



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO CAUSADO A NIVEL HEPÁTICO POR LA
INGESTA CRÓNICA DE ALCOHOL, EN UN AMBIENTE CON SOBRECARGA DE
COLESTEROL”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA
B.E. JOSÉ MANUEL ALONSO MORA

COMITÉ DE TUTORES:
DIRECTORA: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ
DIRECTOR: DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE
ASESORA: DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

MIEMBROS DEL JURADO
PRESIDENTE: DRA. LETICIA BUCIO ORTÍZ
SECRETARIO: DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO
VOCAL: DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIÉRREZ REYES
VOCAL: MARÍA DEL REFUGIO DENISE CLAVIJO CORNEJO

Iztapalapa, Ciudad de México, Marzo 2021

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe José Manuel Alonso Mora, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"Caracterización del efecto causado a nivel hepático por la ingesta crónica de alcohol, en un ambiente con sobrecarga de colesterol"**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el honorable jurado para lo obtención del grado de Maestro 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 Marzo del 2021.

Atentamente



José Manuel Alonso Mora

Nombre y firma del alumno

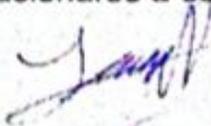
CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 25 de Marzo de 2021

Comisión Académica del Posgrado
En Biología Experimental
Presente

El(La) que suscribe José Manuel Alonso Mora alumno con número de matrícula 2183801605, 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 **Caracterización del efecto causado a nivel hepático por la Ingesta crónica de alcohol, en un ambiente con sobrecarga de colesterol** 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. Así mismo reconozco que toda información o dato obtenido dentro del proyecto que desarrolle pertenece a la Universidad Autónoma Metropolitana.

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.


José Manuel Alonso Mora

Nombre completo y firma

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/CVU 889351, en el periodo 2018-2020.

Al final el periodo de la beca otorgada por el CONACYT, recibí un apoyo económico por la rectoría general de UAM, como parte de los apoyos extraordinarios para estudiantes de posgrado de la misma institución.

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 “Caracterización del efecto causado a nivel hepático por la ingesta crónica de alcohol, en un ambiente son sobrecarga de colesterol”, que presenta José Manuel Alonso Mora con fecha de examen el día 25 de marzo del 2021.

MIEMBROS DEL JURADO



PRESIDENTE

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



SECRETARIO

Dr. Jaime Arellanes Robledo

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas
Instituto Nacional de Medicina Genómica



Vocal

Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

Jefa del Laboratorio HIPAM
Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal

Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo

División de Enfermedades Musculoesqueléticas y
Reumática. INR

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular y Medicina Traslacional
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana
mcgr@xanum.uam.mx

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Pablo Muriel de la Torre
Investigador CINVESTAV 3E
Departamento de Farmacología
CINVESTAV-IPN
pmuriel@cinvestav.mx

ASESORA:

Dra. Leticia Bucio Ortíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Medicina y Carcinogénesis Experimental
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
Universidad Autónoma Metropolitana
lebo@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Concepción Gutiérrez** por permitirme formar parte de su laboratorio, por su trato con los estudiantes. Siempre le estaré agradecido por su cariño y apoyo en todo sentido, sus consejos en lo profesional y personal. Le agradezco infinitamente por hacerme sentir cómodo y en casa en su laboratorio.

Al **Dr. Pablo Muriel** por introducirme desde la licenciatura al trabajo en un laboratorio, su trato que va mas allá de un director de tesis, y en todo sentido siempre muestra la amistad con sus estudiantes.

A la **Dra. Lety** por aceptar ser parte de mi comité académico, por sus comentarios en seminarios y en la escritura de esta tesis. Al **Dr. Luis Gómez** por sus comentarios, aportes y visión que aportó en el trabajo. A la **Dra. Vero** y la **Dra. Roxana** por su aporte en el laboratorio.

Al **Dr. Jaime Arellanes, Dra. Gabriela Gutiérrez, Dra. Denise Clavijo**, por aceptar ser parte del jurado, además de las correcciones, observaciones y sugerencias en esta tesis. Les agradezco su atención y amabilidad.

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio en UAM/Cardiología, especialmente a **Liss, Ale**, por sus consejos al trabajo y fuera de trabajo, siempre estaré agradecido de su amistad y compañerismo. A **Genaro** por obligarme a leer más para intentar ayudarte en la medida de lo posible. A **Edwin, Jon, Sha, Isme, Brenda, Chavelita**, por siempre hacer el día más alegre con su compañía y acompañarme en varios “assays” del laboratorio y jueves de café.

A mis amigos que de alguna manera también son parte de esto, **Gersa, Janet**, gracias por entender y preocuparse por mi cuando llegaba muy tarde, disfruté mucho su

compañía estos años. A **Rodrigo** por siempre ayudarme a relajarme ocupando a la música como vehículo.

A **Wendy** por hacerme más dulce los últimos meses y apoyarme en este tiempo, gracias.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser los pilares en mi vida, mostrándome lo mejor de esta y lo lejos que uno puede llegar cuando se propone un objetivo. Además, también agradezco su paciencia y tolerancia que siempre han tenido conmigo, gracias.

A mis hermanos, **Cintha, Ernesto, Ale, Angel**. Al ser el más chico, he tenido la oportunidad de ver sus aciertos y errores y tratar de superarlos. Siempre han sido mi principal ejemplo que seguir.

A mis sobrinos, por siempre alegrarme con su presencia. Trataré de ser un ejemplo para ustedes.

A la vida misma, por hacer de la ciencia la mejor vía para entender el funcionamiento de la vida, descubriendo los secretos que esta nos oculta hasta nuestros días.

LISTA DE ABREVIATURAS

- (EHA) Enfermedad hepática alcohólica
- (ADH) Alcohol deshidrogenasa
- (NAD⁺) Nicotinamida adenin dinucleótido
- (ALDH2) Aldehído deshidrogenasa
- (ERO) Especies reactivas de oxígeno
- (HA) Hepatitis alcohólica
- (SOD2) Superóxido dismutasa
- (TNF- α) Factor de necrosis tumoral alfa
- (GSH) Glutati3n reducido
- (NF- κ B) Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
- (AP1) Proteína activadora 1
- (OMS) Organizaci3n Mundial de la Salud
- (ENSANUT) Encuesta Nacional de Salud y Nutrici3n
- (GST) Glutati3n S-transferasa
- (GPx 1/2) Glutati3n peroxidasa 1 y 2
- (GCS) Cisteína-glutamato Ligasa
- (GPX 4) Glutati3n peroxidasa 4
- (Bax) Proteína X asociada a Bcl2
- (Bcl-2) (Proteína 2 ligada al linfoma de células B)
- (Bcl-xL) (Proteína extra larga ligada al linfoma de células B)
- (Actin) Actina
- (AST) Aspartato aminotransferasa
- (ALT) Alanina aminotransferasa
- (HDL-c) Lipoproteína de alta densidad
- (TG) Triglicéridos

RESUMEN

La enfermedad hepática alcohólica, es el producto del consumo crónico de bebidas alcohólicas, y representa un problema de salud pública a nivel mundial. Datos epidemiológicos muestran que el consumo de bebidas alcohólicas se ha incrementado en todo el mundo. De igual forma, el consumo de dietas altas en grasa, particularmente de colesterol, también ha aumentado a nivel mundial y nacional, lo cual sugiere que ambos factores pueden coexistir y así, promover mayor daño al hígado. El objetivo de este trabajo fue determinar si el consumo de colesterol agrava el daño hepático inducido por una dieta alcohólica. Ocupamos un modelo daño hepático conocido como modelo NIAAA, el cual ha sido reportado como uno de los mejores modelos para estudiar la enfermedad hepática alcohólica. Nuestros datos sugieren que la sobrecarga de colesterol en hígado promueve mayor sensibilización a los efectos tóxicos del alcohol en el inicio de la enfermedad hepática alcohólica, aumentando la necrosis hepática hasta 1.5 veces en ratones macho y la carga de lípidos hasta 5.5 veces en el tejido de ratones hembra. El cotratamiento de alcohol y colesterol promueve el incremento de enzimas relacionadas con la síntesis de glutatión y la detoxificación de xenobióticos mediante enzimas de fase II. El tratamiento crónico con alcohol sensibiliza a las células hepáticas hacia una muerte por apoptosis, sin embargo, este efecto es inhibido por el cotratamiento con colesterol. Estos resultados demuestran que el colesterol promueve resistencia a la apoptosis. Este fenómeno puede promover mayor compromiso hepático, al evitar que los hepatocitos dañados por el alcohol mueran de forma controlada, evitando el daño tisular.

ABSTRACT

Alcoholic liver disease is the result of chronic alcohol consumption and represents a public health problem worldwide. Epidemiological data show that the consumption of alcoholic beverages has increased worldwide. Similarly, the consumption of high-fat diets, particularly high cholesterol diets, has globally increased, suggesting that both factors can coexist and promote greater liver damage. The goal of this work was to determine whether cholesterol consumption aggravates liver damage induced by an alcoholic diet. We occupy a liver damage model known as NIAAA model, which has been reported as one of the best models for the study of alcoholic liver disease. Our data suggest that liver cholesterol overload promotes further aggravation of the toxic effects of alcohol, increasing hepatic necrosis in male mice and lipid overload into female mice liver tissue. Chronic alcohol consumption induces the activation of phase II enzymes for xenobiotic detoxification in male mice. Cholesterol treatment increases protein levels of enzymes related to glutathione synthesis, suggesting that cholesterol increases levels of oxidants. On the other hand, the cotreatment of alcohol and cholesterol promotes the increase of enzymes related to glutathione synthesis and the detoxification of xenobiotics by phase II enzymes. Chronic alcohol treatment sensitizes the liver cells to apoptosis; however, this effect is inhibited by cholesterol treatment, which corroborates previous data from our group and others, showing that cholesterol promotes resistance to apoptosis. This phenomenon can promote increased liver engagement by preventing alcohol-damaged hepatocytes from dying in a controlled manner and as a result, preventing tissue damage.

Tabla de contenido

1-Introducción.....	13
1.1 Epidemiología.....	14
1.2 Metabolismo del etanol.....	16
1.3 Acetaldehído.....	19
1.4 Hipercolesterolemia y acumulación de colesterol en hígado.....	21
2-Justificación.....	22
3-Pregunta de investigación.....	23
4-Hipótesis.....	23
5-Objetivo general.....	23
5.1-Objetivos particulares.....	24
6-Material y métodos.....	24
6.1 Pruebas de función hepática.....	28
6.2 Histología.....	29
6.3 Determinación de colesterol total en tejido hepático.....	30
6.4 Determinación de triglicéridos en tejido hepático.....	31
6.5 Western blot.....	32
6.6 Actividad de caspasa 3.....	34
6.7 Oxidación de lípidos.....	30
6.8 Análisis estadístico.....	35
7-Resultados.....	35
8- Discusión.....	55
9- Conclusiones.....	64
10- Referencias.....	66

1-Introducción

El hígado es el órgano interno con mayor tamaño en el ser humano adulto y posee diferentes funciones en el metabolismo de biomoléculas y xenobióticos, así como de la síntesis de proteínas séricas (Muriel, 2017). Debido a su posición anatómica y a las múltiples tareas metabólicas que cumple, este órgano es susceptible al daño mediado por diversas agresiones como las infecciones virales, hábitos alimenticios, y la toxicidad mediada por el alcohol y su metabolismo (Rocco, 2014).

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) es el resultado del consumo excesivo de bebidas alcohólicas durante un largo período, con consecuencias culturales, económicas y para la salud en todo el mundo. Se estima que la EHA provoca alrededor del 5% de las muertes a nivel mundial (Avila et al., 2019; Brar, 2019). Al igual que la mayoría de las enfermedades hepáticas, la EHA se presenta frecuentemente en ausencia de signos clínicos, por lo tanto, se diagnostica en un estado avanzado, con un estrecho margen de tratamiento.

El consumo de grandes cantidades de alcohol provoca un funcionamiento incorrecto del hígado, el cual puede ocasionar un amplio espectro de lesiones hepáticas que inician con la acumulación de lípidos en el parénquima hepático (esteatosis). Si el consumo de alcohol es crónico, la enfermedad hepática puede progresar a un proceso inflamatorio conocido como hepatitis, posteriormente la inflamación puede promover la activación de células estelares, provocando un mayor depósito de matriz extracelular, dejando un proceso conocido como fibrosis, cirrosis y eventualmente puede llegar al estado final de las enfermedades hepáticas, el carcinoma hepatocelular, el cual es un evento inflamatorio caracterizado por la

proliferación descontrolada (imagen 1) (Seitz et al., 2018; Szabo et al., 2019). Aproximadamente dos millones de personas mueren cada año por alguna enfermedad hepática crónica, particularmente en la fase cirrótica en donde más del 50% de las muertes se deben a la ingesta crónica de alcohol (El-Din El-Sayed El-Sisi et al., 2019).

1.1 Epidemiología

La EHA representa una de las principales patologías crónicas en todo el mundo y según diferentes informes, del 5 al 6% de las muertes mundiales son atribuibles al consumo de alcohol a nivel mundial (Szabo et al., 2019).

El consumo per cápita de bebidas alcohólicas es diferente entre países y continentes, sin embargo, el consumo de alcohol en los países desarrollados es mayor, este fenómeno se correlaciona con la cirrosis hepática atribuible al consumo de bebidas alcohólicas. Debido a esto, el alcohol es considerado un factor de riesgo de muerte y pérdida de años de vida saludable, particularmente en la población económicamente activa. Es importante mencionar que el consumo de alcohol tiene efectos sistémicos, ya que se ha asociado con daño al miocardio, daño pancreático, renal, disfunción gástrica, trastornos cognitivos, entre otros (Mehta & Sheron, 2019). Sin embargo, existe evidencia de que el consumo moderado de alcohol tiene efectos protectores para la salud, aunque esta hipótesis sigue en discusión (Le Daré et al., 2019; Hernández-Quiroz et al., 2020).

Actualmente, el proceso patológico es estudiado desde una perspectiva multifactorial, donde el contexto genético, ambiental, y el género se consideran

factores de riesgo. En este contexto, el consumo de alcohol resulta en un hígado graso en el 90% de los consumidores crónicos, sin embargo, sólo el 35% de esta población desarrolla esteatohepatitis alcohólica y sólo el 20% desarrolla cirrosis alcohólica. Por esta razón, se ha propuesto que existen diferentes agentes que pueden influenciar la progresión de la enfermedad hepática alcohólica (Gao & Bataller, 2011; Seitz et al., 2018). Dentro de estos agentes modificadores, podemos mencionar las variantes genéticas que afectan la actividad de las enzimas que metabolizan al etanol, el género y la edad, y recientemente se ha considerado a la dieta como un agente de interés; principalmente, el consumo de dietas altas en grasa las cuales pueden acelerar los efectos tóxicos del etanol y su metabolito, el acetaldehído. (Meroni et al., 2018; Li et al., 2019; Shimizu et al., 2012).

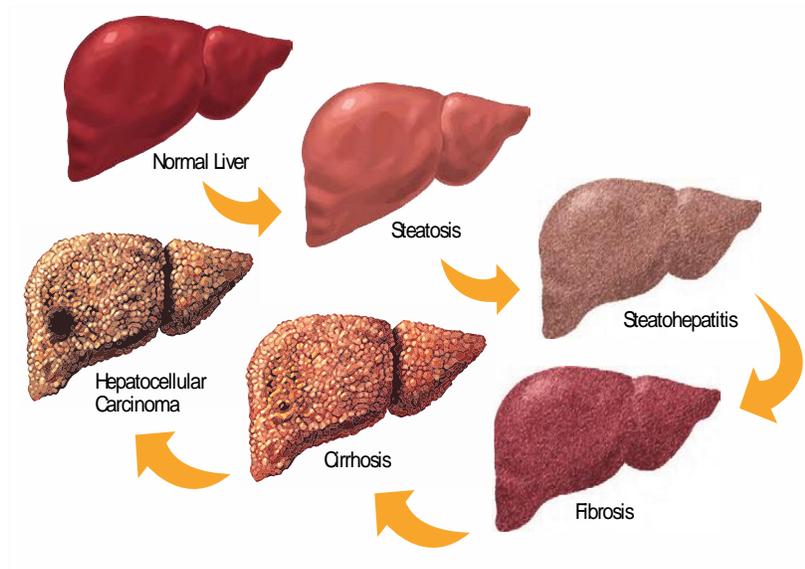


Figura 1: Progresión de la enfermedad hepática. Tomada de Osna, 2017.

