente, generan lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, que pueden ser captadas por las células periféricas a través de la endocitosis mediada por receptores (Goldstein et al., 2009).

Dentro de la célula, el colesterol se transporta dinámicamente entre varios organelos mediante mecanismos vesiculares y no vesiculares para cumplir sus funciones multifacéticas (Maxfield et al., 2010). El exceso de colesterol se puede exportar conjugado con la apolipoproteína A-I (apoA-I) producida por el hígado, el intestino y el páncreas a través de mecanismos pasivos o activos para generar lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Phillips et al., 2014). El exceso de colesterol es esterificado por la Acil coenzima A-colesterol aciltransferasa (ACAT) a ésteres de colesterol (Chang et al., 2009), que se almacenan como un reservorio de colesterol en gotas lipídicas en el citosol o se liberan como un constituyente principal de las lipoproteínas plasmáticas, incluidos los quilomicrones, VLDL, LDL y HDL antes mencionados.

Las HDL finalmente se transportan desde los tejidos periféricos de regreso al hígado y al intestino, donde el colesterol se recicla o elimina, así como a los órganos

esteroidogénicos, donde el colesterol se usa para generar hormonas esteroideas. Estos procesos están estrechamente gobernados por múltiples circuitos reguladores transcripcionales y postraduccionales que funcionan como un sistema integrador capaz de responder a diversas señales intracelulares y fisiológicas para garantizar la homeostasis del colesterol (Luo et al., 2020).

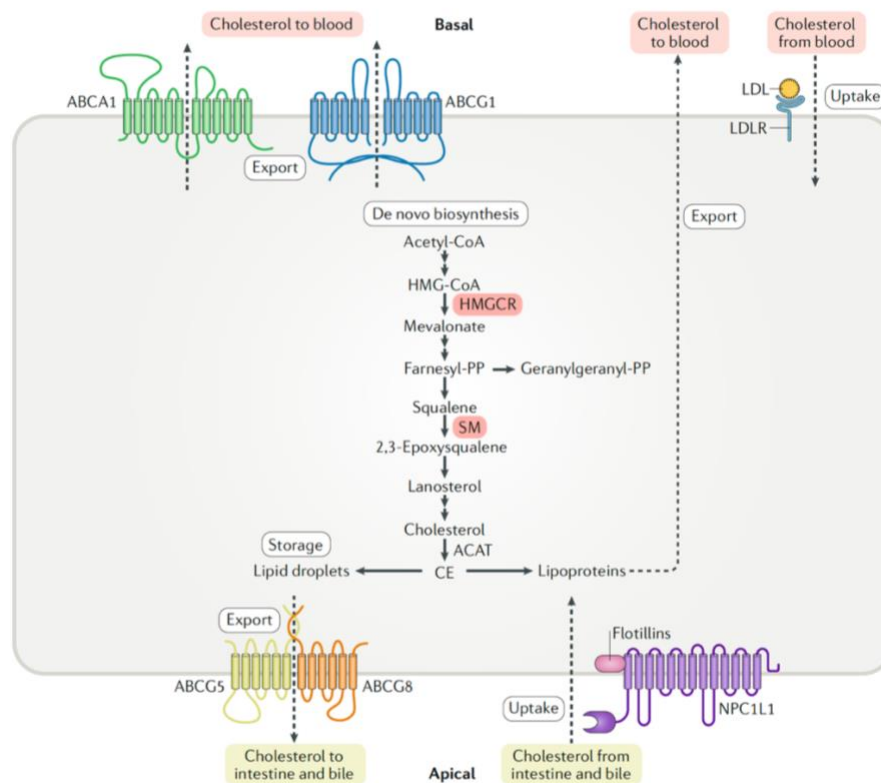


Figura 3.- **Principales vías del metabolismo del colesterol en la célula.** Tomada de Luo, et al., 2020.

## 1.6. Niveles elevados de lípidos, incluido el colesterol y su relación con la PA

Una dieta alta en lípidos, altera procesos metabólicos que resultan ser perjudiciales debido a un incremento del estrés oxidante inducido por el aumento de la producción de ROS a través de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y un incremento del estado inflamatorio, caracterizado por niveles más altos de citocinas proinflamatorias (Matsuzawa-Nagata et al., 2008). Los pacientes con PA reportan que experimentan dolor abdominal después de comer alimentos grasos, que a menudo pueden funcionar de manera sinérgica con otras etiologías de la PA como los cálculos biliares o el abuso de alcohol (Hong et al., 2020).

Los niveles elevados de colesterol plasmático generan una condición llamada hipercolesterolemia. Las principales implicaciones patológicas de la hipercolesterolemia en el páncreas provocan un deterioro funcional y muerte de las células  $\beta$  pancreáticas (Paul et al., 2016). El colesterol plasmático elevado se puede asociar con niveles elevados de lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL y VLDL), el contenido proteico y lipídico de las mismas es hidrolizado hasta formar aminoácidos, triglicéridos y colesterol no esterificado. El colesterol no esterificado es tóxico para las células por encima de una cierta concentración y, por tanto, debe ser convertido por la enzima ACAT, en ésteres de colesterol, de esta forma pueden ser guardados como reservorio celular de colesterol (Chang et al., 2006, 2009; Yang et al., 2020). El contenido elevado de triglicéridos plasmáticos se conoce como hipertrigliceridemia, la cual se considera como la tercera causa de desarrollar PA, se caracteriza por presentar niveles altos de triglicéridos en sangre y esta condición se asocia con una etiología de la PA en la población occidental (Senosiain et al., 2013). La presentación clínica es similar a la de la pancreatitis de otras etiologías, pero el curso de la PA hipertrigliceridémica parece ser más grave y más recurrente (Senosiain et al., 2013).

Se sabe que el colesterol se transporta en la circulación a través de lipoproteínas. Según su densidad, las lipoproteínas se clasifican en quilomicrones, VLDL, LDL, y HDL. Las VLDL son ricas en triglicéridos y son exocitadas por las células del tejido hepático y puestas en circulación (Yang et al., 2020). Recientemente, se ha reportado que el páncreas exocrino también expresa VLDLR (Human Protein Atlas [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org)). VLDLR es una proteína que pertenece a la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Nimpf, 2000). Para mediar la transducción, VLDLR debe ser fosforilado en residuos de serina por la proteína cinasa C (PKC).

Estos hallazgos sugieren que los miembros de la familia LDLR pueden participar en varias vías de transducción, incluida la adhesión celular y tráfico de vesículas (Bu et al., 2001). Estudios clínicos han demostrado que los niveles séricos elevados de LDL se asocian con la gravedad de la PA (Khan et al., 2013; Q. Wu et al., 2020). La pérdida

de la homeostasis del colesterol, debería ser particularmente perjudicial para la homeostasis y las funciones de las células acinares, ya que la maduración y secreción de los gránulos de zimógeno y la recuperación y el reciclaje de la membrana después de la exocitosis dependen de la renovación eficiente de los componentes lipídicos de las membranas (Mareninova et al., 2021).

Por lo tanto, la homeostasis del colesterol celular es de vital importancia para prevenir el desarrollo de enfermedades metabólicas como la PA, esta homeostasis celular de colesterol, puede estar regulada por los lisosomas, a través de la proteína Niemann-Pick C1 (NPC1) (Klionsky et al., 2014). Sin embargo, aún no hay estudios claros y suficientes que aborden los eventos en respuesta al daño en el páncreas exocrino.

### **1.7. Modelo experimental de pancreatitis aguda**

El páncreas es un órgano cuya posición anatómica, complica el acceso para el estudio de su función celular, la cual es de gran interés para estudios bioquímicos, fisiológicos, médicos y quirúrgicos. Los modelos experimentales sirven como una herramienta útil para el estudio de la pancreatitis y ayudan a comprender la enfermedad humana y las diferentes etiologías que pueden causarla.

Los modelos más usados para el estudio de la PA se basan en la administración de ceruleína (Cn), la cual es un péptido homólogo de la Colecistoquinina (CCK), que causa la activación del receptor de Colecistoquinina (CCKR) en las células acinares, incrementa la movilización intracelular de  $Ca^{2+}$  provocando hiperestimulación de la excreción de gránulos de zimógeno (GZ) y la consecuente acumulación intracelular de los GZ que pueden colocalizar membranalmente con los lisosomas y culminar en la activación del contenido hidrolítico de ambas estructuras celulares, esto provoca estrés oxidante, muerte celular, inflamación, edema, y la digestión del tejido pancreático (Bansod et al., 2021; Fu et al., 2020; Palestino-Dominguez et al., 2018; Xiong, Li, Zheng, & Liu, 2019). El modelo de Cn se utiliza para inducir pancreatitis aguda en roedores, es el más utilizado debido a su reproducibilidad, facilidad de inducción y que



es un modelo no invasivo (Lerch & Gorelick, 2013). Estos modelos a menudo suelen ir acompañados de otro tratamiento que asemeje las diferentes etologías de la PA, como alcohol, tabaco, ácidos biliares y lípidos. Dado que el modelo de Cn es el más utilizado en la inducción de la PA experimental y que asemeja al daño producido en el páncreas humano, además que en el grupo hay experiencia previa con él, en este trabajo se utilizó este modelo con el fin de estudiar la contribución del colesterol en la respuesta fisiológica y bioquímica en el modelo de pancreatitis inducida por Cn.

## **2. Justificación**

La incidencia global de la PA es de 34 individuos afectados por cada 100,000 y ha ido en aumento (Petrov & Yadav, 2019), y es uno de los trastornos gastrointestinales más comunes que causa hospitalización. Este padecimiento requiere de una atención especializada inmediata, ya que puede ser mortal para el paciente. En México se ha reportado que la PA presenta una tasa de mortalidad que va desde un 15 hasta un 30% de los casos (Arredondo et al., 2021). La PA es una enfermedad común que representa aproximadamente 2% del ingreso hospitalario en nuestro país, con una incidencia de 10 a 46 casos por cada 100,000 habitantes por año (Arredondo et al., 2021). Como consecuencia del cambio en los hábitos alimenticios, el consumo mundial de lípidos, incluido el colesterol, se ha incrementado de forma alarmante. Se ha reportado que la dieta también podría contribuir a la creciente incidencia mundial de pancreatitis (Khatua et al., 2017). Datos de la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) del 2021, reportan que en México, las dislipidemias más comunes en la población adulta fueron triglicéridos altos (47.2%) y colesterol alto (24.7%). Aun no se tienen reportes suficientes sobre la relación que puede haber entre el consumo elevado de colesterol y el desarrollo de la pancreatitis en humanos o modelos experimentales, por esta razón es necesario el estudio experimental de la pancreatitis en presencia de un ambiente con sobrecarga de colesterol, para evaluar su papel como posible cofactor o agente causante de daño pancreático.

### **3. Pregunta de investigación**

¿Cuál es la contribución del consumo elevado de colesterol en el desarrollo de la pancreatitis aguda?