1.2 Metabolismo del etanol

La biotransformación del etanol inicia, aunque en pequeñas cantidades, en la mucosa gástrica a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); sin embargo, el etanol es oxidado preferentemente en el hígado por los hepatocitos, principales y más abundantes células del órgano (Teschke, 2018). Los hepatocitos poseen tres vías distintas para la oxidación del etanol, la vía principal es a través de la enzima ADH, la cual está localizada en el citoplasma celular y ocupa como coenzima al nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) para oxidar a la molécula de etanol. La segunda vía de biotransformación del etanol es a través del citocromo P450 2E1 (CYP2E1), enzima localizada en el retículo endoplásmico liso. Finalmente, la tercera vía de biotransformación es mediante la catalasa residente de los peroxisomas, la cual ocupa una molécula de peróxido de hidrógeno para biotransformar al etanol. Cabe mencionar que las tres vías que metabolizan al etanol tienen como resultado la generación del mismo producto, el acetaldehído (imagen 2) (Cederbaum, 2012; Gao & Bataller, 2011).

El acetaldehído es una molécula muy reactiva, la cual puede reaccionar con moléculas orgánicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, ocasionando una pérdida de la función de éstas (Osna et al, 2017; Guo & Ren, 2010). Dado los efectos tóxicos del acetaldehído, se ha desarrollado de forma evolutiva, un sistema de eliminación eficaz de este metabolito (Gallina & Duxin, 2020). Una vez generado el acetaldehído, éste es biotransformado en la mitocondria por la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2), la cual es una enzima con una K_m (afinidad de la

enzima por su sustrato) muy baja (en el orden micromolar), esto genera que la enzima sea un sistema muy eficiente para eliminar al acetaldehído. La ALDH2 convierte al acetaldehído en un producto menos tóxico, el acetato, el cual puede ser eliminado a través de la circulación, también puede ser utilizado como bloque constructor para lípidos, o bien ser modificado para ser utilizado durante las modificaciones postraduccionales (Chen et al., 2014; Wilson & Matschinsky, 2020).

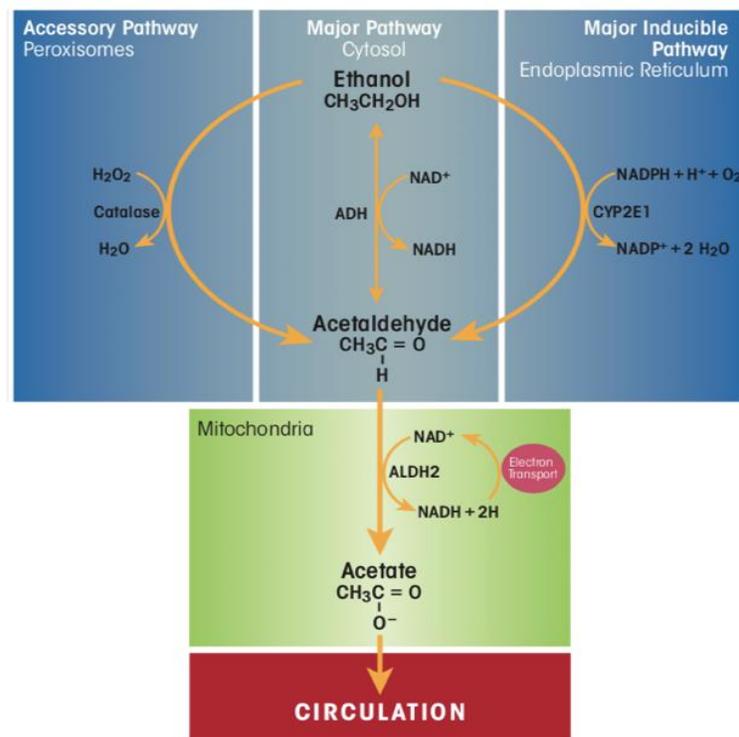


Figura 2: Vías de oxidación de etanol en el hígado. La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es una enzima citosólica, mientras que la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH2) se localiza en la mitocondria. Ambas enzimas catalizan oxidaciones secuenciales que convierten al etanol en acetato. La oxidación del etanol a acetaldehído puede también llevarse a cabo por un sistema inducible y una vía accesorio de biotransformación mediada por el CYP2E1 y por la catalasa residente en peroxisomas respectivamente. Tomado de Osna, 2017.

El primer efecto de la biotransformación del etanol y el acetaldehído es sobre el metabolismo de los lípidos, produciendo un aumento en la lipogénesis *de novo* y una disminución en la oxidación de ácidos grasos. Este efecto ocasiona la acumulación de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol, lo que resulta en un hígado graso (Seitz et al., 2018). En un subconjunto de bebedores, el consumo crónico de alcohol, además de hígado graso, puede presentarse un proceso inflamatorio, lo que se refiere como esteatohepatitis alcohólica, que es caracterizada por la presencia de estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidante, caracterizada histológicamente por acumulación de lípidos en el tejido, infiltrado de células inflamatorias, deformación de la morfología del hepatocito, presencia de cuerpos de Mallory-Denk, y activación o no de células estelares hepáticas (CEH) (Beier & Arteel, 2010; Hoyt et al., 2017; Seitz et al., 2018).

La inflamación crónica, la muerte de los hepatocitos y las lesiones al tejido hepático conducen a un depósito de matriz extracelular exacerbado conocido como fibrosis hepática (Reyes-Gordillo et al., 2014; Muriel, 2019) . La fibrosis avanzada causa pérdida en la arquitectura del parénquima hepático y la inhibición de la regeneración hepática, esto hace que el componente fibroso reemplace a las células hepáticas causando insuficiencia hepática y un daño sistémico. Por último, la etapa final de la EHA, el carcinoma hepatocelular (HCC), se desarrolla cuando el acetaldehído y las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por la biotransformación del etanol, conducen a mutaciones en el ADN y a la transformación neoplásica del hepatocito (Setshedi et al., 2010). Cabe mencionar que durante el curso de la EHA, puede ocurrir un evento agudo llamado hepatitis alcohólica (HA), que se caracteriza por inflamación, reacción ductular, sepsis y falla hepática fulminante (Aguilar-Bravo

et al., 2019; Argemi et al., 2019). La HA es un evento asociado con un alto índice de mortalidad (Cooley & Groblewski, 2020).

1.3 Acetaldehído

El acetaldehído es el producto principal del metabolismo oxidante del etanol, es una molécula con alta reactividad con biomoléculas, particularmente proteínas y ácidos nucleicos, con las cuales puede formar aductos y provocar un mal funcionamiento de estas moléculas (Simoni-Nieves, 2017). La eliminación del acetaldehído se lleva a cabo por la enzima mitocondrial ALDH2, la cual genera NADH y convierte al acetaldehído en acetato. El acetato resultante reacciona con la coenzima A para formar acetil-CoA, la cual se utiliza principalmente en la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Guo & Ren, 2010). Se ha reportado el efecto del acetaldehído en la modulación del metabolismo de lípidos en el hígado a través de los factores de transcripción SREBP-1c y PPAR α , factores clave en la lipogénesis *de novo* y la oxidación de ácidos grasos respectivamente (Galli et al., 2001; Lluís et al., 2003). Muchos de los efectos del etanol, a nivel celular y fisiológico, se han atribuido al acetaldehído, estos efectos se han evaluado en varios modelos experimentales. Nuestro grupo de investigación ha reportado que, en un cultivo primario de hepatocitos de rata y en la línea celular HepG2, el acetaldehído afecta la función mitocondrial y disminuye la actividad de la superóxido dismutasa 2 (SOD2), una enzima clave en la detoxificación del anión superóxido, también se encontró que el tratamiento con acetaldehído resulta en una disminución de los niveles del glutatión (GSH) el principal antioxidante endógeno, y este fenómeno puede ser responsable

de la oxidación de lípidos y proteínas (Clavijo-Cornejo et al., 2014; Farfán Labonne et al., 2009; Olivares et al., 1997). También reportamos que el tratamiento con acetaldehído en células estelares hepáticas da lugar a una mayor secreción de colágena y TNF- α en comparación con las células no tratadas, un efecto que no se observó con el tratamiento con etanol (Gutiérrez-Ruiz et al., 2001). En otro trabajo, se reportó que la incubación de células de la línea celular E47 (células HepG2 que contienen un vector de expresión para el CYP2E1) con etanol, generó estrés oxidante a través de la depleción del GSH y la activación de NF- κ B y AP1, ambos factores de transcripción involucrados en la respuesta celular al estrés y la inflamación. El tratamiento con acetaldehído, también promovió la activación de ambos factores de transcripción, sin embargo, este efecto no fue dependiente del estrés oxidante, debido a que el acetaldehído no promovió la disminución de los niveles de GSH, lo que sugiere que el mecanismo por el cual el acetaldehído promueve la activación de NF- κ B y AP1, es independiente del estrés oxidante (Román et al., 1999). Cabe señalar que, aunque el acetaldehído no disminuye los niveles de GSH en la célula, este metabolito impide el transporte de GSH a las mitocondrias, un efecto dependiente del aumento del colesterol en la membrana mitocondrial, producto del estrés del retículo endoplásmico (Lluis et al., 2003; Ribas et al., 2014; Marí et al., 2014). Además, el acetaldehído es una molécula altamente reactiva, que puede interactuar directamente con el ADN, causando lesiones que pueden conducir a la inestabilidad genómica (Ceccaldi et al., 2016; Hodkinson et al., 2020).

1.4 Hipercolesterolemia y acumulación de colesterol en hígado

Como se mencionó previamente, la historia natural de la EHA puede ser acelerada en presencia de agentes ambientales o factores genéticos (Seitz et al., 2018). En este sentido, se ha observado cómo las dietas altas en lípidos, junto con el consumo de alcohol, pueden promover mayor compromiso hepático, particularmente en modelos experimentales en donde ambos agentes etiológicos promueven mayor carga de lípidos en el hígado, así como mayor inflamación y fibrosis (Souza et al., 2015; Wang et al., 2010; Chang et al., 2015). Diversos modelos experimentales han descrito cómo los efectos oxidantes del etanol y su metabolito son potenciados en presencia de lípidos en los hepatocitos (Hernández et al., 2015), en un modelo *in vitro*, sin embargo, también en un estudio hecho en cultivo primario de hepatocitos de ratón, se observó que los efectos del etanol y el acetaldehído se ven mayormente potenciados cuando el lípido evaluado es el colesterol (López-Islas et al., 2016).

Nosotros y otros grupos de trabajo hemos demostrado el papel diferencial que tiene el tipo de lípido en el daño hepático. El colesterol, a diferencia de otro tipo de lípidos, ha sido observado como un agente tóxico *per se*. El papel del colesterol en la EHA ha captado, en los últimos años, mayor atención de los estudios celulares y moleculares de cómo este lípido acelera la progresión de la enfermedad. Existen algunos reportes en la literatura en donde se observa que, el colesterol claramente acelera la EHA en modelos *in vivo*, sin embargo, dichos trabajos muestran los efectos de la combinación de ambos agresores a tiempos mayores a cuatro meses, por tanto, el mecanismo por el cual el colesterol pudiera estar comprometiendo al hígado no es claro (Krishnasamy et al., 2016; Li et al., 2019).

2-Justificación

El abuso en el consumo de alcohol representa un problema de salud a nivel mundial, una de cada 10 personas es afectada en los países de occidente (Thursz, *et al*, 2019). Las enfermedades hepáticas relacionadas al consumo de alcohol afectan a más de 10 millones de personas en Estados Unidos de Norteamérica, con un costo anual de aproximadamente 166 billones de dólares por gastos de hospitalización (Nelson, *et al.*, 2002). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el número de muertes por año ocasionadas por el consumo de alcohol fue de aproximadamente 3.3 millones a nivel mundial (5.9 % de todas las muertes) y con una tasa de morbilidad del 5.1% (Osna, *et al*, 2017). De acuerdo con la Encuesta Nacional de la Salud en su edición del 2012 (Ecuador, 2014), las enfermedades hepáticas crónicas en México ocupan el cuarto lugar entre las principales causas de mortalidad en el país, con un porcentaje del 5.3% de muertes a nivel nacional, y de acuerdo con la misma encuesta en su versión del 2018, la ingesta de bebidas alcohólicas ha incrementado en población cada vez más joven, por lo que es clara la importancia de las enfermedades hepáticas como problema de salud a nivel nacional. En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha reportado que los efectos del etanol y, particularmente del acetaldehído, se ven potenciados por la presencia de lípidos como el colesterol, el cual agrava la enfermedad hepática alcohólica, lo cual influye en el pronóstico de los pacientes (López-Islas, *et al*, 2016). Datos de la OMS indican que la prevalencia de pacientes con hipercolesterolemia fue de alrededor del 40% en la década pasada, sin embargo, se estima que dicha cifra ha sido rebasada en la década actual, cabe mencionar que, de acuerdo con

datos de la ENSANUT 2018, cerca del 25% de la población mexicana encuestada (20-79 años) mencionó haber recibido un diagnóstico de hipercolesterolemia (ENSANUT, 2018). Debido a esto, es importante conocer los mecanismos por los cuales el consumo crónico de alcohol promueve daño al hígado en presencia de un ambiente con sobrecarga de colesterol, el cual es también un problema de salud pública en nuestro país por la ingesta de alimentos con alto contenido de este lípido.

3-Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la sobrecarga de colesterol en el inicio del daño hepático inducido por una ingesta crónica de etanol?

4-Hipótesis

Dado que el consumo crónico de alcohol produce daño hepático, el colesterol promoverá mayor compromiso del órgano cuando estos dos agentes coexistan en un modelo preclínico.

5-Objetivo general

Determinar la contribución del colesterol durante el inicio del daño hepático inducido por una ingesta crónica de alcohol.

5.1-Objetivos particulares

- 1- Caracterizar el daño hepático en un modelo preclínico de daño por alcohol, en presencia o ausencia de colesterol.
- 2- Evaluar los mecanismos por los cuales el colesterol promueve mayor daño hepático durante el consumo de alcohol.

6-Material y métodos

El trabajo con animales se realizó en el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo las normas establecidas por el comité para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la misma institución. El estudio cumplió con los requisitos establecidos en la norma oficial mexicana (NOM-062-Z00-1999) así como, la guía de uso y cuidado de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de Norteamérica (NIH por sus siglas en inglés). Todos los estudios se realizaron en ratones macho y hembras de la cepa C57BL/6J de 8-12 semanas de edad, la cual ha sido reportada como la mejor cepa para tratamiento con alcohol *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas, en un ambiente libre de patógenos, con temperatura controlada y ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Previo a los tratamientos con dietas especiales, los ratones fueron alimentados con una dieta balanceada LABDIET RODENT 5001.

Usamos el protocolo conocido como modelo NIAAA (Bertola et al., 2013), el cual consiste en el consumo de una dieta líquida (dieta Lieber-DeCarli), adicionada con

etanol (5% concentración final) durante 10 días (consumo crónico) seguida de un tratamiento agudo (5g/kg) de una solución de etanol al 31.5% por vía intragástrica (binge). El tratamiento agudo en el último día de tratamiento tiene como objetivo elevar los niveles de etanol en sangre, imitando un evento agudo sobre crónico observado frecuentemente en bebedores crónico. Cabe mencionar que la administración intragástrica de alcohol acelera la farmacocinética de esta sustancia. Adicionalmente, se estudió el mismo modelo, pero con animales sometidos a una dieta líquida a la cual se le adicionó colesterol (1.25 % p/v). Los grupos experimentales se muestran en la imagen 3.

A Diseño experimental

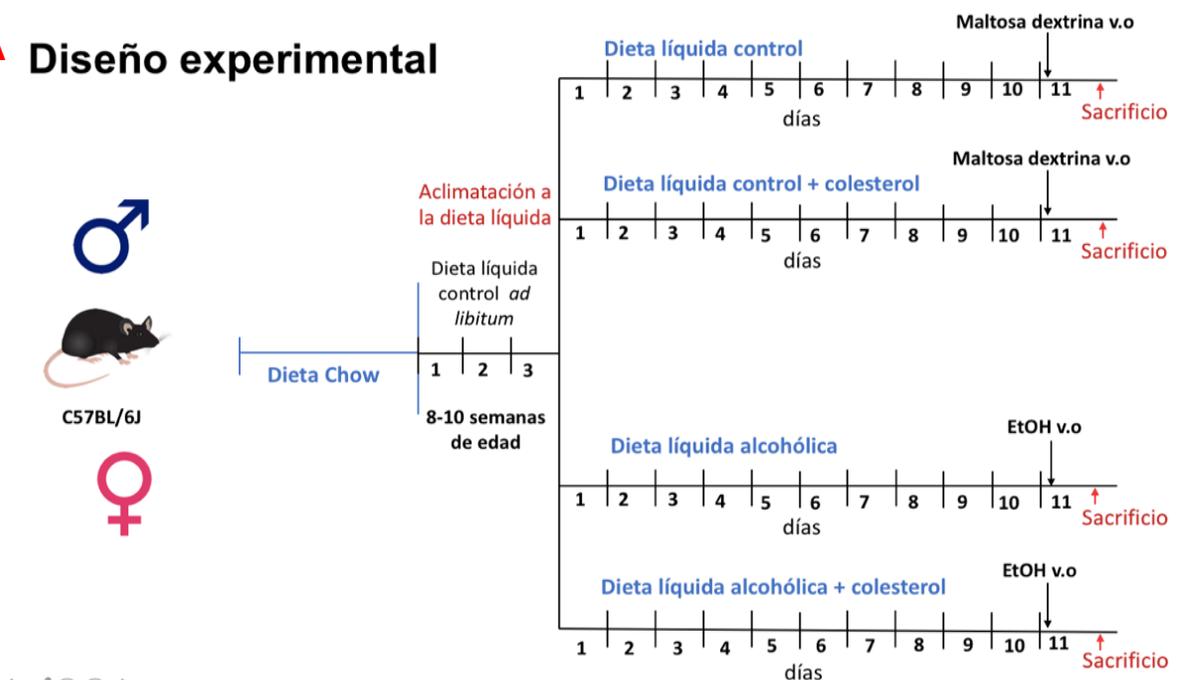


Figura 3: Grupos experimentales en el modelo de daño hepático por alcohol más colesterol. El número de ratones macho utilizados en el estudio fue de 5 ratones, mientras que de hembras fue de 3.

Al finalizar los tratamientos, los animales fueron sacrificados bajo anestesia con avertina (0.4 mg/kg). 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 rpm a 4°C. El suero fue obtenido cuidadosamente de la fase superior del vial. El hígado fue removido y colocado en buffer de fosfatos (PBS) frío. El órgano fue seccionado y depositado en viales de 1.5 mL para las determinaciones bioquímicas y moleculares (imagen 4). Cabe mencionar que los órganos como el páncreas, riñones y corazón fueron recuperados con la finalidad de reducir el número de animales en posteriores estudios.

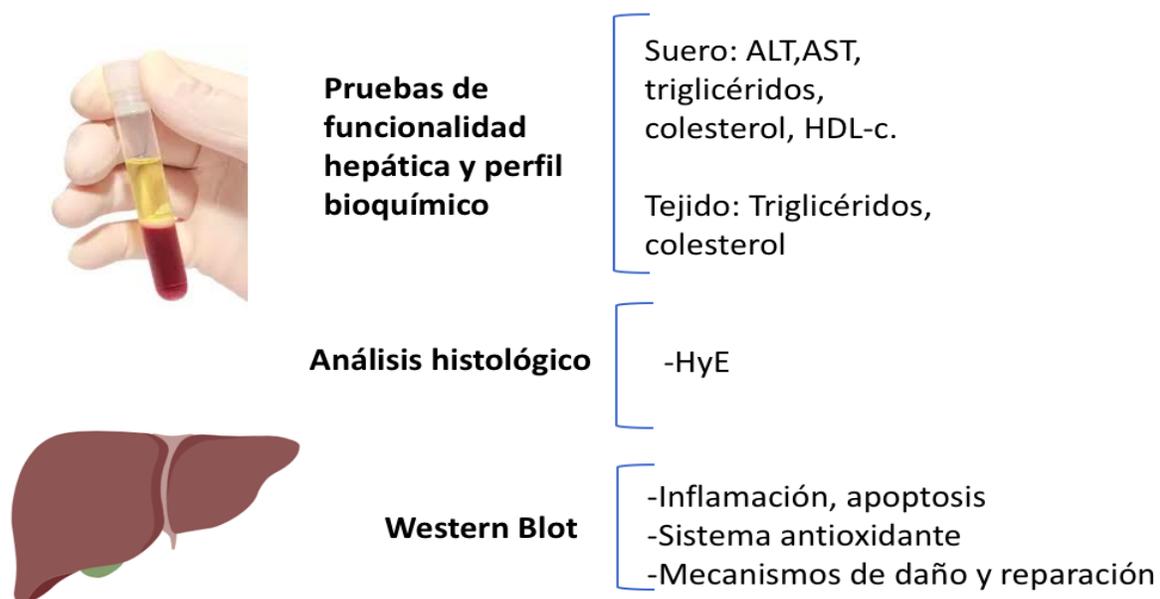


Figura 4: Marcadores bioquímicos de daño hepático y otras técnicas empleadas en el estudio para la determinación de los efectos del alcohol y colesterol en hígado

Las dietas utilizadas en este modelo experimental son comerciales (Dyets, Inc). Las dietas han sido previamente reportadas y proporcionan un excelente modelo para la alimentación de alcohol *ad libitum* en roedores (Lieber & Decarli, 1989; Lieber & Decarli, 1982). Las dietas se pueden encontrar con los siguientes números de catálogo:

- Lieber-DeCarli Regular Control Rat Diet. No. Catálogo: 710027

Esta dieta contiene 1 kcal/mL, de las cuales el 35% de las calorías son derivadas de lípidos, 47% de carbohidratos y el 18% de proteínas.

- Lieber-DeCarli Ethanol Rat Diet. No. Catálogo: 710260
- Esta dieta contiene 1 kcal/mL, de las cuales el 35% de las calorías son derivadas de lípidos, 11% de carbohidratos, 18% de proteínas y 36% del etanol.

La composición y valores calóricos de cada dieta, de acuerdo con la hoja técnica, son mostrados en la imagen 4 y en la tabla 1 y 2.



Figura 5: Composición en porcentaje de las dietas Lieber-DeCarli utilizadas en el estudio.

Tabla 1: Componentes de la dieta control Lieber-DeCarli.

• Lieber-DeCarli Regular Control Rat Diet. # Cat: 710027		
Ingredient	Grams/L	Kcal/L
Casein	41.4	176.778
L-cystine	0.5	2
DL-methionine	0.3	1.2
Corn oil	8.5	75.1
Olive oil	28.4	251.056
Safflower oil	2.7	23.86
Maltose dextrin	115.2	456.192
Cellulose	10	0
Mineral mix	8.75	4.1125
Vitamine mix	2.5	9.5
Choline bitartrate	0.53	0
Xanthan Gum	3	0

Tabla 2: Componentes de la dieta alcoholica Lieber-DeCarli.

• Lieber-DeCarli Regular Control Rat Diet. # Cat: 710027		
Ingredient	Grams/L	Kcal/L
Casein	41.4	176.778
L-cystine	0.5	0
DL-methionine	0.3	0
Corn oil	8.5	75.1
Olive oil	28.4	251.056
Safflower oil	2.7	23.86
Maltose dextrin	25.6	101.376
Cellulose	10	0
Mineral mix	8.75	4.1125
Vitamine mix	2.5	9.5
Choline bitartrate	0.53	0
Xanthan Gum	3	0

6.1 Pruebas de función hepática

Se utilizaron tiras reactivas comerciales (Spotchem II, Kenshin-2) para la determinación cuantitativa en suero de marcadores de función hepática como la aspartato aminotransferasa (AST), la alanina aminotransferasa (ALT), así como

para la concentración de triglicéridos, HDL-c y colesterol total. La medición de estos parámetros se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Rosales-Cruz et al., 2018).

6.2 Histología

La tinción de hematoxilina y eosina (HE) nos permite observar la arquitectura de un tejido. A través de esta tinción, podemos observar componentes celulares, así como también, cambios que pueden referirse a una patología o daño tisular. La hematoxilina tiene un pH básico, que se une fácilmente con componentes ácidos, como núcleos celulares, lo que resulta en un color violeta, mientras que la eosina se une a los componentes básicos, mostrando el citoplasma de color rosa. El protocolo para esta técnica fue el siguiente:

Después de que los animales fueron sacrificados, una pequeña porción del lóbulo derecho se fijó en paraformaldehído al 4% durante al menos 24 h. Las porciones hepáticas se lavaron con agua y se deshidrataron en alcohol a diferentes concentraciones. Las pequeñas porciones de hígado se incluyeron en la parafina para cortes en microtomo. Se hicieron cortes de 6 micras de espesor y se colocaron en portaobjetos silanizados. Después, las muestras se desparafinaron en calor y se hidrataron en xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%. Posteriormente se agregó hematoxilina de Harris durante 15 min y luego se lavó con agua. Posteriormente, se eliminó el exceso de hematoxilina, y el contraste se mejoró mediante la adición de alcohol ácido. Los portaobjetos fueron lavados con agua y se colocaron en agua amoniacal. Posteriormente, los cortes se tiñeron con eosina durante 15 min. Los

portaobjetos fueron lavados con etanol al 95%, etanol absoluto y xileno. Finalmente, los portaobjetos fueron montados en bálsamo. Los cortes teñidos se visualizaron en un microscopio invertido AX10 (Axio Observer Z1 Zeiss).

6.3 Determinación de colesterol total en tejido hepático

La determinación de colesterol total en muestras de hígado de los diferentes grupos experimentales se realizó por métodos previamente reportados por nuestro grupo de investigación (Nuño-Lámbarri et al., 2016). Brevemente, se tomaron 0.03 g de hígado de cada ratón, el cual se homogenizó en 1 mL de PBS con ayuda de un homogenizador de tejido tipo Potter-Elvehjem en viales de 1.5 mL, posteriormente se agregó al vial 20 μ L de KOH al 33% y 200 μ L etanol al 95%, enseguida se calentaron las muestras en agua a 60°C durante 15 min en una parrilla eléctrica. Después, se agregaron 666 μ L de hexano y 200 μ L de agua al vial. Se colectó la capa superior que contiene al hexano y se secó con ayuda de un Speed-Vac durante 60 min. Se añadieron 240 μ L de una solución de O-ftalaldehído disuelto en ácido acético (0.5 mg/mL) y 300 μ L de ácido sulfúrico concentrado, se agitaron los viales y se colocó el producto de la reacción en una placa de 96 pozos. Después, la muestra fue leída a una absorbancia de 550 nm por triplicado. La cantidad de colesterol fue determinada con ayuda de una curva estándar de colesterol. Finalmente, los datos fueron normalizados por cantidad de proteína, la cual fue cuantificada colorimétricamente utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) (PierceTM, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4 Determinación de triglicéridos en tejido hepático

Para este ensayo, utilizamos el estuche de cuantificación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, MAK266). En este ensayo, los triglicéridos se convierten en ácidos grasos libres y glicerol, que luego se oxida para generar un producto colorimétrico que puede ser cuantificado a 570 nm. El protocolo fue el siguiente:

En primer lugar, se preparó una solución estándar de 0.2 mM de triglicéridos diluyendo 40 μ L del estándar de triglicéridos con 160 μ L de búfer de ensayo de triglicéridos. Se realizó una curva estándar de concentraciones conocidas de triglicéridos. Después, se realizó un homogenado de tejido hepático (0.03 g) y luego las muestras se calentaron a 80-100° C en un baño María de agua durante 5 min. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron con ayuda de una microcentrífuga para eliminar cualquier material insoluble. Se hizo una dilución 1:10 con agua destilada y se añadieron 50 μ L al pozo. A continuación, se añadieron 2 μ L de lipasa al pozo y la mezcla se incubó durante 20 minutos en un agitador horizontal. Se agregaron 50 μ L del reactivo “master reaction mix” a cada muestra y a la curva estándar, se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en un shaker horizontal. La placa fue protegida de la luz con papel aluminio. Finalmente, la placa fue leída a 570 nm en un lector de placa multimodal Cytation™ (BioTek).

La concentración final de triglicéridos se calculó con la ayuda de la solución estándar de triglicéridos. Finalmente, los datos fueron normalizados por cantidad de proteína, la cual fue cuantificada colorimétricamente utilizando el método del ácido

bicinchonínico (BCA) (Pierce™, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5 Western blot

Se preparó un homogenado de hígado (0.03 g) en 300 μ L de buffer de lisis (T-PER; Thermo Scientific, 78510) con inhibidores de proteasas y fosfatasa COMPLETE y phosSTOP respectivamente, utilizando un homogeneizador de dounce de plástico. La lisis se realizó en frío. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se recuperó y se colocó en viales nuevos de 1.5 ml y se almacenó a -70° C. La concentración total de proteínas se determinó utilizando un kit de ácido bicinchonínico (BCA) (Pierce™, Thermo Scientific) y con la ayuda de una curva estándar de albúmina, bajo instrucciones del fabricante. Los volúmenes equivalentes a 30-50 μ g de proteína se cargaron en geles de acrilamida de 8-12%. Las proteínas se separaron por electroforesis a 120 V durante 1.5 h. Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF de 0.2 μ m (GE Healthcare Life Science) durante 1,5 h a 120 V. Las membranas se bloquearon con leche al 5% libre de grasas durante 1 h a temperatura ambiente, y se realizaron tres lavados con TBS-T durante 7 minutos cada uno. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos a las proteínas de nuestro interés (tabla 3) y β -actina (1:10,000 dilución). A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T. Después de eso, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante 1.5 h a temperatura ambiente.

Las membranas fueron reveladas con 4 mL de sustrato luminiscente (luminol) y 40 μ L de peróxido de hidrógeno. Finalmente, las bandas fueron escaneadas y visualizadas en sistema de imagen Chemidoc (Bio-Rad). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por el software Fiji:ImageJ.

Tabla 3: Anticuerpos empleados en los ensayos de Western blot.			
Proteína	Anticuerpo	Compañía	Dilución
GST	FL-218 Sc-292368	Santa Cruz	1:1000
GPx 1/2	D(12) Sc-133160	Santa Cruz	1:1000
SOD2	(A-2) Sc-133134	Santa Cruz	1:1000
GCS	(H-338) Sc-22755	Santa Cruz	1:1000
GPx 4	(E-12) Sc- 166570	Santa Cruz	1:1000
Bax	D-21 Sc-6236	Santa Cruz	1:1000
Bcl-2	(C-2) Sc-7382	Santa Cruz	1:500
Bcl-xL	(H-5) Sc-8392	Santa Cruz	1:500
Actin	A2066	Sigma-Aldrich	1:10000

6.6 Actividad de caspasa 3

Para determinar la actividad de la caspasa 3, se utilizó el ensayo comercial Ac-DEVD-AMC Caspase-3 fluorogenic substrate BD de Pharmagen bajo instrucciones del fabricante y como se reportó previamente en nuestro grupo (Domínguez-Pérez et al., 2019). El ensayo contiene un tetrapéptido fluorogénico sintético (Ac-DEVD-AMC) que se utiliza para cuantificar la actividad de la caspasa 3 en lisados de células apoptóticas. La caspasa 3 corta el tetrapéptido entre D y AMC, liberando el tripéptido fluorescente AMC que es cuantificado por espectrofluorimetría a una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de emisión de 420-460 nm. Para este ensayo, se homogenizó una pequeña fracción de hígado (0.03 g) en buffer de lisis y la muestra se incubó en hielo durante 30 min. Se utilizó una placa de 96 pozos en donde se colocaron 20 μ L del lisado, posteriormente se agregaron 5 μ L del tetrapéptido fluorogénico a cada pozo que contenga el homogenado y se incubó durante 1 h a 37°C. La placa fue leída en un lector de placa multimodal Cytation TM (BioTek).

6.7 Oxidación de lípidos

Se homogenizó una fracción de hígado (0.05g) y se homogenizó en 1 mL de agua destilada con un homogenizador tipo potter. Se tomaron 300 μ L del homogenizado de hígado y se agregaron 700 μ L de Tris-HCl 150 mM pH 7.4 para completar 1 mL. Se agregaron 200 μ L de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%. Se colocaron las muestras en baño María durante 45 min. Posteriormente las muestras fueron

centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y se leyó el sobrenadante a 532 nm en un lector de placa multimodal Cytation™ (BioTek).

6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. En todos los ensayos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), seguida por la prueba post hoc de Tukey para la comparación de grupos, utilizando el software Graph Pad Prism versión 8. Las diferencias entre los diferentes grupos fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p fue <0.05 . Para el análisis de agrupación jerárquica, y la generación del heat map con los datos de las pruebas de función hepática y determinaciones bioquímicas, se utilizó el software Rstudio, previa normalización de los datos mediante el Z-score de cada parámetro.