### **4. Hipótesis**

La pancreatitis aguda es una enfermedad multifactorial de carácter inflamatorio, la cual puede agravarse en presencia de diferentes factores de riesgo, como es una dieta rica en colesterol, la cual promoverá un mayor daño pancreático tanto a nivel sistémico como local.

### **5. Objetivo General**

Determinar la contribución del colesterol en el desarrollo de la enfermedad pancreática, sobre los eventos involucrados con el daño y compromiso pancreático en un modelo preclínico de pancreatitis.

#### **5.1. Objetivos particulares**

- 1- Evaluar la relación entre el consumo elevado de colesterol con los cambios a nivel histológico y bioquímico en un modelo preclínico de pancreatitis.
- 2- Evaluar la relación entre del consumo elevado de colesterol sobre la inflamación en un modelo preclínico de pancreatitis

### **6. Materiales y Métodos**

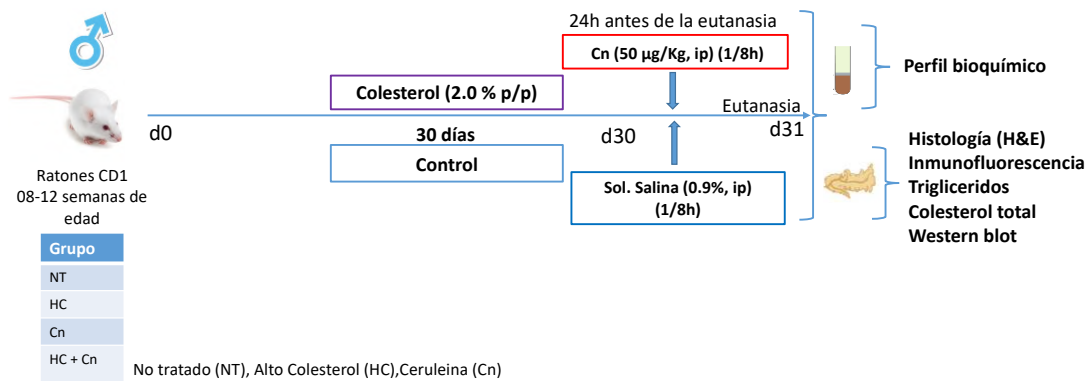
#### **6.1. Modelo Experimental**

Cuarenta y ocho ratones macho CD1 de 8-12 semanas de edad (UPEAL, UAM Xochimilco, Ciudad de México), se separaron en cuatro grupos de 12 ratones cada uno. El trabajo con los animales se realizó en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones

controladas, en un ambiente libre de patógenos, con temperatura controlada y ciclo de luz-oscuridad de 12 h y atendidos de acuerdo con los lineamientos éticos de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH) y bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Previo a los tratamientos experimentales, los ratones fueron alimentados con una dieta balanceada LABDIET RODENT 5001.

## **6.2. Diseño Experimental**

Los ratones fueron separados en 4 grupos y alimentados con diferentes dietas durante 30 días. El primer grupo, fue el de pancreatitis inducida por Cn, estos ratones se alimentaron con una dieta balanceada LABDIET RODENT 5001, la Cn se administró en la mañana del día 30 en 8 inyecciones en intervalos de una hora (50 µg/kg, ip). Los ratones del segundo grupo (HC+Cn), se alimentaron con una dieta LABDIET RODENT 5001 adicionada con colesterol (2 % p/p) y recibieron en la mañana del día 30 el mismo tratamiento con Cn (8 inyecciones en intervalos de una hora a una dosis de 50 µg/kg, ip). Los ratones del tercer grupo (HC) fueron alimentados con una dieta LABDIET RODENT 5001 adicionada con colesterol (2% p/p) y se les inyectó solución salina en el día 30 en intervalos de una hora, en un total de 8. Finalmente, el grupo control (NT) se alimentó con una dieta balanceada LABDIET RODENT 5001 y se les inyectó solución salina en el día 30 en intervalos de una hora, en un total de 8 (Figura 4). Todos los animales fueron pesados diariamente y antes de sacrificarlos. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la primera inyección de solución salina o bien Cn, bajo anestesia con avertina (0.4 mg/kg), como se reportó previamente (Palestino-Dominguez et al., 2018). La sangre se colectó de la vena cava superior con ayuda de puntas estériles y se colocó en viales de plástico sin heparina. La sangre se centrifugó durante 15 min a 2000 xg a 4°C. El suero se obtuvo cuidadosamente de la fase superior del tubo. El páncreas se removió y se colocó en buffer de fosfatos (PBS) frío. El órgano se depositó en viales de 1.5 mL los cuales fueron congelados a -80° C hasta el momento en que fueron utilizados, para las determinaciones bioquímicas y moleculares correspondientes.



**Figura 4.- Diseño experimental.** Ratones macho CD1 de 08-12 semanas de edad, fueron tratados con dieta alta en colesterol (2% p/p) o dieta control durante 30 días. En la mañana del día 30, recibieron ocho inyecciones en intervalos de una hora de Cn (50 µg/ kg, ip) para inducir la pancreatitis. El grupo NT y HC recibió 8 inyecciones de solución salina como vehículo. NT: dieta estándar de comida; HC, Dieta alta en colesterol; Cn, tratamiento con ceruleína; HC+Cn, dieta alta en colesterol más tratamiento con ceruleína.

### 6.3. Actividad de $\alpha$ -amilasa

Brevemente, se diluyó el suero 1:10 usando solución salina estéril fisiológica. La actividad de amilasa se realizó usando el ensayo para actividad de amilasa MAK009, (Sigma-Aldrich). La actividad de la amilasa se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.4. Actividad de lipasa pancreática

Se diluyó el suero 1:10 usando solución salina estéril fisiológica. La actividad de amilasa se realizó usando el ensayo para actividad de lipasa MAK047 kit II, (Sigma-Aldrich). La actividad de la lipasa se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **6.5. Histología**

Después de que los animales fueron sacrificados, se extirpó el páncreas, se dividió en diferentes fragmentos y se fijó en formalina neutra al 10% durante al menos 24 h. Las porciones pancreáticas se deshidrataron en alcohol a diferentes concentraciones. Posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 6 micras de espesor en micrótopo y se colocaron en portaobjetos silanizados. Las muestras se desparafinaron en calor y se pasaron por xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95% y se hidrataron para la tinción con hematoxilina. Se agregó hematoxilina de Harris durante 15 min y luego se lavaron con agua del grifo. Después, se eliminó el exceso de hematoxilina, y el contraste se mejoró mediante la adición de alcohol ácido. Los portaobjetos se lavaron con agua del grifo y se colocaron en agua amoniacal. Posteriormente, los cortes fueron teñidos con eosina durante 15 min. Los portaobjetos se lavaron con etanol al 95%, etanol absoluto y xileno. Finalmente, los portaobjetos se montaron en bálamo. Los cortes teñidos se visualizaron en un microscopio invertido AX10. La densitometría de las imágenes se midió utilizando el software Fiji: ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

## **6.6. Determinación de colesterol total en tejido**

La determinación de colesterol total en el tejido pancreático se llevó a cabo, con el protocolo de la técnica de O-ftaldehído (OPA). Se tomaron 0.03 g de páncreas de cada ratón, el cual se homogenizó en 1 mL de PBS con ayuda de un homogeneizador de tejido tipo Dounce en viales de 1.5 mL, posteriormente se agregaron al vial 20  $\mu$ L de KOH al 33% y 200  $\mu$ L de etanol al 95%, enseguida se calentaron las muestras en agua a 60 °C durante 15 min en una parrilla eléctrica. Después, se agregaron 666  $\mu$ L de hexano y 200  $\mu$ L de agua al vial. Se recolectó la capa orgánica, capa superior, que contiene al hexano y al colesterol; se secó con ayuda de un Speed-Vac durante 60 min. Se añadieron al vial 240  $\mu$ L de una solución de O-ftalaldehído disuelto en ácido acético (0.5 mg/mL) y 300  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado, se agitó en un vortex y el producto de la reacción se colocó en una placa de 96 pozos. Después, la muestra fue leída a una absorbancia de 550 nm por triplicado. Se determinó la cantidad de

colesterol con ayuda de una curva estándar. Finalmente, los datos se normalizaron por cantidad de proteína.

### **6.7. Determinación de triglicéridos en tejido**

Brevemente, se pesó 0,1 g de páncreas y se homogenizó con 1 ml de solución Nonidet P40 al 5 % en un bloque calefactor a 90 °C durante 5 min. A continuación, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 min antes de medir la concentración de triglicéridos utilizando el kit de cuantificación de triglicéridos MAK266, (Sigma-Aldrich). Los triglicéridos se determinaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.8. Determinación de colesterol sérico**

El suero se diluyó 1:10 con solución salina estéril fisiológica, previo a la determinación del colesterol sérico con la tira reactiva de colesterol total SPOTCHEM II, T-Cho-77162, (ARKRAY). El contenido de colesterol se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.9. Determinación de triglicéridos séricos**

Se diluyó el suero 1:10 con solución salina estéril fisiológica, antes de medir los triglicéridos séricos con la tira reactiva de triglicéridos SPOTCHEM II, TG-77163, (ARKRAY). Los triglicéridos se determinaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.10. Inmunofluorescencia (IF)**

El tejido se fijó en formalina neutra al 10 %, se conservó en Tissue Tek para las criosecciones y se cortó en secciones de 3 a 5 µm. Posteriormente, estos se lavaron con PBS-tween durante 5 min. Los anticuerpos específicos (Tabla 1) se diluyeron en PBS con suero de caballo al 0.1 % y se incubaron durante la noche a 4°C en una cámara húmeda. Los tejidos se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con DAPI

durante 5 min. Finalmente, los portaobjetos se examinaron utilizando un microscopio invertido AX10.