7-Resultados

Dado que el alcohol es una sustancia con valor calórico, en el presente estudio se ocuparon dietas isocalóricas con el objetivo de evaluar los efectos tóxicos del alcohol y sus metabolitos y no de las calorías que esta sustancia proporciona. La adición de colesterol a la dieta control y a la dieta alcohólica, no afectó el contenido calórico de las dietas, esto debido a que el colesterol, a diferencia de otro tipo de lípidos, es una molécula con aporte calórico de cero. La medición del consumo de la dieta líquida se realizó de forma diaria previo a la colocación de un nuevo bebedero con dieta durante los catorce días de tratamiento.

Al someter a los ratones al modelo NIAAA, observamos que tanto el etanol, como el colesterol, no tuvieron efecto sobre el consumo de la dieta líquida tanto en machos como hembras, como se puede observar en la figura 1A y figura 1B respectivamente. Sin embargo, encontramos una disminución, en ratones macho, en el consumo de la dieta alcohólica al agregarle colesterol durante los primeros tres días del cotratamiento, figura 6A, aunque posteriormente el consumo fue comparable con los demás grupos experimentales.

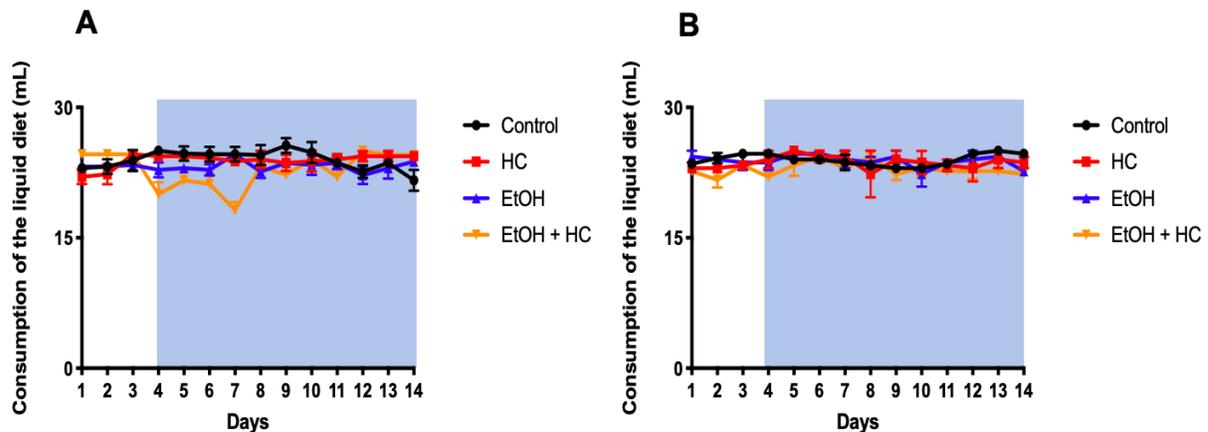


Figura 6: Consumo de las diferentes dietas líquidas durante el transcurso del modelo NIAAA. A) Variación en el consumo de dieta en ratones C57BL/6J machos. B) Variación en el consumo de dieta en ratones C57BL/6J hembras HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol.

Para determinar si la dieta alcohólica provoca una ganancia en el peso corporal, diariamente se registró la media del peso corporal de los ratones en los diferentes grupos experimentales. En la figura 2A y 2B se observa que el peso corporal se mantuvo durante los 14 días de tratamiento con las dietas isocalóricas en machos

y hembras respectivamente. Las figuras 7C y 7D muestran la comparación entre el promedio del peso inicial y final de los diferentes grupos experimentales en machos y hembras respectivamente, en las cuales se observa claramente que las dietas no alteran el peso corporal de los ratones.

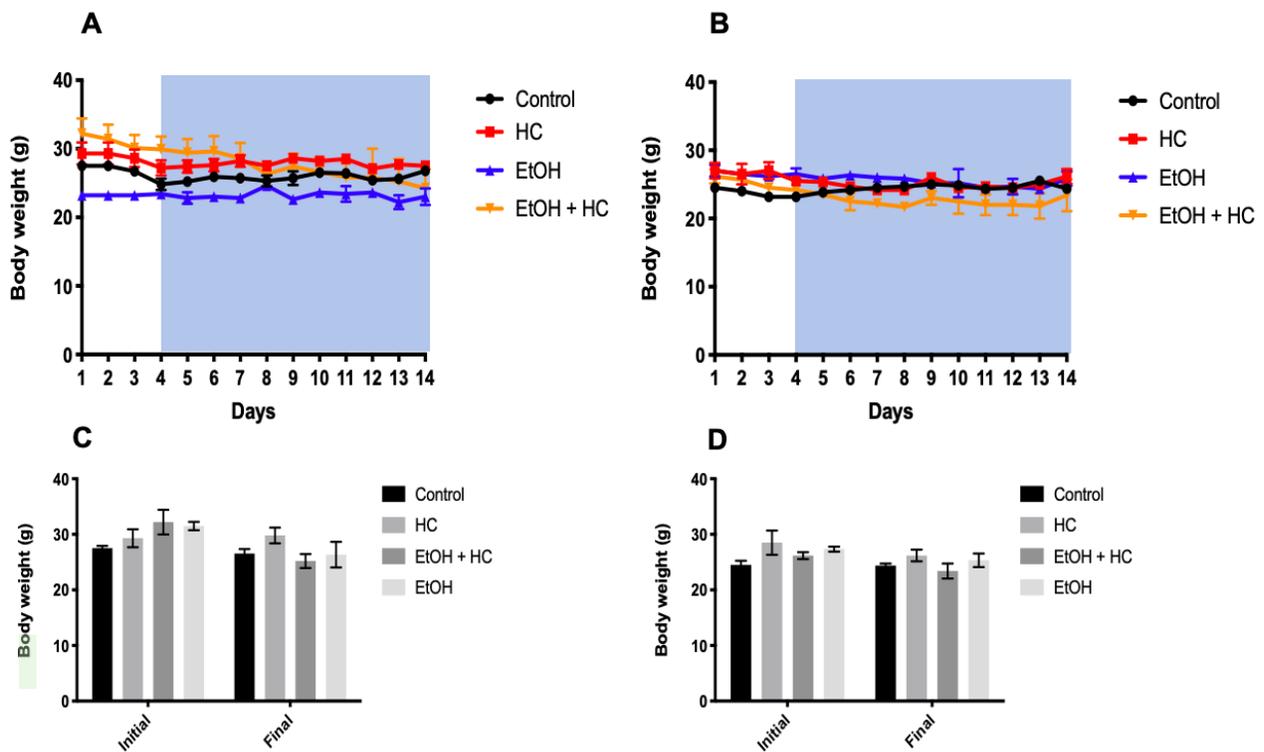


Figura 7: La dieta alcohólica no altera el peso corporal. Los diferentes grupos experimentales fueron tratados con una dieta líquida control durante tres días, posteriormente se le adhirió una dieta alcohólica suplementada o no con colesterol, lo cual no provocó pérdida del peso corporal durante el tratamiento con alcohol en ratones macho(A) y hembras (B), ni al final del tratamiento en machos (C) y hembras (D). HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta

Es bien sabido que los modelos experimentales de daño por alcohol tienen diferentes grados de mortalidad. Diferentes reportes en la literatura indican que, la

mortalidad del modelo NIAAA es menor respecto a otros modelos de daño hepático por alcohol. Nosotros observamos, que la dieta alta en colesterol no ocasionó muerte prematura en ratones macho; sin embargo, la dieta alcohólica promovió la muerte prematura de un ratón a los seis días de tratamiento con alcohol, efecto que fue aumentado por la adición de colesterol a la dieta alcohólica (figura 8A). Por otro lado, en hembras no observamos menor sobrevivencia al tratamiento con la dieta alcohólica, aunque si observamos muerte prematura durante el cotratamiento (figura 8B). Esto puede deberse al número de individuos utilizados en machos y hembras.

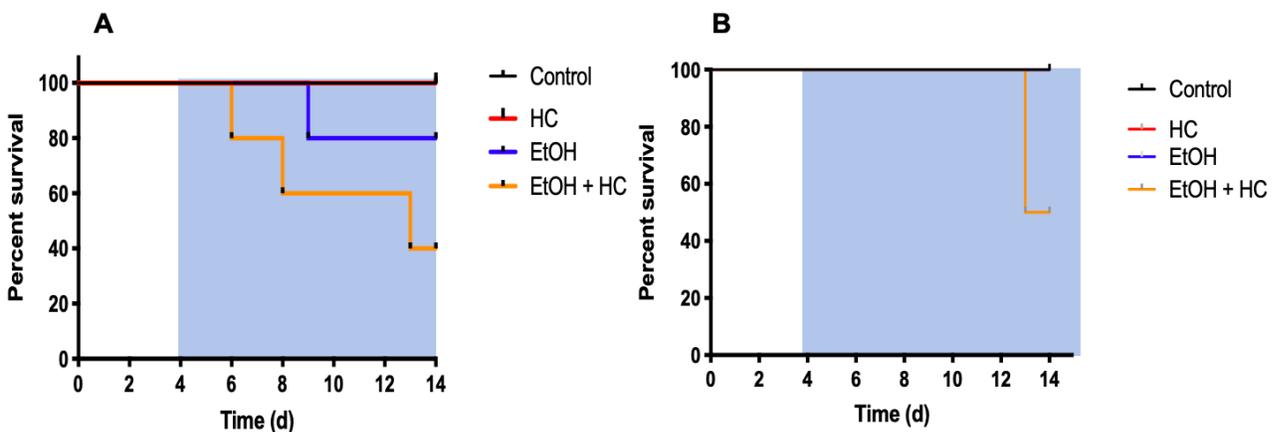


Figura 8: La dieta alcohólica más colesterol provoca la muerte prematura en ratones macho (A) y hembras (B) sometidos al modelo NIAAA. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol.

Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que una dieta hipercolesterolémica (2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio) promueve la sobrecarga de colesterol en el hígado, sensibilizando al órgano a un segundo insulto (Nuño-Lámbarri et al., 2016; Rosales-Cruz et al., 2018). En el presente trabajo, los

ratones fueron sometidos a una cantidad menor de colesterol (1.25% p/v) con las dietas líquidas, ya que las dietas con 2% de colesterol han sido consideradas por diversos grupos de investigación como una cantidad excesiva.

Con el objetivo de conocer si una ingesta menor de colesterol provoca compromiso hepático a un segundo agresor, como el consumo de alcohol.

Después de 10 días de tratamiento con las diferentes dietas, y posterior al sacrificio de los animales, se realizó un registro fotográfico del hígado de los diferentes grupos experimentales. La figura 9A muestra los hígados de los diferentes grupos experimentales. Encontramos que en los hígados de los ratones tratados con la dieta alcohólica más colesterol, el color del órgano fue pálido (una característica del hígado graso) en comparación con hígados de ratones sometidos a la dieta control. Los ratones tratados solo con la dieta alcohólica también mostraron un cambio en la coloración, ligeramente más pálidos.

Previamente, reportamos que el consumo de una dieta alta en colesterol promueve hepatomegalia (Rosales-Cruz et al., 2018) Posterior al sacrificio de los animales, registramos el peso del hígado. Al graficar el cociente peso del hígado/peso ratón no se observó cambio en los ratones macho con ninguna de las dietas utilizadas (figura 9B).

que, al igual que en machos, ninguno de nuestros tratamientos promovió hepatomegalia (figura 10B).

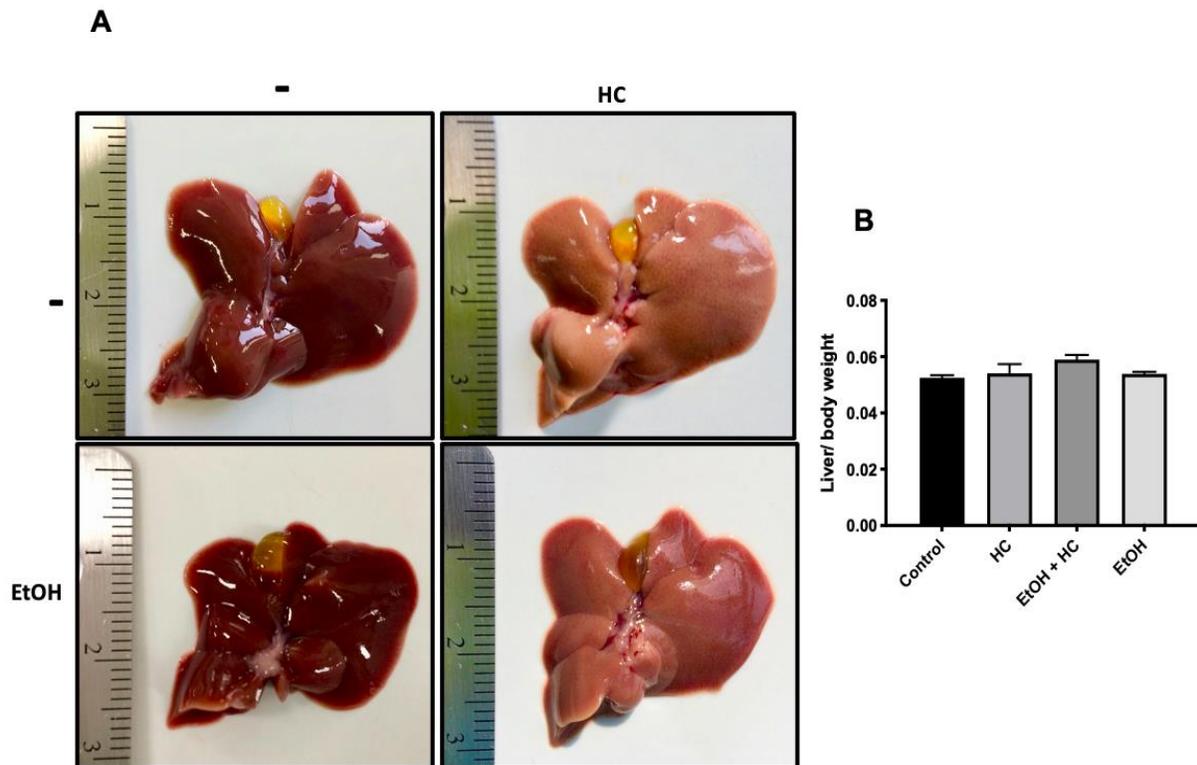


Figura 10: La dieta alcohólica suplementada con colesterol provoca esteatosis hepática en hembras. A) Los hígados de los ratones hembra tratadas con colesterol y en combinación de alcohol mas colesterol muestran un hígado con esteatosis. B) Cociente peso del hígado entre peso corporal de cada ratón HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol.

La histología hepática (figura 11A) por tinción con hematoxilina y eosina, muestra una ligera esteatosis microvesicular, dilatación del sinusoides hepáticos y desorden del parénquima en los ratones machos tratados con la dieta alcohólica. La histología en ratones hembra tratadas con colesterol muestra una esteatosis microvesicular y un marcado infiltrado inflamatorio. Por otro lado, el cotratamiento indujo una esteatosis microvesicular, mayor desorden del parénquima hepático respecto a los

demás grupos en ratones hembra. Con la finalidad de corroborar la presencia de esteatosis se determinó la concentración de lípidos en tejido hepático de los ratones macho. Se observó que la adición de colesterol durante 10 días incrementa los niveles de este lípido hasta 4 veces la concentración que en el grupo control. En el grupo tratado sólo con la dieta alcohólica se observó una tendencia al alza en la concentración de colesterol en tejido (figura 11B). Por otro lado, al medir la concentración de triglicéridos en tejido hepático encontramos que, en el grupo tratado solo con colesterol los niveles de triglicéridos incrementaron de forma significativa, sin embargo, este efecto no se observó en el cotratamiento. Al igual que en la concentración de colesterol en tejido, se observó que el etanol no incrementa los triglicéridos hepáticos (figura 11C).

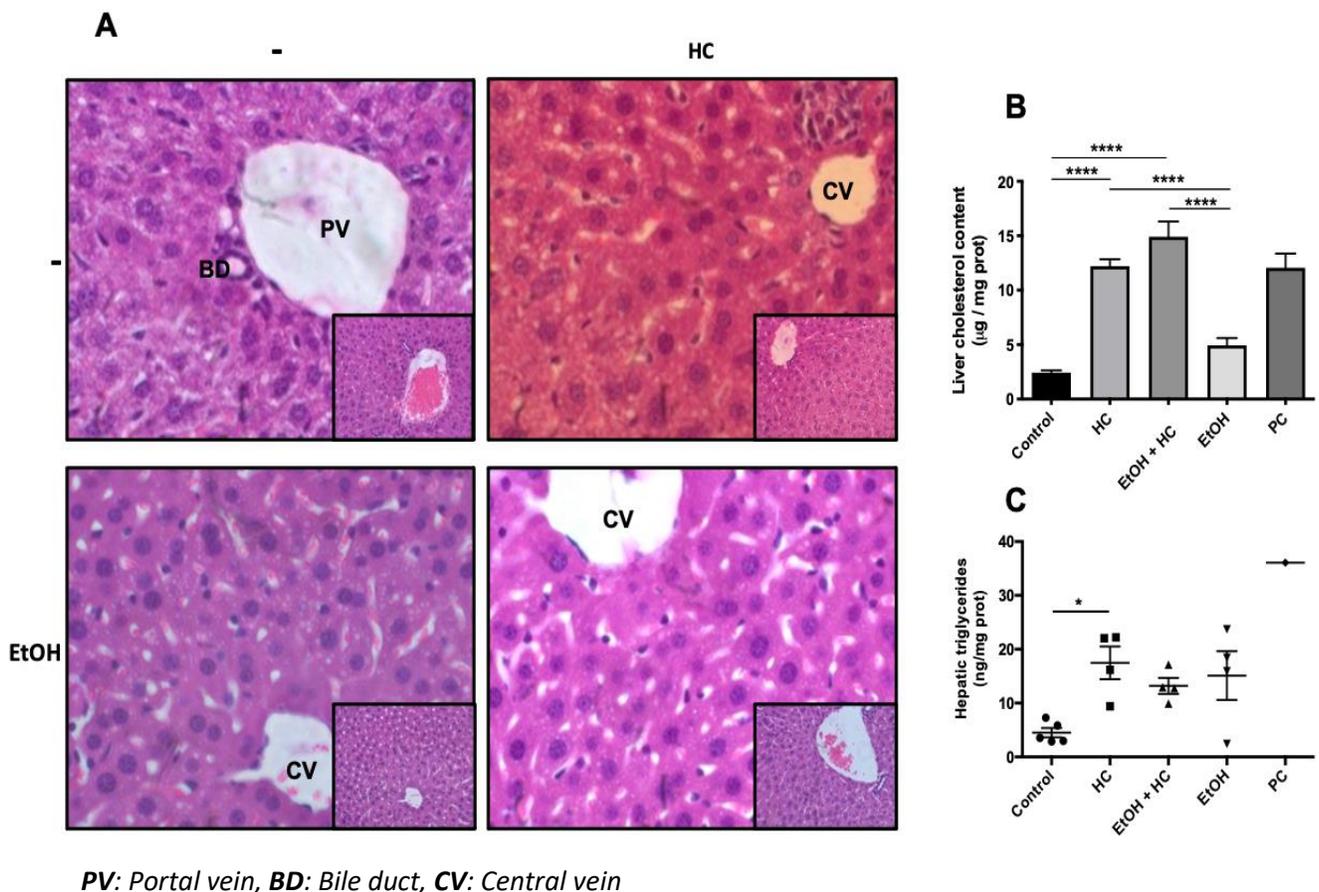


Figura 11: La dieta alcohólica suplementada con colesterol provoca esteatosis hepática en ratones macho. A) Se observó que la adición de colesterol provoca acumulación de lípidos en hígado, sin embargo, este fenómeno se observó con mayor claridad cuando se adicionó colesterol a la dieta alcohólica. B) Contenido de colesterol total en tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. C) Cuantificación de triglicéridos en tejido hepático. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol, PC: control positivo

Dado que la acumulación de lípidos en el hígado es el primer signo de enfermedad hepática, decidimos evaluar si el colesterol y el alcohol promueven una pérdida en la función del órgano. El daño hepático promovido por el etanol y el colesterol fue confirmado, en ratones macho, mediante la cuantificación en suero de la actividad enzimática de marcadores de función hepática como son las transaminasas. En la figura 12A se muestra que la actividad de la AST fue incrementada de forma estadísticamente significativa por el tratamiento con colesterol y por la adición de colesterol a la dieta alcohólica, sin embargo, la dieta alcohólica *per se*, no incrementó la actividad enzimática en suero de la AST. La figura 12B muestra la actividad enzimática de la ALT en suero de ratones macho al finalizar los tratamientos. A diferencia de la AST, la dieta alta en colesterol no incrementó los niveles de la ALT en suero, sin embargo, la dieta alcohólica promovió un aumento significativo de esta enzima en suero, efecto que fue similar en el grupo tratado con ambos agentes tóxicos. Los resultados anteriores indican de forma muy clara que, la combinación de la ingesta crónica de alcohol y colesterol, promueven daño hepático de tipo necrótico. Dado que, la dieta alta en colesterol puede promover la acumulación de colesterol en el sistema circulatorio, así como en tejidos

extrahepáticos, nosotros medimos la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero de ratones macho tratados con las diferentes dietas. Encontramos que, al finalizar los tratamientos, los niveles de HDL fueron similares entre los diversos grupos experimentales (figura 12C). Finalmente, evaluamos la concentración de triglicéridos en suero, en donde encontramos que solo el cotratamiento incrementa los niveles de este lípido en suero respecto al grupo control.

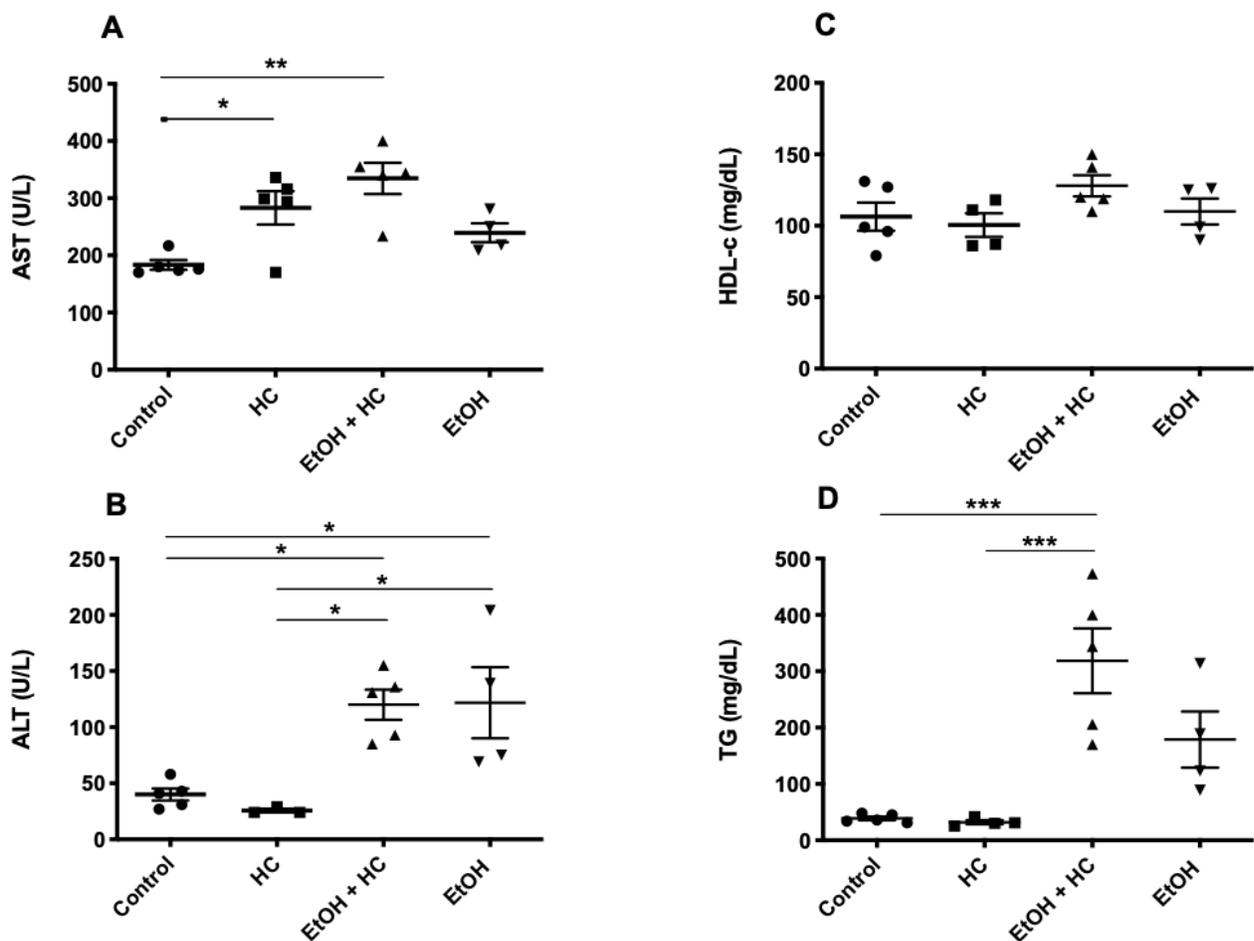


Figura 12: El cotratamiento de alcohol más colesterol altera la funcionalidad hepática en ratones macho. El cotratamiento de la dieta alcohólica provocó un aumento en la actividad de AST y ALT, ambos marcadores de daño y funcionalidad hepática. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

A diferencia de los machos, las hembras tratadas con las diferentes dietas no mostraron cambio en la actividad en suero de enzimas marcadoras de daño hepático como las transaminasas (figura 13A y 13B), sin embargo, la dieta alcohólica fue el único tratamiento que provocó un aumento en la concentración de triglicéridos en suero comparado con el control (figura 13D), efecto que no fue observado en machos.

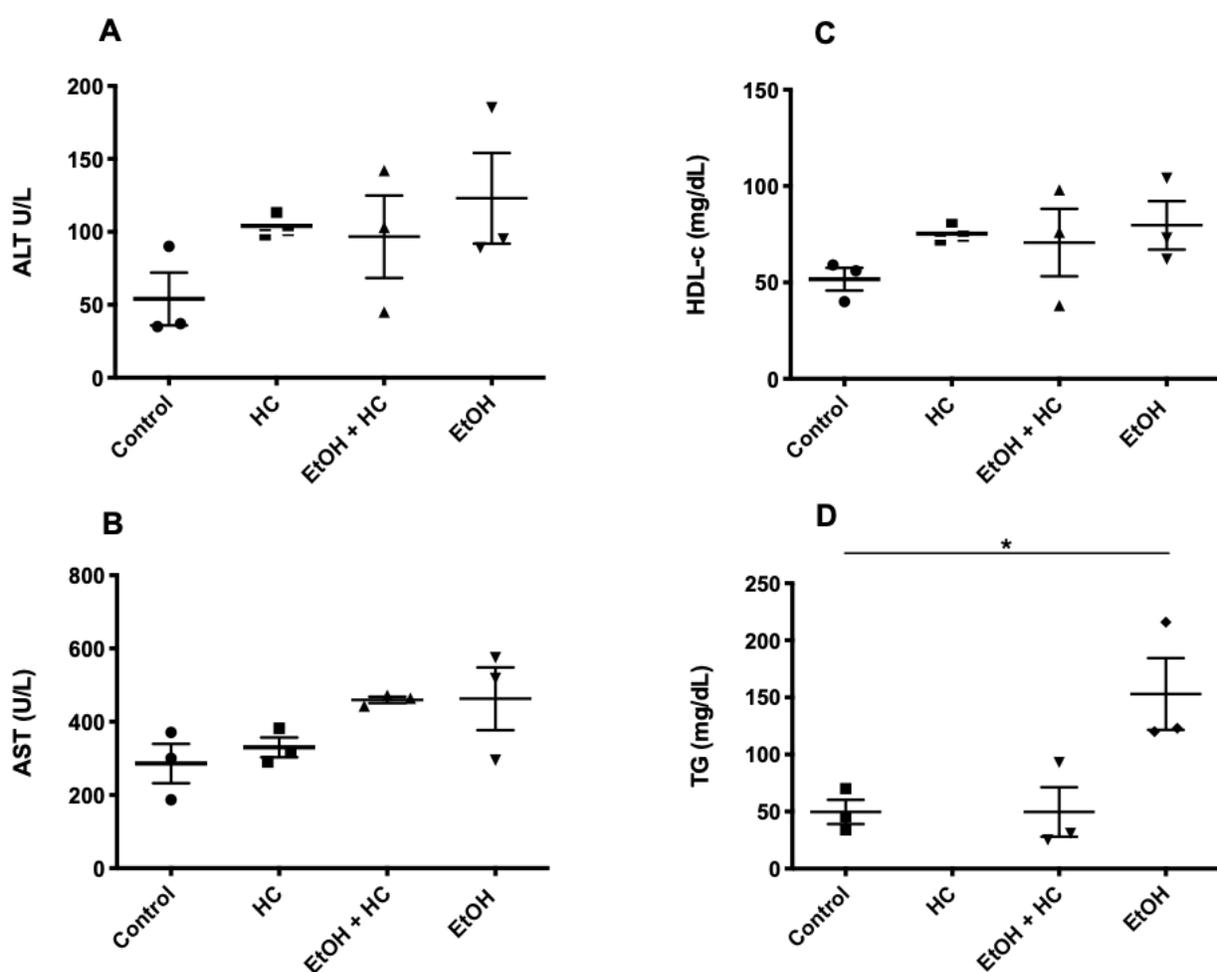
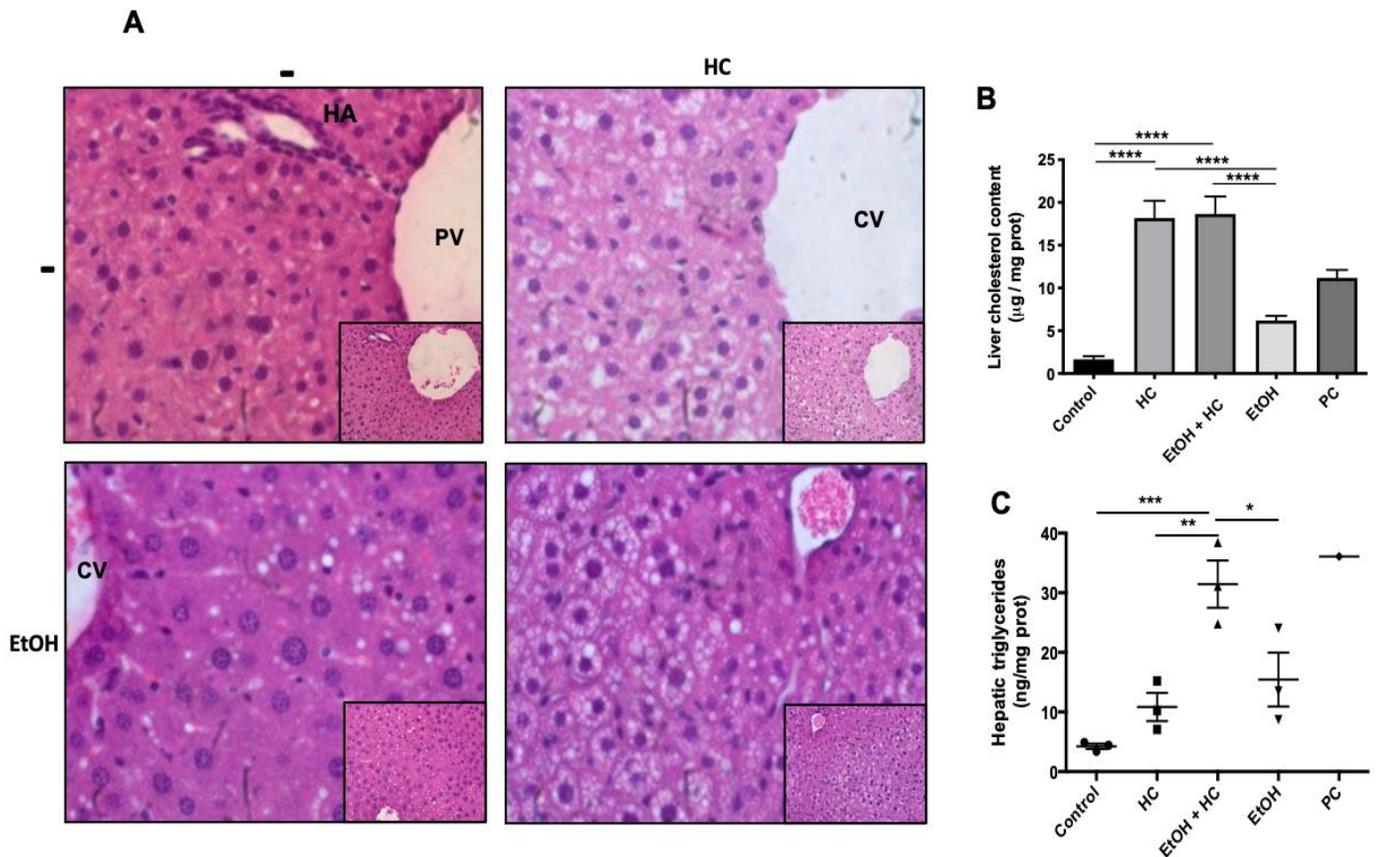


Figura 13: El cotratamiento de alcohol más colesterol no altera la funcionalidad hepática en ratones hembra. El cotratamiento de la dieta alcohólica provocó un aumento, que no fue estadísticamente significativo, en la actividad de AST y ALT, ambos marcadores de daño y funcionalidad hepática. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol. * $P < 0.05$.