**Tabla 1.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de IF e IHC**

Anticuerpo	Fuente	Catálogo	Ensayo
F4/80	FITC Rat monoclonal	Ab60343 (Abcam)	IF
$\alpha$ -Amylase	Rabbit polyclonal	A8273 (Sigma-Aldrich)	IF
MPO	Monoclonal Mouse	GTX54393 (GeneTex)	IF
B7-2 (CD86)	Monoclonal Mouse	SC-19617 (Santa-Cruz)	IHC

### 6.11. Inmunohistoquímica (IHC)

Los cortes histológicos de los tejidos pasaron por un proceso de desparafinación como previamente se ha indicado pasándolos por un tren de xilol e isopropanol. Una vez hidratados se delimitaron los tejidos con plumón hidrofóbico Pad-pen y se sumergieron en un buffer de citratos para exposición de antígeno por 1h a baño María para dejar posteriormente dejar enfriar por 30 min. Los tejidos se permeabilizaron con 0.1% de Triton X-100 en PBS o TBS por 10 min y con PBS o TBS por 5 min. Para la desactivación de la peroxidasa endógena se trataron las muestras con peróxido de hidrogeno al 3% en metanol por 10 min y 3 con 1X PBS o TBS por 5min. Posteriormente, se incubaron las muestras por 1h en buffer de bloqueo preparado con suero de caballo al 2%, PBS 1X, 1% BSA, 0.01% Tritón-X diluido en agua destilada. Para la detección del anticuerpo-antígeno primero se dejó en incubación el anticuerpo primario (Tabla 1) durante toda la noche a 4°C, posterior al bloqueo. Al siguiente día se realizaron 3 lavados por 3 min con TBS-Tritón y se usó el kit: #ab64264 (Abcam, US), para detectar un anticuerpo primario, utilizando estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) y un anticuerpo secundario biotinilado contra el anticuerpo primario. Para contrastar la tinción se usó hematoxilina al 10% disuelta en etanol absoluto, incubando la muestra por 5 min y se hicieron lavados sumergiéndolas por tres ocasiones en agua destilada. Para fijar la muestra se pasó por el tren de

isopropanol y xilol y se usó medio de montaje (#06522 Sigma-Aldrich, Alemania). Posteriormente las muestras fueron observadas en campo claro en un microscopio invertido AX10.

## **6.12. Cuantificación de proteína**

Se determinó la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), (Pierce Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pozos para su realización. Se obtuvo una curva patrón utilizando albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 0-2000  $\mu\text{g/mL}$ . Para cada muestra de proteína se tomó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  y se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de agua mili-Q. Se tomó un volumen de 25  $\mu\text{L}$  por pozo, cada muestra se determinó por duplicado. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo BCA el cual contenía 50 partes del reactivo A y una parte del reactivo B. La placa se incubó por 30 min a 37°C y se leyó a 595 nm en un lector de placas (Clavijo-Cornejo et al., 2013; Gómez-Quiroz et al., 2008; Nuño-Lámbarri et al., 2016; Palestino-Dominguez et al., 2018)

## **6.13. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM. En todos los ensayos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), seguida por la prueba post hoc de Tukey utilizando el software Graph Pad Prism versión 8. La diferencia entre los diferentes grupos se consideró estadísticamente significativa cuando el valor de  $p$  era  $\leq 0.05$ .

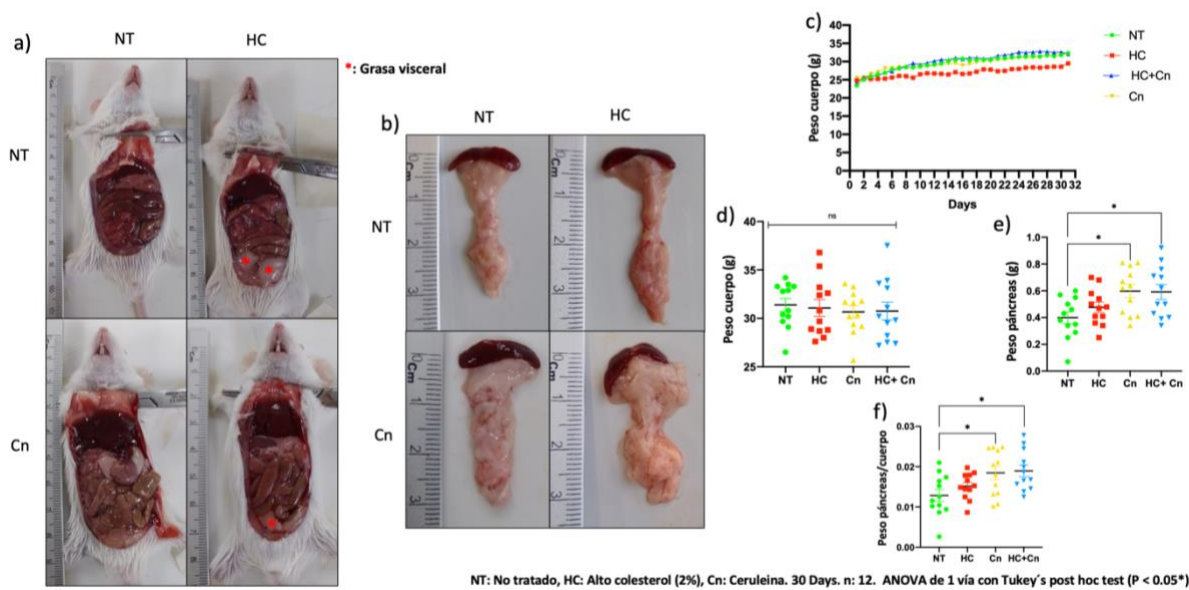
# **7. Resultados**

## **7.1. La dieta HC induce el depósito de grasa visceral en ratones HC y HC+Cn pero no en la dieta Chow.**

En los ratones, alimentados con la dieta HC durante treinta días (HC y HC+Cn) se observó el depósito de grasa visceral, en comparación con los animales alimentados con la dieta Chow (Figura 5a). La inspección macroscópica del páncreas no muestra cambios aparentes de los ratones alimentados con dieta HC, mientras que en los



ratones tratados con Cn se observan cambios asociados con edema pancreático, mostrando un aumento aparente en la masa del órgano, en comparación con los otros grupos (Figura 5b). El peso corporal diario y el peso al final del tratamiento no muestra cambios significativos entre los diferentes grupos (Figura 5c y d), sin embargo, el peso del páncreas incrementó en los tratamientos con Cn (Figura 5e), comprobando los hallazgos macroscópicos observados. El incremento en el peso del páncreas es resultado del tratamiento con Cn y no al tipo de dieta con que se trataron los ratones ya que la relación entre el peso del páncreas y el peso corporal únicamente presentó un aumento en los grupos Cn y HC+Cn frente al grupo NT y HC (Figura 5f).



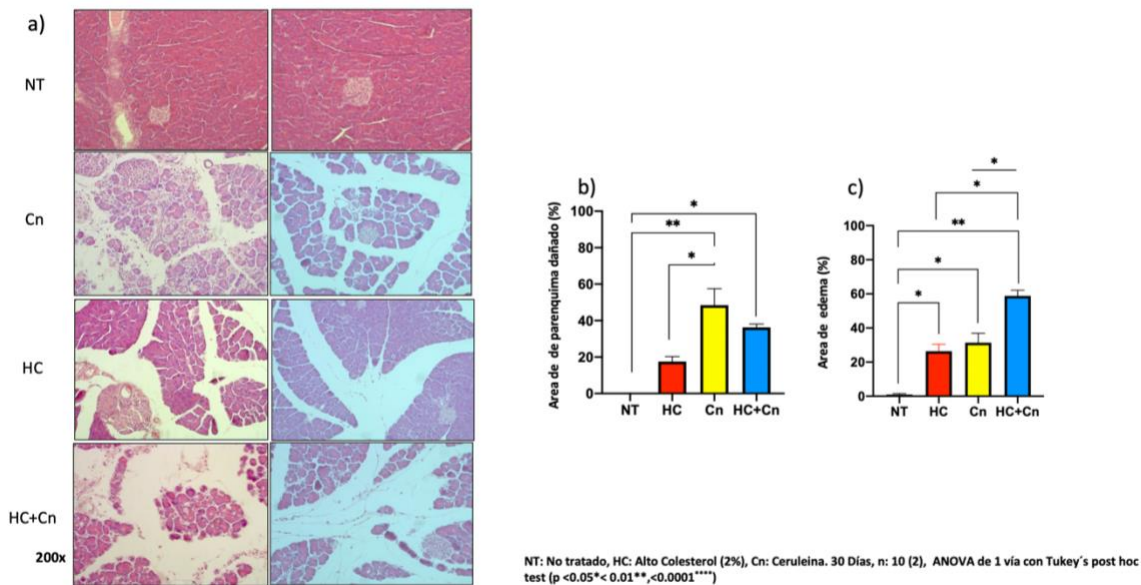
**Figura 5.- Cambios morfológicos y fisiológicos presentes en los tratamientos con Cn y dieta HC.**

a) Los ratones CD1 machos de 08-12 semanas con dieta HC únicamente presentaron incremento en el contenido de grasa visceral. Imágenes representativas ( $n=12$ ), b) Los páncreas de ratones machos de 8-12 semanas de edad que fueron tratados con Cn más dieta Chow y Cn más dieta HC, presentaron edema. Imágenes representativas ( $n=12$ ), c) Peso corporal diario, d) Peso corporal al final del tratamiento, e) Peso final del páncreas, f) Relación entre el peso del páncreas y el peso corporal. Cada gráfico muestra los puntos de datos individuales, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM.  $*p \leq 0,05$ .

## **7.2. La ingesta elevada de colesterol, promueve cambios histológicos que pueden relacionarse con pancreatitis aguda**

La presencia de daño a nivel tisular se determinó por medio de tinción de H&E, donde se observó la presencia de edema y disrupción del parénquima (Figura 6a) con todos los tratamientos. Los hallazgos histológicos encontrados en los páncreas de los animales tratados con la dieta HC, son muy interesantes, puesto que, el edema, el infiltrado inflamatorio y la disrupción del parénquima, son considerados característicos de la PA, documentado en la literatura tanto en estudios con diferentes modelos de PA y por estudios clínicos en pacientes con PA causada por diferentes etiologías. La presencia de daño histológico en los páncreas de los ratones alimentados con la dieta HC, revelan que el exceso en la ingesta de colesterol provoca daño tisular, lo cual es un indicativo de la presencia de PA.

Para evaluar cuantitativamente el daño observado a nivel tisular, se realizó la desitometría de la imagen usando el software Fiji: ImageJ (Figura 6b-c), el análisis cuantitativo mostró que en el cotratamiento (HC+Cn) y en la dieta HC, se incrementa el contenido del área de edema y de parénquima dañado, indicando que la PA puede agravarse en presencia de la ingesta alta de colesterol. Además nuestros datos muestran que con solo una dieta alta en colesterol, se presenta daño pancreático. Los datos obtenidos por H&E sugieren que el exceso de colesterol dietético, puede inducir disrupción del parénquima, edema y reclutamiento de infiltrado inflamatorio, los cuales son indicadores del daño pancreático. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de daño y compromiso pancreático a nivel tisular, causado por el consumo en exceso de colesterol.