La histología hepática de los ratones hembra (figura 14A) muestra una mayor carga de lípidos en el parénquima hepático de los ratones tratados con la dieta control más colesterol, sin embargo, en las hembras tratadas con la dieta alcohólica más colesterol se observó una esteatosis mixta, en la cual se observa mayor desorden del parénquima hepático en comparación con los ratones tratados con la dieta control. Cabe mencionar que en este grupo se encontró mayor infiltrado inflamatorio en las áreas correspondientes al sinusoides. Por otro lado, la dieta alcohólica *per se* promueve el desarrollo de una esteatosis microvesicular en hembras, mismo efecto que fue observado en machos. Para corroborar la sobrecarga de lípidos en el tejido hepático, se determinó la concentración de colesterol y triglicéridos en tejido. En la figura 14B se observa que la adición de colesterol a las dietas líquidas, aumenta hasta siete veces la concentración de este lípido respecto al grupo control. La dieta alcohólica, al igual que en machos, incrementó los niveles de colesterol, aunque de acuerdo con el análisis estadístico realizado, dicho incremento no fue estadísticamente significativo. En el grupo tratado con alcohol más colesterol se observó un incremento significativo en la concentración de triglicéridos (figura 14C), fenómeno que no fue observado en machos. De esta forma, el incremento en la concentración de colesterol y triglicéridos encontrada en ratones hembra tratadas con alcohol más colesterol, corrobora lo observado en la histología hepática del mismo grupo.



*Figura 14: La dieta alcohólica suplementada con colesterol provoca esteatosis hepática en hembras. Se observó que, a diferencia de los machos, la adición de colesterol provoca acumulación de lípidos en hígado, sin embargo, este fenómeno fue también observado en el cotratamiento de alcohol más colesterol. B) Cuantificación de colesterol total en hígado de ratones hembra. C) Cuantificación de triglicéridos en tejido hepático de hembras. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol, PC: Dieta Western. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,*

Dado que el consumo de dietas altas en colesterol está asociado con hipercolesterolemia (aumento de colesterol en sangre), lo cual puede predisponer al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y promover un daño sistémico, decidimos evaluar los niveles de colesterol en suero de los diferentes grupos

experimentales. Sorprendentemente, la dieta alta en colesterol no promovió el incremento de este lípido en suero de ratones macho, sin embargo, el cotratamiento sí provoca un incremento en la concentración sérica de colesterol, lo cual pudiera sugerir la incapacidad del hígado para el manejo de lípidos debido al daño hepático inducido por el cotratamiento (figura 15A). Por otro lado, a diferencia de los machos, la dieta alta en colesterol dejó un incremento significativo en la concentración de este lípido en suero. Opuesto a lo observado en machos, el cotratamiento no incrementó los niveles de colesterol sérico en ratones hembra (figura 15B). Cabe mencionar que la dieta alta alcohólica no tuvo efectos sobre la concentración sérica de colesterol tanto en machos como hembras.

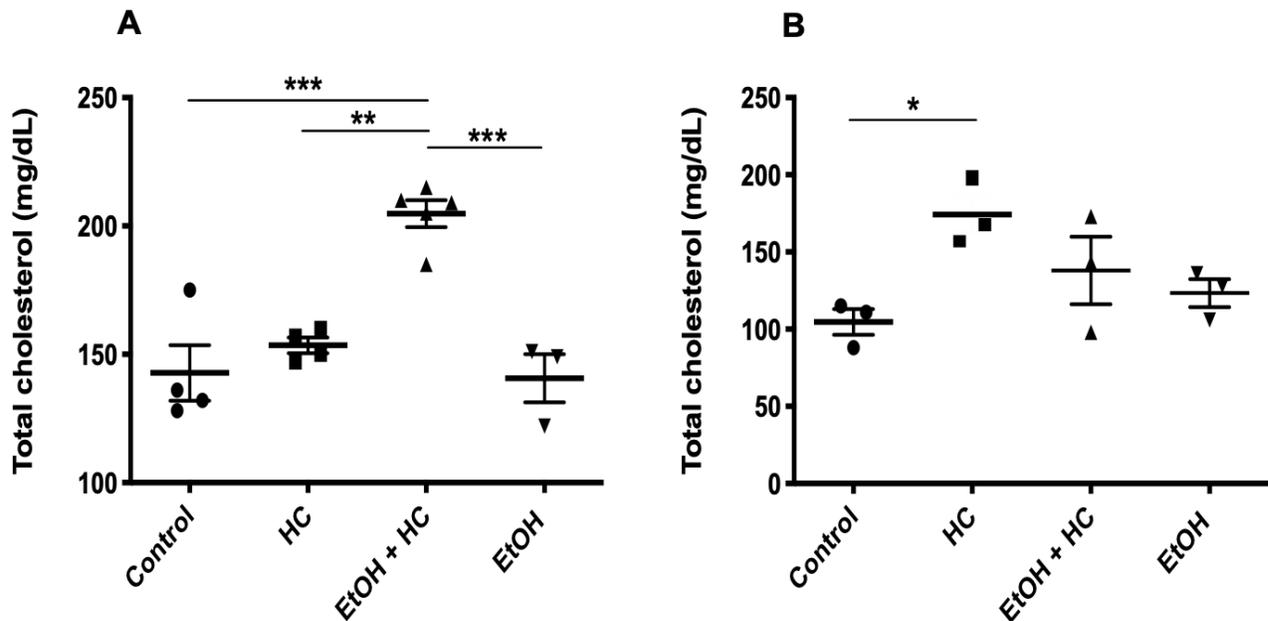


Figura 15: La dieta alta en colesterol provoca una hipercolesterolemia de manera diferencial entre machos y hembras. A) Concentración sérica de colesterol en machos. B) Concentración sérica de colesterol en hembras. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Con la finalidad de comparar los datos obtenidos de pruebas de función hepática y otros valores bioquímicos entre machos y hembras, se realizó un análisis de agrupamiento. Los datos obtenidos en las pruebas ya mencionadas fueron normalizados mediante el Z-score para obtener una unidad tipificada, con el objetivo de comparar datos entre los diferentes géneros, machos y hembras. Con los datos obtenidos en la normalización, se realizó un mapa de calor (heat map) con dendograma, con la finalidad de observar que género presentó mayor compromiso hepático durante los diferentes tratamientos. Después de la normalización, los valores del Z-score por debajo de la media fueron representados con color verde, por otro lado, los valores por arriba de la media fueron representados con color rojo, a mayor distancia de la media de un parametro, el color se intensificó hacia el verde o rojo, de acuerdo con el valor bioquímico. Finalmente, los valores cercanos a la media de cada parámetro, fueron representados con color negro.

En la figura 16 se observa de forma clara que, las hembras presentaron mayor sobrecarga de lípidos en tejido hepático, datos que coinciden con el análisis histológico, particularmente cuando son tratadas con alcohol más colesterol, Es de notarse que los niveles de AST fueron más elevados en hembras respecto a los machos. Por otro lado, se observó que la dieta alcohólica y el cotratamiento incrementaron los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y ALT, comparado con hembras ante los mismos tratamientos.

De esta forma, observamos claramente que, las hembras presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar esteatosis hepática debida al cotratamiento, de igual

manera, los machos desarrollan un mayor daño necrótico, a juzgar por el valor de ALT encontrado cuando fueron tratados con la dieta alcohólica más colesterol.

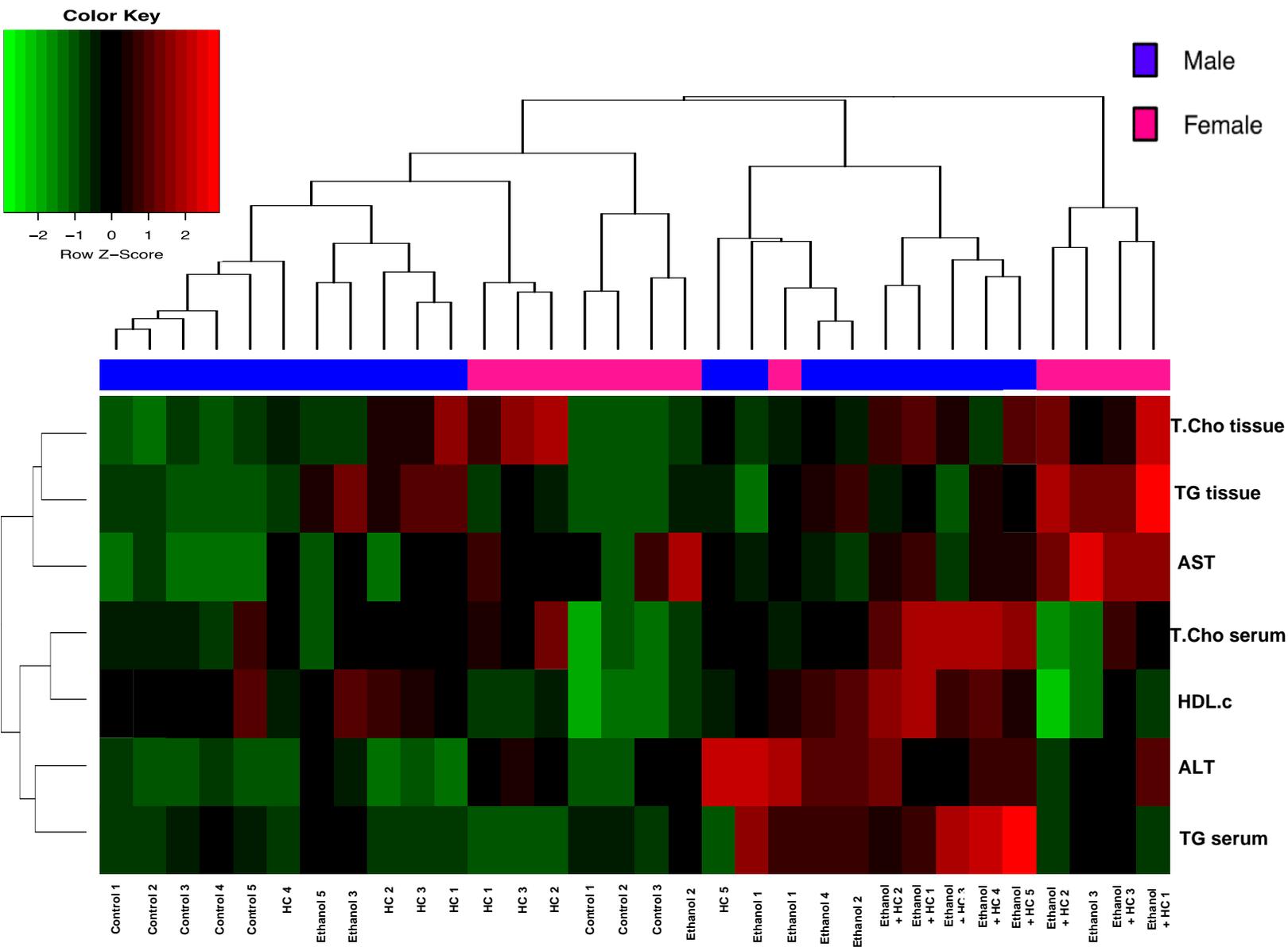


Figura 16: Heatmap de datos bioquímicos y de pruebas de función hepática. La escala de color indica el rango de cada dato de las determinaciones bioquímicas.

Una de las principales consecuencias de la sobrecarga de colesterol a nivel hepático es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Mari, 2006), efecto que también es provocado por el etanol y su metabolismo. Debido a esto, se evaluó la oxidación de lípidos, como un efecto provocado por el incremento de las ERO en machos. La oxidación de lípidos fue evaluada por la reacción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Sorprendentemente, la sobrecarga de colesterol hepático inducido por la dieta alta en colesterol, y la dieta alcohólica, no generaron un incremento en la oxidación de lípidos (figura 17A). Debido a este resultado, decidimos evaluar algunas proteínas encargadas de la detoxificación de las ERO. Se determinó el contenido de proteínas antioxidantes mediante Western blot. La figura 17B muestra que la dieta alta en colesterol y el cotratamiento, incrementan el contenido proteico de la cisteína-glutamato ligasa (GCS), primer enzima involucrada en la síntesis de GSH, lo cual sugiere que dichos tratamientos demandan la síntesis de este antioxidante endógeno. Por otro lado, la GSH-S transferasa (GST), enzima encargada en reacciones de conjugación en reacciones de fase II para la eliminación de xenobióticos, se incrementó de forma significativa por el tratamiento de alcohol y la adición de colesterol a éste. Finalmente, los diferentes tratamientos, no afectaron el contenido proteico de la superóxido dismutasa 2 y la glutatión peroxidasa 1 y 2 respecto al control. De esta forma, se observa claramente que los tratamientos experimentales promueven el incremento y uso del GSH como mecanismo de protección y detoxificación, lo cual puede responder el por qué no encontramos diferencia en el ensayo de oxidación de lípidos por TBARS (figura 17A).

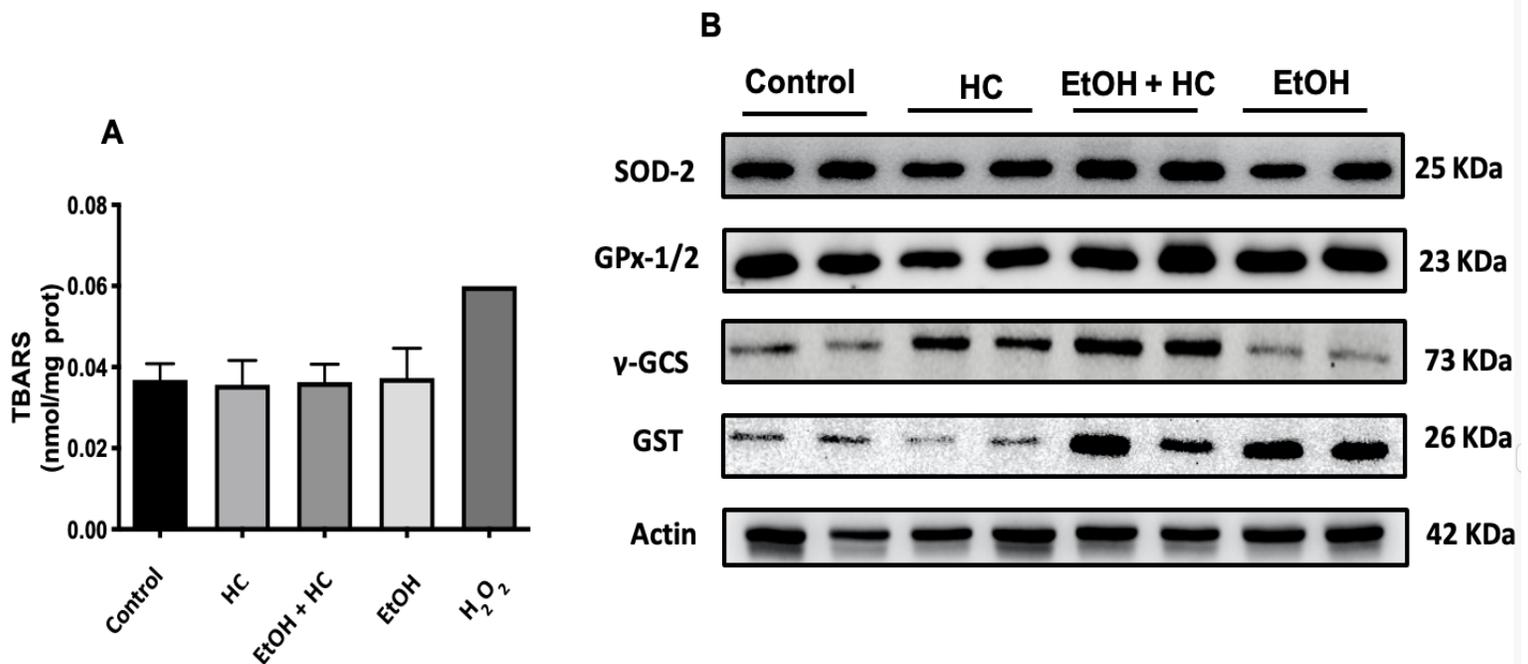


Figura 17: El tratamiento de alcohol más colesterol promueve la síntesis y uso del GSH. A) Ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), muestra ninguno de los tratamientos promueve un incremento en la oxidación de lípidos. B) Contenido proteico de enzimas antioxidantes. La actina fue usada como control de carga. HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol.