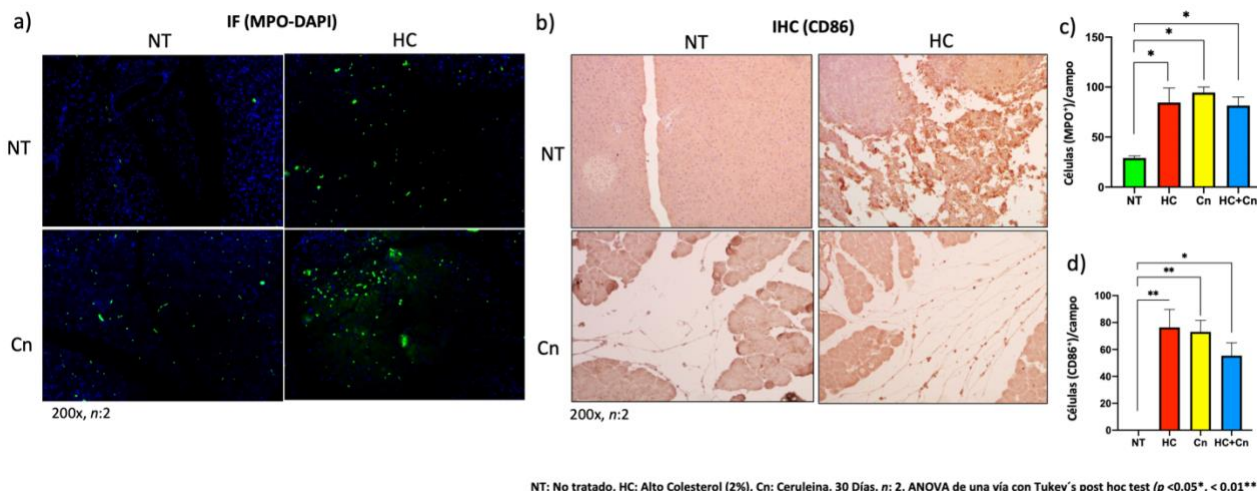


**Figura 6.- La dieta HC y el tratamiento con Cn inducen edema y disrupción del parénquima.** a) El análisis histológico muestra en los grupos HC, Cn y HC+Cn la presencia de edema tisular y disrupción del parénquima, b) Densitometría de la imagen. Imágenes representativas (n=2). Cada gráfico muestra el área promedio de los datos, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $< 0,001$ , \*\*\*\*  $< 0,0001$ .

### 7.3. La dieta HC y los tratamientos con Cn inducen el reclutamiento de células del infiltrado inflamatorio

Previamente encontramos por medio de tinción de H&E que la dieta HC causaba edema tisular y disrupción del parénquima (Figuras 6a-c). Se analizó por inmunofluorescencia (IF) el infiltrado inflamatorio de macrófagos y neutrófilos, mediante el uso de anticuerpos F4/80 y mieloperoxidasa (MPO) (Figura 7a y Figura 8a), estos tipos celulares del sistema inmune son los más abundantes en los procesos inflamatorios del páncreas (Pastor et al., 2003; Pittman & Kubes, 2013; Watanabe et al., 2017). Se observa que la dieta HC por si sola y en cotratamiento con Cn, puede inducir el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos (Figura 7a y figura 8a) en el parénquima dañado, lo cual se considera un evento característico de la PA. Se ha reportado que tanto F4/80 y MPO están presentes en la PA causada por diferentes etiologías, incluida la PA inducida por Cn, alcohol y lípidos (Apte et al., 2010; Feng et al., 2012; Heindl et al., 2014; Huang et al., 2022; Song et al., 2021; Y et al., 2017). La densitometría de las IF se realizó por medio del software Fiji: ImageJ, el análisis cuantitativo de la imagen, reveló que existe un aumento significativo en el contenido de células positivas a F4/80 y MPO en los tres grupos con tratamiento de daño (Cn, HC y HC+Cn) (Figuras 7b y Figura 8c) lo que nos indica que la dieta HC y la Cn

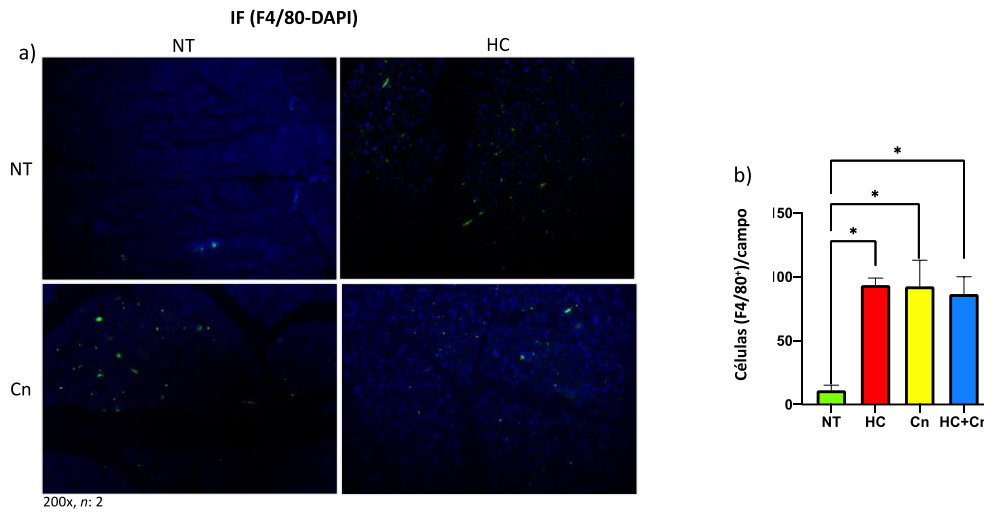
provocan el reclutamiento de células inflamatorias. No se observa diferencia entre los grupos tratados.



NT: No tratado, HC: Alto Colesterol (2%), Cn: Ceruleína. 30 Días. n: 2. ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test ( $p < 0.05^*$ ,  $< 0.01^{**}$ )

**Figura 7.- La dieta HC y el tratamiento con Cn inducen el reclutamiento de macrófagos.** a) La dieta HC y el tratamiento con Cn indujeron el reclutamiento de células F4/80 positivas. Imágenes representativas (n=2). b) Densitometría de las imágenes, los tratamientos de daño causan reclutamiento de células F4/80 positivas (n=2). Cada gráfico muestra el promedio por campo de los datos, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$

Para corroborar el hallazgo, analizamos por medio de inmunohistoquímica (IHC), el contenido de células positivas a CD86, el cual indica la presencia de células pro-inflamatorias o de fenotipo (M1) (Figura 8b) de igual manera, la obtención del análisis cuantitativo de la IHC se realizó por medio del software Fiji: ImageJ (Figura 8d). Los resultados muestran un incremento de células positivas a CD86 en los tres grupos con tratamientos, por lo tanto, podemos concluir que tanto la dieta HC como la Cn son inductores de daño pancreático y de inflamación acompañada por el reclutamiento de células del sistema inmune lo que asociamos con la presencia de PA, como lo indica la literatura (Saluja et al., 2019; P. Singh & Garg, 2016; G.-J. Wang et al., 2009). No se observa diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Con base a estos datos corroboramos que solo la dieta HC puede ser causante del desarrollo de pancreatitis sin necesidad de que exista algún otro factor de riesgo que comprometa al páncreas.



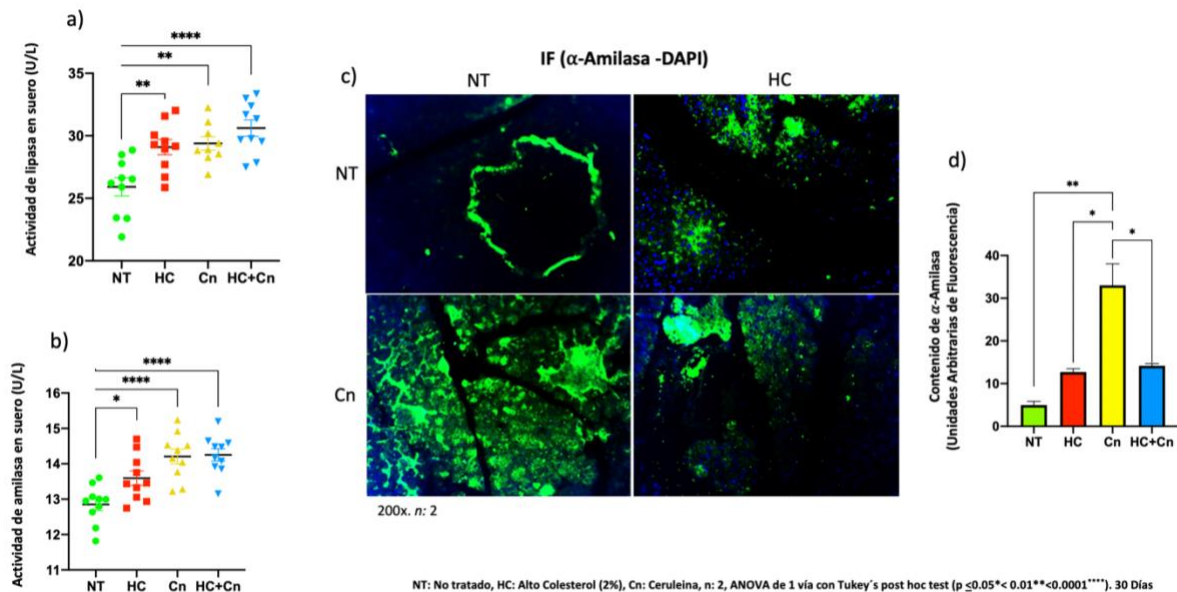
NT: No tratado, HC: Alto Colesterol (2%), Cn: Ceruleína. 30 Días. n: 2. ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test ( $p < 0.05^*$ )

**Figura 8.- La dieta HC y el tratamiento con Cn inducen el reclutamiento de neutrófilos y células pro-inflamatorias.** a) La dieta HC y el tratamiento con Cn incrementarán la presencia de células MPO positivas. b) La dieta HC y el tratamiento con Cn incrementarán la presencia de células CD86 positivas. Imágenes representativas ( $n=2$ ). c-d) Densitometría de las imágenes, los tratamientos de daño inducen reclutamiento de células MPO y CD86 positivas ( $n=2$ ). Cada gráfico muestra el promedio por campo de los datos, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $< 0,001$

#### 7.4. La ingesta elevada de colesterol, incrementa la actividad de amilasa y lipasa en suero y promueve disrupción del parénquima relacionado con la pancreatitis aguda

Para corroborar el daño pancreático causado por la dieta HC y los tratamientos con Cn se determinó en suero la actividad de amilasa y lipasa, las cuales son enzimas pancreáticas que se evalúan clínicamente a nivel sérico para corroborar la presencia de PA. Observamos que tanto la dieta HC y la Cn incrementaron la actividad de amilasa y lipasa séricas (Figura 9a y b) por lo tanto, comprobamos la presencia de daño y compromiso pancreático, asociado con PA en nuestro modelo experimental. Posteriormente corroboramos el daño tisular, por medio de IF, donde observamos el contenido y la disposición de la amilasa en el tejido pancreático. En condiciones normales, la amilasa se localiza de manera uniforme en la periferia de los acinos pancreáticos, es decir en la membrana basal de las células acinares (Figura 9c). Las imágenes obtenidas por IF mostraron que los tratamientos con Cn y con la dieta HC, inducen un desarreglo de la disposición de amilasa, relacionada con la pérdida de la

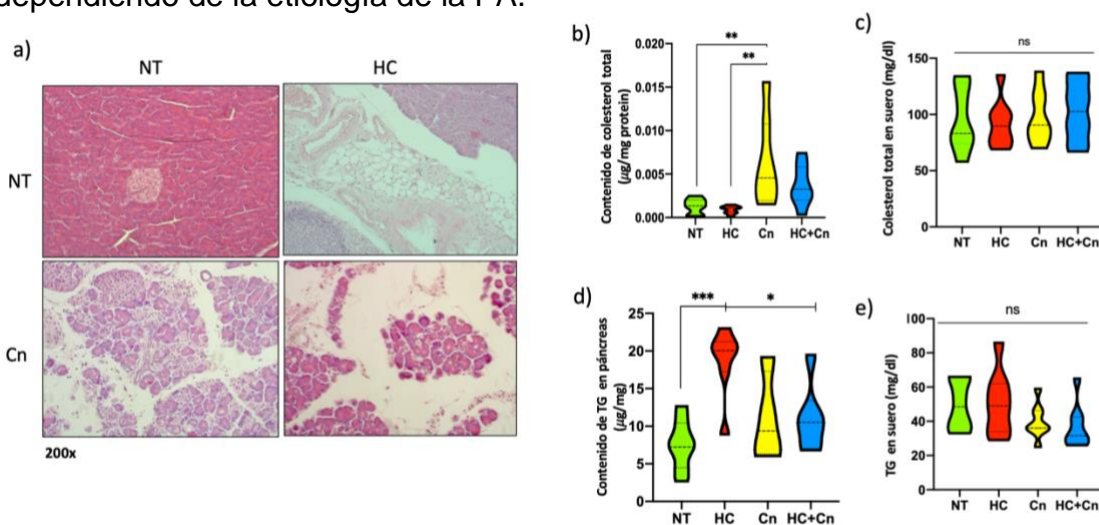
arquitectura del tejido (Figura 9c). El análisis cuantitativo se llevó a cabo por medio del software Fiji: ImageJ, los resultados muestran un incremento en el contenido de amilasa en todos los grupos tratados. Es de notar que el tratamiento de HC más Cn presenta una fluorescencia similar al tratamiento HC, es decir la dieta HC altera la distribución de la amilasa y ya no se encuentra un efecto aditivo con las inyecciones de Cn, muy probablemente por el desarreglo causado por el tratamiento por la dieta HC, (Figura 9d) es decir la disrupción del parénquima ocasionado por la dieta HC se acompaña del desarreglo de la disposición de amilasa. Con base a los datos, podemos decir que la dieta HC causa daño y compromiso pancreático a nivel tisular y bioquímico, pues eleva la actividad sérica de las enzimas pancreáticas y además induce el desarreglo del parénquima pancreático.



**Figura 9.- La dieta HC provoca la disrupción del parénquima y el desarreglo de la localización de la amilasa y promueve el incremento de la actividad de amilasa y lipasa séricas a-b) La dieta HC mostró una alta actividad de amilasa y lipasa en suero (n=12). c) Los tratamientos con Cn y dieta HC provocan la disrupción del parénquima acompañado del desarreglo de la amilasa. Imágenes representativas (n=2). d) Densitometría de la imagen. La Cn incrementa el contenido de amilasa en el tejido. Cada gráfico muestra el promedio del área, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM.  $p < 0,05^*$ ,  $< 0,001^{**}$ ,  $< 0,0001^{****}$**

### 7.5. La dieta HC induce el depósito de grasa en el parénquima pancreático y aumenta el contenido de triglicéridos pancreáticos, mientras Cn aumenta el contenido de colesterol total.

En el análisis histológico se observa en las muestras teñidas con H&E, que la dieta HC induce el depósito de grasa en el parénquima (Figura 10a). El depósito de grasa ectópica en el páncreas está implicado en la patogenia posterior a un evento de PA. Sin embargo, su relación con el páncreas exocrino permanece sin ser explorado a la fecha (R. G. Singh et al., 2019). Nuestro interés se centró en evaluar el tipo de lípido contenido en el tejido pancreático bajo las diferentes condiciones experimentales, por lo que se determinó colesterol total y triglicéridos tanto a nivel de tejido como en suero. El colesterol total en el tejido lo determinamos mediante el ensayo OPA ( $n=8$ ). Curiosamente, los datos muestran que el tratamiento con Cn incrementa el contenido de colesterol frente a los grupos NT y HC (Figura 10b) en el órgano. Sin embargo, el colesterol sérico no presentó cambios significativos (Figura 10c). La dieta HC provoca un incremento en el contenido de triglicéridos en tejido frente a los grupos NT, Cn y HC+Cn (Figura 10d). Los triglicéridos séricos no varían entre los grupos (Figura 10e). Nuestros datos sugieren que el contenido lipídico en el páncreas puede variar dependiendo de la etiología de la PA.



NT: No tratado, HC: Alto Colesterol (2%), Cn: Ceruleína. 30 Días. n: 8 . ANOVA de 1 vía con Tukey's post hoc test ( $p < 0.01$  \*\*), ns; no significativo  
 OPA: contenido de colesterol total .TG Kit MAK266 Sigma: contenido de triglicéridos (TG) en páncreas. [T-Chol]arkray: colesterol total en suero . [TG]arkray: TG total en suero

Figura 10.- La dieta HC provocó el depósito del contenido de grasa del parénquima y el tratamiento con Cn aumentó el contenido de colesterol total en el páncreas. a); La dieta HC mostró

*depósito de un contenido graso en el parénquima. Imágenes representativas (n=2). b); El tratamiento con Cn incrementó el contenido de colesterol total (n=8). c); El colesterol sérico total no cambia. d); La dieta HC aumentó el contenido de TG. e); El contenido de TG sérico no sufre cambios. Cada gráfico muestra los datos individuales, la línea horizontal superpuesta indica la media aritmética y la barra de error muestra  $\pm$  SEM.  $p < 0,05^*$ ,  $< 0,001^{**}$ ,  $< 0,0001^{****}$ .*

## **8. Discusión**

La pancreatitis aguda (PA), es una enfermedad difícil de diagnosticar y es también potencialmente letal (Boxhoorn et al., 2020). La pancreatitis se desarrolla debido a una disrupción y/o alteración de los ácinos pancreáticos, lo que permite la liberación y activación de las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa) en el propio páncreas (Dixit et al., 2016). Las enzimas pancreáticas activas causan la autodigestión del páncreas y esto conlleva al desarrollo de la pancreatitis aguda. Las proteasas activadas (tripsina y elastasa) y las lipasas degradan los tejidos y las membranas celulares, causando edema, daño vascular, hemorragia y necrosis, lo cual induce respuestas inflamatorias sistémicas graves, insuficiencia multiorgánica y muerte (Bhatia et al., 2005). Las causas más comunes de pancreatitis aguda se asocian con la obstrucción del ducto pancreático por la presencia de litos biliares (Pancreatitis aguda biliar) y el consumo elevado de alcohol (pancreatitis aguda alcohólica) (Valverde-López et al., 2022; G.-J. Wang et al., 2009). Sin embargo estudios recientes han demostrado que el consumo elevado de lípidos en la dieta (Hong et al., 2020; Jermendy, 2022; Lin et al., 2022) y la pérdida en la homeostasis del metabolismo del colesterol (Mareninova et al., 2021) pueden originar el desarrollo de la PA.

El colesterol se ha posicionado a lo largo del tiempo como un lípido de vital importancia, estructuralmente es esencial para el buen funcionamiento de las células. El colesterol, los metabolitos del colesterol y los precursores biosintéticos inmediatos del colesterol desempeñan funciones esenciales en la fisiología de las membranas celulares, la absorción de nutrientes de la dieta, la biología reproductiva, las respuestas al estrés, el equilibrio de sal y agua y el metabolismo del calcio (Tabas, 2002). Sin embargo el



colesterol en exceso, también puede jugar un rol patológico, se tienen reportes de que el colesterol libre y ciertas formas oxidadas de colesterol son particularmente tóxicos para las células, la exposición al exceso de colesterol libre y los oxisteroles probablemente son una causa importante de necrosis celular (Björkhem, 2002; Nuño-Lámbarrri et al., 2016; Tabas, 1997; Tall et al., 2002). Reportes sobre los efectos de la sobrecarga de colesterol sobre las células acinares pancreáticas, son escasos. Sin embargo nosotros hipotetizamos que una dieta alta en colesterol podría exacerbar los eventos patológicos relacionados a la PA, debido a que clínicamente se sabe que la PA puede desarrollarse por la presencia de dos agentes agresores del páncreas como alcohol y tabaco (Ramanathan & Aadam, 2019). En el presente trabajo nosotros utilizamos un modelo murino preclínico basado en la inducción de la pancreatitis aguda a través de la inyección de 8 dosis de ceruleína y el tratamiento previo durante 30 d con una dieta alta en colesterol (2%) *ad libitum*, con el objetivo de estudiar los efectos de la sobrecarga de colesterol en el páncreas en presencia y ausencia de algún otro agente causante del desarrollo de la pancreatitis aguda.

Anteriormente, otros grupos de investigación y nuestro grupo hemos reportado que el modelo de PA inducida con Cn provoca cambios morfológicos en el páncreas como la generación de edema, la disrupción del parénquima, infiltrado inflamatorio y a nivel bioquímico existe un incremento de la actividad de lipasa y amilasa séricas (Fu et al., 2020; Palestino-Dominguez et al., 2018; Romac et al., 2018; S. Wang et al., 2019) Asimismo se ha reportado, que el modelo de PA inducida por Cn, es el más adecuado para estudiar la PA en animales de experimentación. Con base a esto, nosotros utilizamos el modelo de PA inducida por Cn, como un control positivo de daño pancreático en nuestro diseño experimental (Figura 4) con la finalidad de comparar y caracterizar el tipo de daño que pudiera generar la ingesta elevada de colesterol en el páncreas. Nuestros resultados muestran que la dieta HC provoca un aumento en el depósito de grasa visceral en los animales, sin afectar el peso del animal durante el tratamiento (Figura 5a), además observamos un incremento en la actividad de amilasa y lipasa séricas, así como la presencia de edema, disrupción del parénquima y reclutamiento de células del infiltrado inflamatorio.