Bajo condiciones de estrés, una célula puede activar mecanismos de protección celular con el objetivo de disminuir el daño, sin embargo, cuando estos mecanismos de protección son superados, la célula activará mecanismos de muerte celular controlada, como la apoptosis, la cual minimiza el daño tisular, a diferencia de otro tipo de muerte, como la necrosis. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo y otros, hemos reportado recientemente, que el colesterol puede promover resistencia a la apoptosis por mecanismos que implican cambios en la dinámica mitocondrial (Domínguez-Pérez, et al, 2019). Debido a esto se evaluó si los tratamientos con

alcohol, colesterol y/o la combinación de ambos promovían la apoptosis celular en las muestras de tejido hepático de ratones macho. En la figura 18A, se muestra la actividad de la caspasa 3, una enzima considerada como ejecutora de la apoptosis, sin embargo, observamos que los tratamientos no modificaron la actividad de esta enzima, lo cual sugiere que la apoptosis no es activada por ninguno de los tratamientos. Con el objetivo de conocer de una forma más detallada si los diferentes tratamientos pudieran estar impidiendo la apoptosis, se evaluó el contenido proteico de diversos factores involucrados en la apoptosis celular. En la figura 18B, se muestra el contenido de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas evaluadas por Western blot. Observamos que la dieta alcohólica, al margen del modelo NIAAA, provoca una disminución en el contenido de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, además del incremento de la proteína Bax, la cual tiene una función proapoptótica. Estos resultados, en conjunto con la actividad de la caspasa 3, sugieren que aunque la dieta alcohólica no provoca muerte celular por apoptosis, puede sensibilizar al hígado para que ésta se lleve a cabo, muy probablemente, posterior a los tiempos evaluados. Por otro lado, encontramos que la adición de colesterol a las dietas líquidas no afecta la presencia de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL, lo cual sugiere que, en nuestro modelo, el colesterol está ejerciendo un efecto de protección a la muerte por apoptosis. Finalmente, la figura 18C muestra el cociente entre el contenido proteico de Bax y Bcl-2, en donde se aprecia claramente que la dieta alcohólica sensibiliza a la muerte por apoptosis, efecto que es prevenido por la adición de colesterol. Cabe mencionar que el cociente se realiza entre Bax y Bcl-2 por la interacción física que tienen ambas proteínas, además del papel antagónico de Bcl-2 sobre la actividad de Bax.

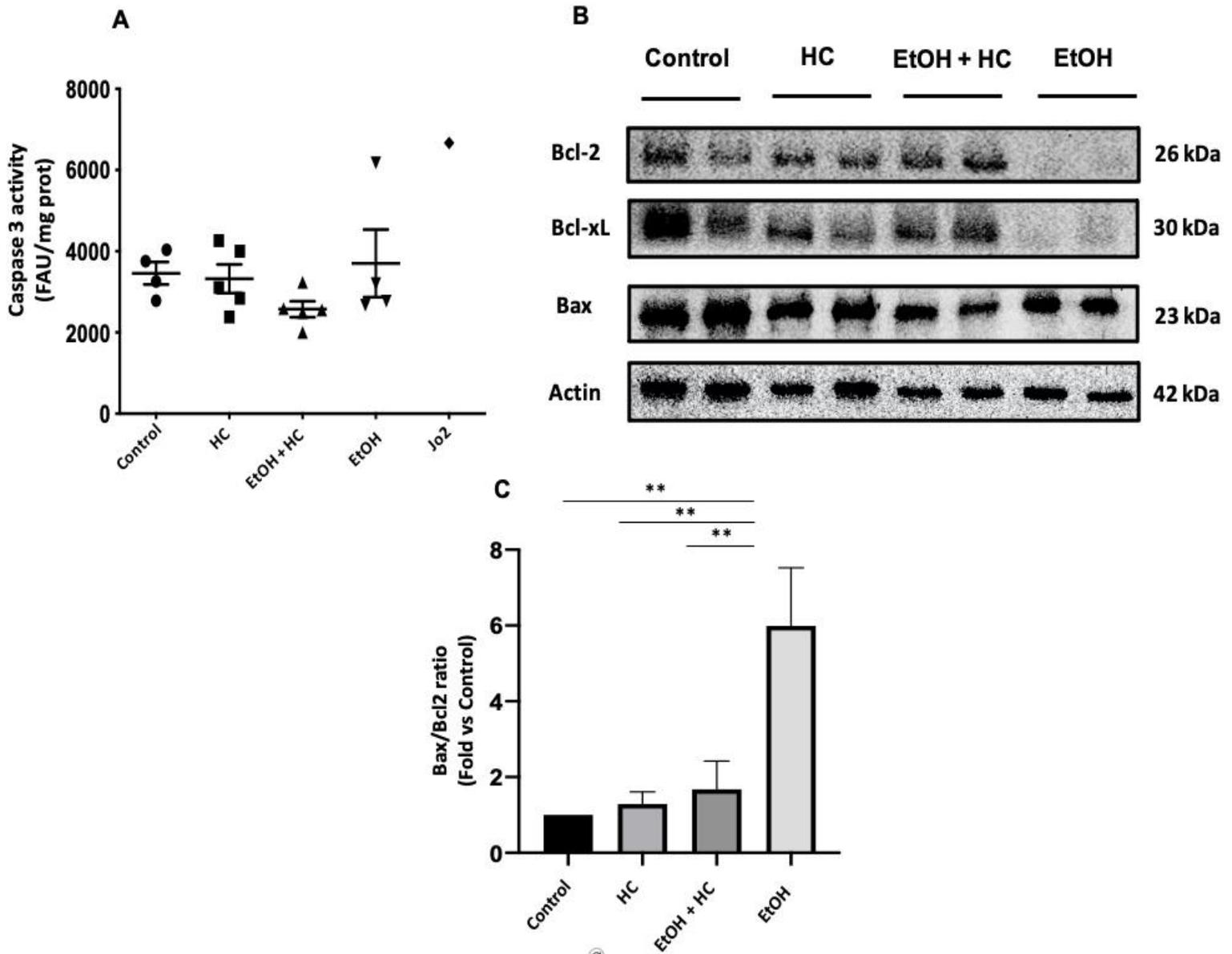


Figura 18: La sobrecarga de colesterol en tejido hepático inhibe la sensibilización a la apoptosis ejercida por el consumo crónico de etanol. A) Actividad de caspasa 3 en los diferentes grupos experimentales. Se utilizó una muestra de tejido hepático de un ratón tratado con Jo2 (300mg/kg) como control positivo de apoptosis. B) Contenido proteico de proteínas relacionados con la apoptosis, evaluadas mediante la técnica de Western blot. C) Cociente de Bax/Bcl-2, mostrando la sensibilidad a la apoptosis ejercida por los diferentes tratamientos experimentales HC: dieta alta en colesterol, EtOH: dieta alcohólica, EtOH + HC: dieta alcohólica más colesterol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

8- Discusión

El consumo crónico de alcohol es uno de los principales factores etiológicos de daño hepático en países a nivel mundial. Datos epidemiológicos sugieren que además de la cantidad y tipo de alcohol consumidos, las dietas altas en lípidos pueden promover el desarrollo de esteatosis hepática, entre otros problemas gastrointestinales (Seitz et al., 2018; Mitra et al., 2020). Como se mencionó previamente, otros grupos de investigación y el nuestro, hemos demostrado que más que la cantidad de lípido ingerido, es el tipo de lípido el que puede promover con mayor facilidad el desarrollo de la enfermedad hepática. En este sentido, se ha determinado que el colesterol provoca efectos inflamatorios, oxidantes y también funciona como un promotor de tumores (Domínguez-Pérez et al., 2019; Marí et al., 2006; López-Islas et al., 2016; Enríquez-Cortina et al., 2017; Simoni-Nieves et al., en preparación).

En este trabajo utilizamos uno de los modelos considerado como de los más adecuados para el estudio de los efectos del consumo crónico de alcohol en el inicio del daño hepático. Utilizando este modelo agregamos colesterol a este modelo con la finalidad de generar sobrecarga de este lípido en el hígado y así estudiar los efectos que tiene el alcohol y el colesterol cuando estos agentes coexisten en la dieta.

Nuestros datos muestran que en un ambiente con sobrecarga de colesterol, en un modelo de tratamiento crónico con alcohol provoca un mayor compromiso hepático en un modelo preclínico de estadio inicial de EHA. El modelo NIAAA ha sido utilizado ampliamente como un modelo de esteatohepatitis aguda, el cual permite

determinar el mecanismo de daño en el inicio de la enfermedad hepática alcohólica (Bertola et al., 2013; Ma et al., 2020; Xu et al., 2020). En este sentido, el modelo permite en el presente estudio caracterizar los efectos de la ingesta de alcohol en un ambiente con sobrecarga de colesterol. Existen en la literatura varios estudios en donde se ha reportado el efecto del alcohol y colesterol en combinación en modelos murinos, sin embargo, estos reportes muestran los efectos de estos tóxicos en modelos crónicos de al menos cinco semanas de tratamiento, en donde se describe como la combinación de ambos agentes en combinación, aceleran la progresión de la EHA, precipitando el desarrollo de estadios más avanzados de la enfermedad como la inflamación, la fibrosis y el carcinoma hepatocelular (Ma et al., 2020; Li et al., 2019; Li et al., 2016; Krishnasamy et al., 2016). Nuestro trabajo permite caracterizar la fase inicial del daño hepático inducido por el alcohol y el colesterol, identificar marcadores tempranos de la enfermedad y conocer mecanismos por los cuales el colesterol puede agravar los efectos del alcohol. Por otro lado, debido a la respuesta diferencial de los efectos del consumo de alcohol entre hombres y mujeres, se consideró relevante evaluar la diferencia entre ratones de diferente sexo en nuestro modelo preclínico.

Observamos que, la adición de alcohol y colesterol a las dietas Lieber-DeCarli comercial no afectó el consumo de las dietas líquidas, las cuales son isocalóricas, lo que permite evaluar los efectos del alcohol y no de las calorías que ésta sustancia proporciona. Por otro lado, el colesterol al ser un lípido sin aporte calórico, nos permite evaluar los efectos de este en un contexto de toxicidad. Algunos trabajos experimentales reportan que la administración crónica de alcohol disminuye el consumo de la dieta (Guillot et al., 2019; Kwon et al., 2014). En contraste, la adición

de estos agentes no afectó el consumo en nuestro modelo, como ha sido reportado previamente (Li et al., 2019). Este fenómeno puede explicarse debido al tiempo de tratamiento del diseño experimental. Algunos trabajos muestran que el acetaldehído, y no el etanol, es la sustancia que provoca aversión al consumo de alcohol (Neumark et al., 2004; Guillot et al., 2019). En nuestro modelo, el tiempo y la cepa de los ratones (ALDH2^{+/+}) evitan la acumulación del acetaldehído, por lo cual el efecto de aversión a la dieta alcohólica no es observado, fenómeno que si fue observado en el diseño experimental con disulfiram (datos no mostrados), fármaco que inhibe la actividad de la ALDH y por tanto aumenta los niveles de acetaldehído de forma sistémica. De igual forma, los diferentes tratamientos no afectaron el peso corporal de los ratones en ambos géneros como se muestra en la figura 7. Este resultado concuerda con lo reportado por Li y col (2019), en donde un tratamiento con alcohol, o colesterol, y la combinación de ambos durante cinco semanas no afectó el peso corporal en ratones de la cepa ICR (Li et al., 2019). Así mismo, las diferentes dietas no afectaron el cociente entre el peso del hígado y el peso corporal del ratón, como se observa en las figuras 9 y 10. Está reportado que el alcohol acelera el transporte reverso del colesterol y de su excreción a través de la vía biliar, lo que es utilizado por el sistema como un mecanismo de protección para evitar la acumulación de dicho lípido en el hígado (Li et al., 2016). Por otro lado, la misma sobrecarga de colesterol promueve una inhibición en genes responsables de la síntesis de ácidos biliares, aunque dicho efecto ha sido atribuido al colato de sodio (Solsona-Vilarrasa et al., 2019; Enríquez-Cortina et al., 2017), compuesto que usualmente acompaña al colesterol en diferentes dietas comerciales, por lo tanto el incremento en el peso del hígado observado por Domínguez-Pérez y colaboradores,

puede deberse a la inhibición en la eliminación del colesterol del hígado a través de la vía biliar que promueve el colato de sodio, y no necesariamente al colesterol. Cabe mencionar que en nuestro trabajo, no se agregó colato de sodio a las dietas líquidas, lo cual puede explicar la ausencia en la ganancia de peso del órgano.

En la figura 8 se muestra como el cotratamiento con alcohol y colesterol promueve la muerte prematura de los ratones, tanto en machos como en hembras. Recientemente, otro grupo de investigación reportó los mismos datos que nuestro grupo, donde indican que, en el modelo NIAAA, la dieta alcohólica induce un 20% de mortalidad en ratones macho (Luther et al., 2020), este efecto no fue observado en hembras, esto puede deberse a la diferencia en el número de animales ocupados en el estudio, ya que en machos se tuvo una n de cinco ratones y en hembras una n de tres.

Posteriormente, realizamos una evaluación histológica con el objetivo de conocer cómo los diferentes tratamientos pudieran afectar la arquitectura del parénquima hepático. Observamos que la adición de colesterol a la dieta líquida control indujo una esteatosis microvesicular y alteraciones en el parénquima hepático, la cual fue más notoria en hembras respecto a machos, como se muestra en las figuras 11 y 14. La dieta alcohólica promovió una esteatosis microvesicular y alteraciones en el parénquima hepático tanto en machos como en hembras. Por otro lado, la combinación de alcohol y colesterol provocó un desarreglo del parénquima hepático y la presencia de células inflamatorias a lo largo del campo observado, en hembras se observó una esteatosis mixta, mayor desorden del parénquima hepático y presencia de infiltrado inflamatorio a lo largo del campo observado, sugiriendo que en hembras la sobrecarga de lípidos en el tejido hepático es mayor. A pesar de que

en el presente trabajo no se caracterizó el infiltrado inflamatorio, múltiples reportes en la literatura muestran que el tratamiento con alcohol promueve el reclutamiento de neutrófilos como primer mecanismo de eliminación de células dañadas y de patógenos. Sin embargo, en modelos crónicos ha sido reportado que los principales tipos celulares de carácter inflamatorio son en primer lugar los macrófagos y después los neutrófilos (Gao et al., 2019; Gao & Tsukamoto, 2016; Ren et al., 2020; Chang et al., 2015). Debido a la naturaleza del modelo NIAAA, y a la morfología de las células inflamatorias en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, se sugiere que las células del infiltrado inflamatorio podrían ser neutrófilos.

Con la finalidad de corroborar el tipo de lípido que el hígado almacenó en respuesta a los tratamientos, se consideró importante determinar la concentración de colesterol total y triglicéridos tanto en machos como en hembras. Los resultados muestran que la adición de colesterol a la dieta control y alcohólica incrementó la cantidad de este lípido en tejido hepático tanto en machos como hembras. Por otro lado, el consumo crónico de alcohol no mostró incremento significativo respecto al grupo control. Al evaluar la concentración de triglicéridos, encontramos un efecto diferencial entre géneros. Observamos que en ratones macho la concentración de triglicéridos incrementó solo en el tratamiento con la dieta alta en colesterol, efecto que no fue observado en hembras, por otro lado el cotratamiento provocó un notable aumento de triglicéridos, como se aprecia en la histología hepática. El incremento en la concentración de triglicéridos en machos debido al tratamiento con la dieta alta en colesterol, correlaciona con una disminución en la concentración de triglicéridos en suero (figura 12D), lo cual sugiere que el incremento de este lípido, más que por lipogénesis *de novo*, podría ser por el transporte de triglicéridos al hígado, esto con

el objetivo de esterificar al colesterol y disminuir los efectos tóxicos del colesterol libre (Marí et al., 2006; Marí et al., 2014).