Observamos además que el peso del páncreas, se encontraba afectado por los tratamientos con Cn, pero no con la dieta HC, esto se relacionó con la inspección macroscópica del tejido, pues nosotros encontramos un aparente aumento de la masa del tejido, en los páncreas de ratones tratados con Cn como se muestra en la figura 5b, por este motivo, nosotros decidimos realizar el cociente de peso páncreas contra el peso corporal y obtuvimos una diferencia significativa presente en los tratamientos con Cn, lo que nos indica que el incremento del volumen del órgano se debe al edema que genera la Cn, sin embargo el tratamiento con la dieta HC no presenta ese cambio morfológico y tampoco existe diferencia significativa en el cociente peso páncreas/cuerpo, lo que nos indica que la dieta alta en colesterol, no es un inductor de edema a nivel macroscópico, pues no incrementa la masa y el peso del páncreas. Sin embargo, al llevar a cabo el análisis histológico mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), nosotros pudimos observar que la dieta HC, genera edema, por lo que consideramos que el consumo excesivo de colesterol, promueve un compromiso pancreático a nivel del parénquima. Las células acinares pancreáticas son el tipo celular predominante del páncreas y son principalmente las células mayormente comprometidas en la lesión inducida por hormonas peptídicas como la Colecistoquinina (CCK) (Murphy et al., 2008), los ácidos biliares (Voronina et al., 2005) y metabolitos de etanol (acetaldehído) (Huang et al., 2014).

En la literatura se ha reportado que la exposición del páncreas a agentes agresores, provocan cambios en el tejido pancreático, como la presencia de edema, infiltrado inflamatorio y la pérdida de la arquitectura del tejido por la muerte celular (Geokas, 1985; Halangk et al., 2000; Mareninova et al., 2020; Palestino-Dominguez et al., 2018). Nuestros resultados mostraron que tanto la dieta alta en colesterol, como los tratamientos con Cn, presentan cambios estructurales como infiltrado inflamatorio, edema y disrupción del parénquima pancreático, estos cambios se asocian con la fisiopatología de la pancreatitis aguda (Figuras 6a-c, 7a-d y 8a-d). Como se mencionó anteriormente, el modelo de PA inducida con ceruleína induce cambios a nivel bioquímico los cuales se ven reflejados por un incremento de la actividad de lipasa y

amilasa séricas (Fu et al., 2020; Palestino-Dominguez et al., 2018; Romac et al., 2018; S. Wang et al., 2019). Nuestros resultados muestran incremento en la actividad de amilasa y lipasa pancreáticas a nivel sérico, en todos los tratamientos de daño en comparación con el grupo NT tal como se muestra en las figuras 9a y b, lo cual sugiere que una dieta HC induce pancreatitis.

Las imágenes obtenidas por IF e IHC indican, como los tratamientos con Cn y la dieta HC inducen el reclutamiento de células del infiltrado inflamatorio (Figuras 7 y 8). Además se produce la disrupción del parénquima pancreático (Figuras 6 y 9). La alteración del tejido pancreático y el reclutamiento del infiltrado inflamatorio, son eventos que están bien caracterizados en la fisiopatología de la pancreatitis aguda (Apte et al., 2010; Beger, 2018; Bhatia et al., 2005; Geokas, 1985; Oruc & Whitcomb, 2004; Palestino-Dominguez et al., 2018; Saluja et al., 2019). Los resultados muestran el compromiso pancreático que la dieta HC genera, actuando como un agente agresor que promueve el inicio y desarrollo de la PA. Las densitometrías de las imágenes muestran claramente el efecto que se presenta en relación con el daño tisular por la IF de la  $\alpha$ -Amilasa y la presencia de células positivas a los marcadores del infiltrado inflamatorio.

Encontramos de manera interesante, que la dieta HC puede promover la deposición de gotas lipídicas en el parénquima, lo cual fue observado en la H&E (Figura 10a), y a su vez alterar el contenido lipídico sérico, por lo que se determinó cantidad de colesterol y triglicéridos en suero y a nivel tisular (Figura 10b-e), datos clínicos sugieren que los niveles alterados de triglicéridos y colesterol a nivel sérico pueden ocasionar pancreatitis (Huang et al., 2022; Jiang et al., 2022; Karanchi et al., 2022). Observamos que la Cn incrementa los niveles de colesterol en el páncreas, mientras que la dieta HC induce un incremento en los niveles de triglicéridos respecto a los otros grupos, lo cual nos indica que el tipo de contenido lipídico presente en la PA, puede variar dependiendo del tipo de etiología de la enfermedad. El contenido sérico de triglicéridos y colesterol no se altera en ninguno de los tratamientos (Figura 10c y e), esto puede deberse al tiempo de exposición a la dieta HC y al tratamiento con Cn, por lo cual

hipotetizamos que el tipo de contenido lipídico presente en el páncreas, puede variar dependiendo del tipo de agresión y además esto podría verse reflejado a nivel sistémico, cuando el consumo de una dieta alta en colesterol o la exposición de algún otro agente agresor sea constante. El consumo en exceso de colesterol contribuye al desarrollo de la inflamación, la cual provoca respuestas de fase aguda que conducen a cambios en el metabolismo de los lípidos, reduciendo los niveles de colesterol sérico (Khovidhunkit et al., 2004), lo cual puede explicar el comportamiento de nuestros datos, pues nosotros observamos, presencia de infiltrado inflamatorio y cambios no significativos en los niveles de colesterol sérico (Figuras 7,8 y Figura 10c).

Estos datos resultan de alto interés, debido a que demuestran que el consumo excesivo de colesterol en la dieta puede causar el desarrollo de pancreatitis aguda, lo cual refleja un impacto más del colesterol en la salud, puesto que se sabe que el colesterol en exceso también está involucrado en el desarrollo e iniciación de enfermedades cardiovasculares y hepáticas (Carson et al., 2020; Gutiérrez Ruiz et al., 2012; Horn et al., 2022; López-Islas et al., 2016; Nuño-Lámbarri et al., 2016; Soliman, 2018). Además nuestro grupo de investigación ha propuesto al colesterol como un agente promotor del carcinoma hepatocelular (HCC) (Domínguez-Pérez et al., 2019; Enríquez-Cortina et al., 2017; Simoni-Nieves et al., 2021). En el páncreas se ha reportado que la ingesta elevada de colesterol afecta principalmente a la función endocrina promoviendo la disfunción de las células  $\beta$  del páncreas y el desarrollo de diabetes (Hu et al., 2022; Kong et al., 2017; Kruit et al., 2010; Lu et al., 2011; Paul et al., 2016; Perego et al., 2019; Yu et al., 2021). Sin embargo, se tienen muy pocos reportes acerca de cómo el colesterol puede estar influyendo sobre la función exocrina del páncreas, es por esto, que nuestros resultados resultan interesantes, debido a que se demuestra que el exceso en la ingesta de colesterol compromete la función exocrina del páncreas, causando el inicio y desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, se propone una interacción entre el consumo elevado de colesterol y la PA, como factor de riesgo de la PA.

## 9. Conclusión

Nuestros resultados señalan que la dieta alta en colesterol (HC) induce pancreatitis, lo cual se puede observar por la presencia de edema, reclutamiento de infiltrado inflamatorio y la disrupción del parénquima. Así como también por el incremento de la actividad de lipasa y amilasa. Además se observó un incremento diferencial en relación al contenido lipídico, en cada uno de los tratamientos de daño, nosotros medimos el contenido de colesterol total y triglicéridos totales en el tejido, así como en suero, donde observamos que la pancreatitis inducida por Cn incrementa el contenido de colesterol total, mientras que la pancreatitis inducida por la dieta HC, incrementa el contenido de triglicéridos, por lo que nosotros hipotetizamos que el contenido de lípidos es diferente y varía de acuerdo a la etiología de la PA. Sin embargo, ambos lípidos no difieren en su contenido a nivel sérico, esto se puede deber al tiempo de exposición de los tratamientos a los animales. Finalmente, nuestros datos sugieren, que el exceso de colesterol dietético, puede ocasionar pancreatitis, sin la necesidad de coexistir con otro factor de riesgo, lo cual puede tener relevancia a nivel clínico, debido la clasificación de la PA de acuerdo a su etiología donde las principales son la PA asociada a el consumo excesivo de alcohol (Pancreatitis aguda alcohólica) y la PA asociada a la obstrucción del ducto pancreático a causa de litos biliares (Pancreatitis aguda biliar) (Szatmary et al., 2022), sin embargo se ha reportado que existe un tipo de PA clasificada como idiopática. Se entiende por PA idiopática (PAI) aquella en la que no se consigue determinar la etiología tras un estudio inicial de laboratorio y de imagen (Guda et al., 2018). Por lo tanto, los resultados del presente trabajo, podrían ayudar a determinar la etiología de la PAI, pues se ha demostrado que el consumo excesivo de colesterol promueve el daño y compromiso pancreático y clínicamente no se tienen reportes de una PA asociada al colesterol dietético elevado. Por lo tanto, se necesitan más estudios a nivel molecular y celular que corroboren nuestros datos y ayuden a determinar el daño causado por el consumo elevado de colesterol en la dieta, lo cual sigue siendo un problema de salud en México y a nivel mundial

## 10. Referencias

Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr, Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., & Graziano, M. P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5661), 1201–1204. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>.

Arredondo, G. P., & May, A. D. J. C. (2021). Prevalencia de pancreatitis aguda en un Hospital General. Análisis de Cinco años. *Salud Quintana Roo*, *14*(45), 18-23.

Ahmed Ali, U., Issa, Y., Hagens, J. C., Bakker, O. J., van Goor, H., Nieuwenhuijs, V. B., Bollen, T. L., van Ramshorst, B., Witteman, B. J., Brink, M. A., Schaapherder, A. F., Dejong, C. H., Spanier, B. W. M., Heisterkamp, J., van der Harst, E., van Eijck, C. H., Besselink, M. G., Gooszen, H. G., van Santvoort, H. C., & Boermeester, M. A. (2016). Risk of Recurrent Pancreatitis and Progression to Chronic Pancreatitis After a First Episode of Acute Pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *14*(5), 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.12.040>

Alvarez Aguilar, P. A., & Dobles Ramírez, C. T. (2023, febrero 13). Pancreatitis aguda: Fisiopatología y manejo inicial. *Acta Médica Costarricense*, *61*(1), 13-21.

Apte, M. V., Pirola, R. C., & Wilson, J. S. (2010). Mechanisms of alcoholic pancreatitis: Mechanisms of alcoholic pancreatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *25*(12), 1816-1826. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06445.x>

Banks, P. A., Bollen, T. L., Dervenis, C., Gooszen, H. G., Johnson, C. D., Sarr, M. G., Tsiotos, G. G., & Vege, S. S. (2013). Classification of acute pancreatitis—2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, *62*(1), 102-111. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302779>

Beger, H. G. (Ed.). (2018). *The pancreas: An integrated textbook of basic science, medicine, and surgery* (Third edition). John Wiley & Sons, Inc.

Bhatia, M., Wong, F. L., Cao, Y., Lau, H. Y., Huang, J., Puneet, P., & Chevali, L. (2005). Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*, 5(2-3), 132-144. <https://doi.org/10.1159/000085265>

Biczko, G., Vegh, E. T., Shalbueva, N., Mareninova, O. A., Elperin, J., Lotshaw, E., Gretler, S., Lugea, A., Malla, S. R., Dawson, D., Ruchala, P., Whitelegge, J., French, S. W., Wen, L., Husain, S. Z., Gorelick, F. S., Hegyi, P., Rakonczay, Z., Gukovsky, I., & Gukovskaya, A. S. (2018). Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models. *Gastroenterology*, 154(3), 689-703. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.012>

Björkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 725-730. <https://doi.org/10.1172/JCI0216388>

Boxhoorn, L., Voermans, R. P., Bouwense, S. A., Bruno, M. J., Verdonk, R. C., Boermeester, M. A., van Santvoort, H. C., & Besselink, M. G. (2020). Acute pancreatitis. *The Lancet*, 396(10252), 726-734. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31310-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31310-6)

Bu, G., Li, Y., & Cam, J. (2001). Low-Density Lipoprotein Receptor Family. *Molecular Neurobiology*, 23(1), 53-68. <https://doi.org/10.1385/MN:23:1:53>

Carson, J. A. S., Lichtenstein, A. H., Anderson, C. A. M., Appel, L. J., Kris-Etherton, P. M., Meyer, K. A., Petersen, K., Polonsky, T., Van Horn, L., & On behalf of the American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. (2020). Dietary Cholesterol and

Cardiovascular Risk: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 141(3).<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000743>

Castanheira, F. V. S., & Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 133(20), 2178-2185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>

Chang, T.-Y., Chang, C. C. Y., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 129-157. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656>

Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., López-Reyes, A., Domínguez-Pérez, M., Nuño, N., Domínguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V. M., Thorgeirsson, S. S., Gutiérrez-Ruiz, M. C., & Gómez-Quiroz, L. E. (2013). *Biochimie*, 95(6), 1177-1184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.005>

Cofan Pujol, M. (2014). Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 26(1), 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.10.008>

Dawra, R., Sah, R. P., Dudeja, V., Rishi, L., Talukdar, R., Garg, P., & Saluja, A. K. (2011). Intra-acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic Injury but Not Inflammation in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 141(6), 2210-2217.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.033>

Dixit, A., Dawra, R., Dudeja, V., & Saluja, A. (2016). *Role of trypsinogen activation in genesis of pancreatitis* [Data set]. The University of Michigan Library. <https://doi.org/10.3998/panc.2016.25>

Domínguez-Pérez, M., Simoni-Nieves, A., Rosales, P., Nuño-Lámbarri, N., Rosas-



Lemus, M., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., Uribe Carvajal, S., Marquardt, J. U., Seo, D., Gomez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2019). Cholesterol burden in the liver induces mitochondrial dynamic changes and resistance to apoptosis. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes.

Enríquez-Cortina, C., Bello-Monroy, O., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R. U., Toledo-Pérez, R., Luna-López, A., Simoni-Nieves, A., Hernández-Pando, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Calvisi, D. F., Marquardt, J. U., Bucio, L., & Gomez-Quiroz, L. E. (2017). Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, *8*(61), 104136-104148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22024>

Feng, D., Park, O., Radaeva, S., Wang, H., Yin, S., Kong, X., Zheng, M., Zakhari, S., Kolls, J. K., & Gao, B. (2012). Interleukin-22 Ameliorates Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice by Inhibiting the Autophagic Pathway. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(2), 249-257. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3967>

Fu, X., Li, P., Yin, W., Ma, L., Zhang, B., Zhen, L., Meng, Y., Han, L., & Wang, Y. (2020). Overexpression of Nrf2 Protects Against Lipopolysaccharide and Cerulein-Induced Pancreatitis In Vitro and In Vivo.

Gámez-Belmonte, R., Hernández-Chirlaque, C., Sánchez De Medina, F., & Martínez-Augustin, O. (2018). Experimental acute pancreatitis is enhanced in mice with tissue nonspecific alkaline phosphatase haploinsufficiency due to modulation of neutrophils and acinar cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(11), 3769-3779. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.009>

Geokas, M. C. (1985). Acute Pancreatitis. *Annals of Internal Medicine*, *103*(1), 86. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-1-86>

Gómez-Quiroz, L. E., Factor, V. M., Kaposi-Novak, P., Coulouarn, C., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Hepatocyte-specific c-Met Deletion Disrupts Redox Homeostasis and Sensitizes to Fas-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14581-14589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707733200>

Gutiérrez Ruiz, M. C., Domínguez Pérez, M., Rodríguez González, S., Nuño Lámbarri, N., Licona Retama, C., & Gómez-Quiroz, L. E. (2012). [High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]. *Gaceta Médica De Mexico*, 148(3), 236-242.

Halangk, W., Lerch, M. M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., & Deussing, J. (2000). Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 106(6), 773-781. <https://doi.org/10.1172/JCI9411>

Heindl, M., Tuennemann, J., Sommerer, I., Mössner, J., & Hoffmeister, A. (2014). Loss of bace1 in mice does not alter the severity of caerulein induced pancreatitis. *Pancreatology*, 14(3), S60. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.05.584>

Hong, Y., Yu, J., Su, Y., Mei, F., Li, M., Zhao, K., Zhao, L., Deng, W., Chen, C., & Wang, W. (2020). High-Fat Diet Aggravates Acute Pancreatitis via TLR4-Mediated Necroptosis and Inflammation in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/8172714>

Horn, C. L., Morales, A. L., Savard, C., Farrell, G. C., & Ioannou, G. N. (2022). Role of Cholesterol-Associated Steatohepatitis in the Development of NASH. *Hepatology Communications*, 6(1), 12-35. <https://doi.org/10.1002/hep4.1801>

Hu, X., Liu, Q., Guo, X., Wang, W., Yu, B., Liang, B., Zhou, Y., Dong, H., & Lin, J. (2022). The role of remnant cholesterol beyond low-density lipoprotein cholesterol in diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 21(1), 117.

<https://doi.org/10.1186/s12933-022-01554-0>

Huang, Y., Zhu, Y., Peng, Y., Xia, W., Chen, L., Yu, H., Shi, L., Yang, Y., & Su, N. (2022). Triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol (TG / HDL-C ) ratio is an independent predictor of the severity of hyperlipidaemic acute pancreatitis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, jhbp.1281. <https://doi.org/10.1002/jhbp.1281>

Jermendy, G. (2022). A nem alkoholos hasnyálmirigy-elzsírosodás klinikai jelentősége [Lipid accumulation in the pancreas: Clinical significance of NAFPD (non-alcoholic fatty pancreas disease)]. *Orvosi Hetilap*, 163(44), 1735-1742. <https://doi.org/10.1556/650.2022.32638>

Jiang, D., Wang, J., & Guo, S. (2022). Correlations of Triglyceride with Type, Severity and Clinical Prognosis of Acute Pancreatitis. *Clinical Laboratory*, 68(05/2022). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210727>

Karanchi, H., Muppidi, V., & Wyne, K. (2022). Hypertriglyceridemia. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459368/>

Khan, J., Nordback, I., & Sand, J. (2013). Serum Lipid Levels Are Associated with the Severity of Acute Pancreatitis. *Digestion*, 87(4), 223-228. <https://doi.org/10.1159/000348438>

Khatua, B., El-Kurdi, B., & Singh, V. P. (2017). Obesity and pancreatitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 33(5), 374-382. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000386>

Khovidhunkit, W., Kim, M.-S., Memon, R. A., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2004). Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism mechanisms and consequences to the host. *Journal of Lipid Research*,

45(7), 1169-1196. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300019-JLR200>

Klionsky, D. J., Eskelinen, E.-L., & Deretic, V. (2014). Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy*, 10(4), 549-551. <https://doi.org/10.4161/auto.28448>

Kong, F.-J., Wu, J.-H., Sun, S.-Y., & Zhou, J.-Q. (2017). The endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in cholesterol-induced pancreatic  $\beta$ -cell injury. *Scientific Reports*, 7(1), 44746. <https://doi.org/10.1038/srep44746>

Kruit, J. K., Kremer, P. H. C., Dai, L., Tang, R., Ruddle, P., de Haan, W., Brunham, L. R., Verchere, C. B., & Hayden, M. R. (2010). Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. *Diabetologia*, 53(6), 1110-1119. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1691-2>

Lerch, M. M., & Gorelick, F. S. (2013). Models of Acute and Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*, 144(6), 1180-1193. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.043>

Leung, P. S. (2010). Physiology of the Pancreas. En P. S. Leung, *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas* (Vol. 690, pp. 13-27). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9060-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9060-7_2)

Lin, T.-Y., Zhang, Y.-F., Wang, Y., Liu, Y., Xu, J., & Liu, Y.-L. (2022). NAFLD aggravates acute pancreatitis through bacterial translocation and cholesterol metabolic dysregulation in the liver and pancreas in mice. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, S1499387222001801. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2022.07.004>

López-Islas, A., Chagoya-Hazas, V., Pérez-Aguilar, B., Palestino-Domínguez, M., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., Gómez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez-Ruiz, M.-C. (2016). Cholesterol Enhances the Toxic Effect of Ethanol and Acetaldehyde in Primary

Mouse Hepatocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-9.  
<https://doi.org/10.1155/2016/9209825>

Lu, X., Liu, J., Hou, F., Liu, Z., Cao, X., Seo, H., & Gao, B. (2011). Cholesterol induces pancreatic  $\beta$  cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress and Chaperones*, 16(5), 539-548. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0265-7>

Lugea, A., Gerloff, A., Su, H.-Y., Xu, Z., Go, A., Hu, C., French, S. W., Wilson, J. S., Apte, M. V., Waldron, R. T., & Pandol, S. J. (2017). The Combination of Alcohol and Cigarette Smoke Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*, 153(6), 1674-1686.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.036>

Lugea, A., Tischler, D., Nguyen, J., Gong, J., Gukovsky, I., French, S. W., Gorelick, F. S., & Pandol, S. J. (2011). Adaptive Unfolded Protein Response Attenuates Alcohol-Induced Pancreatic Damage. *Gastroenterology*, 140(3), 987-997.e8.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.038>

Maléth, J., & Hegyi, P. (2016). Ca<sup>2+</sup> toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: Translational overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1700), 20150425. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0425>

Mareninova, O. A., Jia, W., Gretler, S. R., Holthaus, C. L., Thomas, D. D. H., Pimienta, M., Dillon, D. L., Gukovskaya, A. S., Gukovsky, I., & Groblewski, G. E. (2020). Transgenic expression of GFP-LC3 perturbs autophagy in exocrine pancreas and acute pancreatitis responses in mice. *Autophagy*, 16(11), 2084-2097.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1715047>

Mareninova, O. A., Vegh, E. T., Shalbueva, N., Wightman, C. J. M., Dillon, D. L., Malla, S., Xie, Y., Takahashi, T., Rakonczay, Z., French, S. W., Gaisano, H. Y., Gorelick, F. S., Pandol, S. J., Bensinger, S. J., Davidson, N. O., Dawson, D. W., Gukovsky, I., &

Gukovskaya, A. S. (2021). Dysregulation of mannose-6-phosphate–dependent cholesterol homeostasis in acinar cells mediates pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 131(15), e146870. <https://doi.org/10.1172/JCI146870>

Murphy, J. A., Criddle, D. N., Sherwood, M., Chvanov, M., Mukherjee, R., McLaughlin, E., Booth, D., Gerasimenko, J. V., Raraty, M. G. T., Ghaneh, P., Neoptolemos, J. P., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Green, G. M., Reeve, J. R., Petersen, O. H., & Sutton, R. (2008). Direct Activation of Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Signaling and Enzyme Secretion by Cholecystokinin in Human Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*, 135(2), 632-641. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.026>

Murthy, P., Singhi, A. D., Ross, M. A., Loughran, P., Paragomi, P., Papachristou, G. I., Whitcomb, D. C., Zureikat, A. H., Lotze, M. T., Zeh lii, H. J., & Boone, B. A. (2019). Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation in Acute Pancreatitis Contributes to Disease Severity and Is Reduced by Chloroquine. *Frontiers in Immunology*, 10, 28. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00028>

Nimpf, J. (2000). From cholesterol transport to signal transduction: Low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), 287-298. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00155-4)

Nuño-Lámbarri, N., Domínguez-Pérez, M., Baulies-Domenech, A., Monte, M. J., Marin, J. J. G., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., Montalvo-Jave, E. E., Concepción Gutiérrez-Ruiz, M., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C., & Gomez-Quiroz, L. E. (2016). Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/9895176>

Oruc, N., & Whitcomb, D. C. (2004). Theories, mechanisms, and models of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 33(4), 733-750.

<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2004.07.014>

Palestino-Dominguez, M., Pelaez-Luna, M., Lazzarini-Lechuga, R., Rodriguez-Ochoa, I., Souza, V., Miranda, R. U., Perez-Aguilar, B., Bucio, L., Marquardt, J. U., Gomez-Quiroz, L. E., & Gutierrez-Ruiz, M. C. (2018). Recombinant human hepatocyte growth factor provides protective effects in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9354-9364. <https://doi.org/10.1002/jcp.26444>

Pastor, C. M., Rubbia-Brandt, L., Hadengue, A., Jordan, M., Morel, P., & Frossard, J. L. (2003). Role of Macrophage Inflammatory Peptide-2 in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury. *Laboratory Investigation*, 83(4), 471-478. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000063928.91314.9F>

Paul, R., Choudhury, A., Choudhury, S., Mazumder, M. K., & Borah, A. (2016). Cholesterol in Pancreatic  $\beta$ -Cell Death and Dysfunction: Underlying Mechanisms and Pathological Implications. *Pancreas*, 45(3), 317-324. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000486>

Perego, C., Da Dalt, L., Pirillo, A., Galli, A., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2019). Cholesterol metabolism, pancreatic  $\beta$ -cell function and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(9), 2149-2156. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.012>

Petrov, M. S., & Yadav, D. (2019). Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(3), 175-184. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0087-5>

Pittman, K., & Kubes, P. (2013). Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment. *Journal of Innate Immunity*, 5(4), 315-323. <https://doi.org/10.1159/000347132>

Ramanathan, M., & Adam, A. A. (2019). Nutrition Management in Acute Pancreatitis. *Nutrition in Clinical Practice*, 34, S7-S12. <https://doi.org/10.1002/ncp.10386>

Romac, J. M.-J., Shahid, R. A., Swain, S. M., Vigna, S. R., & Liddle, R. A. (2018). Piezo1 is a mechanically activated ion channel and mediates pressure induced pancreatitis. *Nature Communications*, 9(1), 1715. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04194-9>

Sakai, Y., Masamune, A., Satoh, A., Nishihira, J., Yamagiwa, T., & Shimosegawa, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 124(3), 725-736. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50099>

Saluja, A., Dudeja, V., Dawra, R., & Sah, R. P. (2019). Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*, 156(7), 1979-1993. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.268>

Sendler, M., Weiss, F.-U., Golchert, J., Homuth, G., Van Den Brandt, C., Mahajan, U. M., Partecke, L.-I., Döring, P., Gukovsky, I., Gukovskaya, A. S., Wagh, P. R., Lerch, M. M., & Mayerle, J. (2018). Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*, 154(3), 704-718.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.018>

Senosiain Lalastra, C., Tavío Hernández, E., Moreira Vicente, V., Maroto Castellanos, M., García Sánchez, M. C., Aicart Ramos, M., Téllez Vivajos, L., & Cuño Roldán, J. L. (2013). Pancreatitis aguda por hipertrigliceridemia. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(4), 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.006>

Simoni-Nieves, A., Salas-Silva, S., Chávez-Rodríguez, L., Escobedo-Calvario, A., Desoteux, M., Bucio, L., Souza, V., Miranda-Labra, R. U., Muñoz-Espinosa, L. E.,



Coulouarn, C., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Marquardt, J. U., & Gomez-Quiroz, L. E. (2021). The Consumption of Cholesterol-Enriched Diets Conditions the Development of a Subtype of HCC with High Aggressiveness and Poor Prognosis. *Cancers*, 13(7), 1721. <https://doi.org/10.3390/cancers13071721>

Singh, P., & Garg, P. K. (2016). Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian Journal of Gastroenterology*, 35(3), 153-166. <https://doi.org/10.1007/s12664-016-0647-y>

Singh, R. G., Cervantes, A., Kim, J. U., Nguyen, N. N., DeSouza, S. V., Dokpuang, D., Lu, J., & Petrov, M. S. (2019). Intrapancreatic fat deposition and visceral fat volume are associated with the presence of diabetes after acute pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 316(6), G806-G815. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00385.2018>

Soliman, G. (2018). Dietary Cholesterol and the Lack of Evidence in Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 10(6), 780. <https://doi.org/10.3390/nu10060780>

Song, Y., Wang, Y., Qi, X., Kang, X., & Lu, X. (2021). Da-Huang-Fu-Zi-Tang Ameliorates Severe Acute Pancreatitis by Elevation of M2 Kupffer Cells in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2021/5561216>

Tabas, I. (1997). Free Cholesterol-Induced Cytotoxicity. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 7(7), 256-263. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(97\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(97)00086-8)

Tabas, I. (2002). Cholesterol in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 583-590. <https://doi.org/10.1172/JCI0216381>

Takita, M., Jimbo, E., Fukui, T., Aida, K., Shimada, A., Oikawa, Y., Yagihashi, S., Miura, J., Babazono, T., & Kobayashi, T. (2019). Unique Inflammatory Changes in Exocrine

and Endocrine Pancreas in Enterovirus-Induced Fulminant Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104(10), 4282-4294. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-02672>

Tall, A. R., Costet, P., & Wang, N. (2002). Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 899-904. <https://doi.org/10.1172/JCI0216391>

Valverde-López, F., Martínez-Cara, J. G., & Redondo-Cerezo, E. (2022). Pancreatitis aguda. *Medicina Clínica*, 158(11), 556-563. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2021.12.012>

Vrolyk, V., & Singh, B. (2020). Animal models to study the role of pulmonary intravascular macrophages in spontaneous and induced acute pancreatitis. *Cell and Tissue Research*, 380(2), 207-222. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03211-y>

Wang, G.-J., Gao, C.-F., Wei, D., Wang, C., & Ding, S.-Q. (2009). Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 15(12), 1427. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1427>

Wang, S., Ni, H.-M., Chao, X., Wang, H., Bridges, B., Kumer, S., Schmitt, T., Mareninova, O., Gukovskaya, A., De Lisle, R. C., Ballabio, A., Pacher, P., & Ding, W.-X. (2019). Impaired TFEB-mediated lysosomal biogenesis promotes the development of pancreatitis in mice and is associated with human pancreatitis. *Autophagy*, 15(11), 1954-1969. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596486>

Watanabe, T., Kudo, M., & Strober, W. (2017). Immunopathogenesis of pancreatitis. *Mucosal Immunology*, 10(2), 283-298. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.101>

Wen, L., Mukherjee, R., Huang, W., & Sutton, R. (2016). *Calcium signaling, mitochondria and acute pancreatitis: Avenues for therapy*. The University of Michigan

Library. <https://doi.org/10.3998/panc.2016.15>

Wen, L., Voronina, S., Javed, M. A., Awais, M., Szatmary, P., Latawiec, D., Chvanov, M., Collier, D., Huang, W., Barrett, J., Begg, M., Stauderman, K., Roos, J., Grigoryev, S., Ramos, S., Rogers, E., Whitten, J., Velicelebi, G., Dunn, M., ... Sutton, R. (2015). Inhibitors of ORAI1 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. *Gastroenterology*, *149*(2), 481-492.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.015>

Wu, J., Ma, X., Chen, W., Yang, N., Gao, L., Mao, W., Yang, J., Yang, Q., Dong, J., Tong, Z., Li, B., Lu, G., & Li, W. (2019). Protective effects of HTD4010, a Reg3 $\alpha$ /PAP-derived peptide, in mouse model of acute pancreatitis via toll-like receptor 4 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *512*(4), 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.107>

Wu, J. S., Li, W. M., Chen, Y. N., Zhao, Q., & Chen, Q. F. (2016). Endoplasmic reticulum stress is activated in acute pancreatitis: ERS and AP. *Journal of Digestive Diseases*, *17*(5), 295-303. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12347>

Wu, Q., Zhong, X., Fu, M., Yang, H., Bo, H., Liao, X., Hu, Z., Wang, B., Zhang, Z., Jin, X., & Kang, Y. (2020). High-density lipoprotein cholesterol to low-density lipoprotein cholesterol ratio in early assessment of disease severity and outcome in patients with acute pancreatitis admitted to the ICU. *BMC Gastroenterology*, *20*(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01315-x>

Y, F., K, T., N, K., S, H., N, Y., A, M., M, T., H, N., T, T., & Yt, A. (2017). Exacerbated experimental pancreatitis in interleukin-19 knockout mice. *Global Drugs and Therapeutics*, *2*(5). <https://doi.org/10.15761/GDT.1000S1005>

Yang, H., Zhang, M., Long, S., Tuo, Q., Tian, Y., Chen, J., Zhang, C., & Liao, D. (2020). Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clinica Chimica Acta*, *500*, 81-

86. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.022>

Yu, D., Wang, Z., Zhang, X., Qu, B., Cai, Y., Ma, S., Zhao, Z., & Simmons, D. (2021). Remnant Cholesterol and Cardiovascular Mortality in Patients With Type 2 Diabetes and Incident Diabetic Nephropathy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, dgab533. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab533>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00252

Matricula: 2212801175

Efecto de la sobrecarga de colesterol en la pancreatitis aguda.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 14 del mes de septiembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ  
DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR  
DR. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA  
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GENARO JOSUE ROSALES MUÑOZ

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

*Aprobar.*

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



GENARO JOSUE ROSALES MUÑOZ  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

VOCAL

DR. ROBERTO CARLOS LAZZARINI  
LECHUGA

SECRETARIA

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