Como se muestra en la figura 12, el tratamiento con colesterol tanto con la dieta control como en la alcohólica, provocó un incremento significativo en la AST a nivel sérico. Al evaluar la actividad en suero de la ALT, un marcador más específico de daño hepático, encontramos que la dieta alcohólica y el cotratamiento con colesterol incrementa de forma significativa los niveles de la ALT sérica. Estos datos sugieren que la adición de colesterol a la dieta alcohólica promueve mayor compromiso hepático, como ha sido reportado recientemente (López-Islas et al., 2016; Krishnasamy et al., 2016).

Al realizar un análisis de agrupamiento y la generación de un heat map (figura 16), encontramos que el cotratamiento en ratones hembra promueve una mayor acumulación de lípidos en el tejido hepático respecto a los ratones macho. Por otro lado, el gráfico sugiere que el co-tratamiento en machos promueve mayor compromiso hepático, a juzgar por un mayor incremento en las transaminasas, particularmente en la ALT. Debido a esta razón, decidimos evaluar mediante Western blot, el contenido proteico de enzimas relacionadas al sistema antioxidante y proteínas relacionadas con la muerte celular por apoptosis en ratones macho.

Dado que está reportado que el colesterol, el alcohol y su metabolito, el acetaldehído, incrementan las ERO y generan daño oxidante en el hepatocito, se evaluó la oxidación de lípidos a través del ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, como primer efecto del estrés oxidante (Arauz et al., 2016.). Como se observa en la figura 17A, curiosamente, ninguno de los tratamientos aumentó la concentración de lípidos oxidados. Debido a este resultado, decidimos evaluar el

contenido proteico de enzimas relacionadas con la detoxificación de ERO. Encontramos que los diferentes tratamientos no aumentaron el contenido de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD-2) y la glutatión peroxidasa 1 y 2, las cuales se encargan del manejo del anión superóxido y del peróxido de hidrogeno respectivamente (Gallardo et al., 2014), lo cual indica que en nuestro modelo, al finalizar los tratamientos, no hay un incremento en estas ERO. Sin embargo, cabe mencionar que para tener un mecanismo completo sobre el control de las ERO, se debe evaluar la actividad enzimática de estas proteínas. Por otro lado, al evaluar el contenido proteico de enzimas relacionadas con la síntesis del glutatión, el principal antioxidante endógeno de la célula, encontramos que tanto el colesterol como el cotratamiento aumentaron de forma significativa el contenido de la gamma-glutamylcisteína sintasa (γ -GCS), lo cual sugiere que ambos tratamientos provocan una demanda en la síntesis del glutatión, quizá por un aumento de agentes oxidantes, como lo reportamos previamente (Nuño-Lámbarki et al., 2016; Rosales-Cruz et al., 2018). Cabe mencionar que el tratamiento solo con la dieta alcohólica no promovió la síntesis del glutatión al finalizar el tratamiento, sin embargo, sería interesante evaluar el contenido proteico de esta enzima en tiempos más tempranos, con la finalidad de evaluar si en algún momento del tratamiento el consumo de la dieta alcohólica provoca una demanda en la síntesis del glutatión. Por otra parte, la glutatión S-transferasa es una enzima que participa en reacciones de conjugación de fase II para la detoxificación de xenobióticos a través de catalizar la conjugación del glutatión con moléculas hidrofóbicas para su fácil eliminación (Gallardo et al., 2014). Encontramos que el tratamiento con alcohol de forma crónica, y la adición de colesterol a la dieta alcohólica, promueven un

incremento significativo en el contenido proteico de la glutatión S-transferasa (GST), sugiriendo que a pesar de los tratamientos el sistema de detoxificación de fase II por la GST aún funciona de forma correcta por lo menos hasta el tiempo del sacrificio de los ratones. Cabe mencionar que recientemente reportamos que el colesterol promueve un aumento en la GST (Domínguez-Pérez et al., 2019), sin embargo, en este trabajo encontramos que en la dieta alta en colesterol no incrementó el contenido proteico de esta enzima, esto puede deberse a las diferencias en el tiempo de tratamiento con colesterol. Estos datos sugieren que los tratamientos promueven la síntesis y uso del glutatión para la detoxificación de productos originados por agentes oxidantes generados por el colesterol y el alcohol, esto explica la ausencia en la oxidación de lípidos, como se observa en la figura 17A.

Dado que la muerte celular es un evento clave en el daño por alcohol; además, recientemente se ha reportado que el colesterol puede modular este fenómeno, decidimos evaluar la muerte celular por apoptosis (Ribas et al., 2014; Naghdi et al., 2018; Marí et al., 2009). El primer ensayo que realizamos fue medir la actividad de la caspasa 3, un ejecutor canónico de la apoptosis intrínseca y extrínseca. Observamos que a diferencia de la literatura, el tratamiento con alcohol no promovió la muerte celular por apoptosis, ya que los valores de la actividad de caspasa 3 fueron similares en todos los grupos experimentales. Este resultado concuerda con lo reportado recientemente por nuestro grupo, en donde encontramos que el colesterol, a pesar de ser un lípido tóxico, no promueve un incremento en la actividad de la caspasa 3 (Domínguez-Pérez et al., 2019).

Posteriormente, evaluamos algunos marcadores canónicos de la apoptosis a través de ensayos de Western blot. Encontramos que los ratones alimentados con la dieta

alcohólica disminuyeron de forma significativa su contenido de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, las cuales se encargan de impedir la salida de componentes pro apoptóticos de la mitocondria, sin embargo, a pesar de esta disminución en ambas proteínas, no encontramos diferencia en la proteína proapoptótica Bax. Dado que, al determinar la actividad de la caspasa 3, no encontramos diferencias entre los diferentes tratamientos, evaluamos el contenido proteico de la proteína Mcl-1, la cual también posee funciones antiapoptóticas y compensa la función de Bcl-2 cuando esta proteína está ausente, sin embargo, no encontramos presencia de Mcl-1 en nuestros diferentes grupos experimentales (dato no mostrado), lo cual sugiere que en nuestro modelo, Mcl-1 no participa en la muerte celular programada. Debido a estos datos, proponemos que el tratamiento crónico con alcohol no promueve la muerte celular por apoptosis en nuestro modelo, sin embargo, si hay una sensibilización a este evento, como puede observarse por el cociente entre el contenido proteico de Bax/Bcl-2 (figura 18C).

Por otra parte, se observó claramente que la adición de colesterol a la dieta alcohólica evitó la disminución de proteínas antiapoptóticas, lo cual sugiere que el colesterol evita la muerte celular por apoptosis, un fenómeno que ha sido estudiado en los últimos años (El Bassat et al., 2014; García-Ruiz et al., 2016; Garcia-Ruiz et al., 2009). Como se ha reportado, la sobrecarga de colesterol en hígado, particularmente en los hepatocitos, promueve que este lípido sea transportado a la mitocondria, en donde provoca un cambio en la dinámica mitocondrial y en el potencial de membrana, lo cual impide, ante ciertos estímulos, la salida al citosol de componentes apoptóticos (García-Ruiz et al., 2016; Domínguez-Pérez et al., 2019; Rosales-Cruz et al., 2018). Este resultado es distinto a lo encontrado en otros

trabajos con los mismos tratamientos, en donde algunos grupos de investigación reportaron que la adición de colesterol a una dieta alcohólica incrementa la muerte celular por apoptosis, sin embargo, la principal diferencia con estos reportes radica en el tiempo de tratamiento, debido a que dichos grupos trabajaron con tratamientos crónicos de 5 y 8 semanas. Cabe mencionar que, al igual que nosotros, dichos grupos también encontraron un aumento en la actividad sérica de las transaminasas en el cotratamiento de alcohol y colesterol, lo cual refuerza el daño hepático promovido por estos agentes cuando coexisten, además de que sugiere que en modelos crónicos la muerte celular se da por apoptosis y necrosis (Krishnasamy et al., 2016; Li et al., 2019). En nuestro modelo, se sugiere que la adición de colesterol a las dietas líquidas promueve una respuesta celular adaptativa, la cual evita la muerte celular, empero, este evento de adaptación puede evitar la muerte de células provocada por el daño ejercido por el alcohol, y particularmente por el acetaldehído sobre el DNA, lo cual podría culminar en la carcinogénesis del hígado (Enríquez-Cortina et al., 2017; García-Ruiz et al., 2016; Simoni-Nieves et al., en preparación).

9- Conclusiones

Como se demostró en este trabajo, nuestros datos sugieren que la sobrecarga de colesterol en hígado promueve mayor sensibilización a los efectos tóxicos del alcohol, aumentando la necrosis hepática en ratones macho y la carga de lípidos, particularmente en hembras.

El sistema antioxidante se eleva por efecto del alcohol, el colesterol y la presencia de ambos agentes. El tratamiento con colesterol incrementa los niveles proteicos de

enzimas relacionadas con la síntesis de glutatión, lo cual sugiere que el colesterol incrementa los niveles de oxidantes. Por otro lado, el cotratamiento con alcohol y colesterol promueve el incremento de enzimas relacionadas con la síntesis de glutatión y la destoxificación de xenobióticos mediante enzimas de fase II, como la GST, enzima encargada de la eliminación de xenobióticos mediante la conjugación de estos con el glutatión.

El tratamiento crónico con alcohol sensibiliza al hígado a la apoptosis, sin embargo, este efecto es inhibido por la adición de colesterol a la dieta, lo cual corrobora datos previos de nuestro grupo y otros, mostrando que el colesterol promueve resistencia a la apoptosis. Este fenómeno puede promover mayor compromiso hepático, al evitar que los hepatocitos dañados por el alcohol mueran de forma controlada y así evitar el daño tisular.

Profundizar en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de como el colesterol agrava los efectos del consumo de alcohol es el siguiente acercamiento para identificar posibles blancos de diagnóstico y terapéuticos que ayuden a contrarrestar los efectos del consumo crónico de alcohol.

10- Referencias

Aguilar-Bravo, B., Rodrigo-Torres, D., Ariño, S., Coll, M., Pose, E., Blaya, D., Graupera, I., Perea, L., Vallverdú, J., Rubio-Tomás, T., Dubuquoy, L., Armengol, C., Lo Nigro, A., Stärkel, P., Mathurin, P., Bataller, R., Caballería, J., José Lozano, J., Ginès, P., & Sancho-Bru, P. (2019). Ductular Reaction Cells Display an Inflammatory Profile and Recruit Neutrophils in Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*, 69(5), 2180–2195, doi: 10.1002/hep.30472.

Arauz, J., Ramos-Tovar, E., & Muriel, P. (2016.). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol*, 15(2), 160-173, doi: 10.5604/16652681.1193701.

Argemi, J., Latasa, M. U., Atkinson, S. R., Blokhin, I. O., Massey, V., Gue, J. P., Cabezas, J., Lozano, J. J., Van Booven, D., Bell, A., Cao, S., Verneti, L. A., Arab, J. P., Ventura-Cots, M., Edmunds, L. R., Fondevilla, C., Stärkel, P., Dubuquoy, L., Louvet, A., Bataller, R. (2019). Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nature Communications*, 10(1), 3126, doi: 10.1038/s41467-019-11004-3.

Avila, M. A., Dufour, F., Gerbes, A. L., Zoulim, F., Bataller, R., Burra, P., Cortez, H., Gao, B., Gilmore, I., Mathurin, P., Moreno, C., Poznyak, V., Schnabl, B., Szabo, G., Thiele, M., & Thursz, M. R. (2019). Recent advances in alcohol-related liver disease (ALD): Summary of a Gut round table meeting. *Gut*, 17, 69(4): 764-780, doi: 10.1136/gutjnl-2019-319720.

Beier, J. I., & Arteel, G. E. (2010). Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *Comprehensive Toxicology*, 9, 421-435, doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.01017-4.

Bertola, A., Mathews, S., Ki, S. H., Wang, H., & Gao, B. (2013). Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature Protocols*, 8(3), 627–637. doi: 10.1038/nprot.2013.032.

Brar, G. (2019). Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: Global perspective and emerging science. *J Gastroenterol*, 8, 54(3): 218-225, doi: 10.1007/s00535-018-01542-w.

Ceccaldi, R., Sarangi, P., & D’Andrea, A. D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 337–349, doi: 10.1038/nrm.2016.48

Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667–685, doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002.

Chang, B., Xu, M.-J., Zhou, Z., Cai, Y., Li, M., Wang, W., Feng, D., Bertola, A., Wang, H., Kunos, G., & Gao, B. (2015). Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice: An important role for CXCL1. *Hepatology*, 62(4), 1070–1085, doi: 10.1002/hep.27921.

Chen, C.-H., Ferreira, J. C. B., Gross, E. R., & Mochly-Rosen, D. (2014). Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiological Reviews*, *94*(1), 1–34, doi: 10.1152/physrev.00017.2013.

Clavijo-Cornejo, D., Gutiérrez-Carrera, M., Palestino-Domínguez, M., Dominguez-Perez, M., Nuño, N., Souza, V., Miranda, R. U., Kershenobich, D., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio, L., & Gómez-Quiroz, L. E. (2014). Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery. *Food and Chemical Toxicology*, *69*, 102–108, doi: 10.1016/j.fct.2014.04.002.

Cooley, M. M., & Groblewski, G. E. (2020). Alcohol-Induced Pancreatitis: A Critical Role for TFEB in Maintaining Lysosomal Biogenesis and Autophagic Clearance. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *10*(1), 199–200, doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.03.003.

Domínguez-Pérez, M., Simoni-Nieves, A., Rosales, P., Nuño-Lámbardi, 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. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 7213–7223, doi: 10.1002/jcp.27474.

El Bassat, H., Ziada, D. H., Hasby, E. A., Nagy, H., & Abo Rya, M. H. (2014). Apoptotic and anti-apoptotic seromarkers for assessment of disease severity of non-alcoholic steatohepatitis. *Arab Journal of Gastroenterology*, *15*(1), 6–11, doi: 10.1016/j.ajg.2014.01.009.

El-Din El-Sayed El-Sisi, A., Salim Sokar, S., & Zakaria Mohamed, D. (2019). Current Therapeutic Strategies for Alcoholic Liver Disease. In *Dietary Interventions in Liver Disease*. 15-30 Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-8144466-4.00002-1.

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, doi: 10.18632/oncotarget.22024

Farfán Labonne, B. E., Gutiérrez, M., Gómez-Quiroz, L. E., Konigsberg Fainstein, M., Bucio, L., Souza, V., Flores, O., Ortíz, V., Hernández, E., Kershenobich, D., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2009). Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biology and Toxicology*, *25*(6), 599–609, doi: 10.1007/s10565-008-9115-5

Gallardo, B., Camacho, M., Robles, V., Celis, A., & Partida, H. (2014). Estrés oxidante: El sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, *15*(1), 2–8, doi: 10.1016/j.cc.2015.06.002.

Galli, A., Pinaire, J., Fischer, M., Dorris, R., & Crabb, D. W. (2001). The Transcriptional and DNA Binding Activity of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Is Inhibited by Ethanol Metabolism: A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 68–75, doi: 10.1074/jbc.M008791200.

Gallina, I., & Duxin, J. P. (2020). A safe fix for alcohol-derived DNA damage. *Nature*, 579(7800), 499–500, doi: 10.1038/d41586-020-00462-1.

Gao, B., Ahmad, M. F., Nagy, L. E., & Tsukamoto, H. (2019). Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 70(2), 249–259, doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.023.

Gao, B., & Bataller, R. (2011). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology*, 141(5), 1572–1585, doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.002.

Gao, B., & Tsukamoto, H. (2016). Inflammation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Gastroenterology*, 150(8), 1704–1709, doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.025.

Garcia-Ruiz, C., Mari, M., Colell, A., Morales, A., Caballero, F., Montero, J., Terrones, O., Basañez, G., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol*, 24(1):117-32, doi: 10.14670/HH-24.117.

García-Ruiz, C., Ribas, V., Baulies, A., & Fernández-Checa, J. C. (2016). Mitochondrial Cholesterol and the Paradox in Cell Death. In H. Singh & S.-S. Sheu (Eds.), *Pharmacology of Mitochondria*. 240: 189-210. Springer International Publishing, doi: 10.1007/164_2016_110

Guillot, A., Ren, T., Jourdan, T., Pawlosky, R. J., Han, E., Kim, S.-J., Zhang, L., Koob, G. F., & Gao, B. (2019). Targeting liver aldehyde dehydrogenase-2 prevents heavy but not moderate alcohol drinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51), 25974–25981, doi: 10.1073/pnas.1908137116.

Guo, R., & Ren, J. (2010). Alcohol and Acetaldehyde in Public Health: From Marvel to Menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1285–1301, doi: 10.3390/ijerph7041285

Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio, L., Correa, A., Souza, V., Hernández, E., Gómez-Quiroz, L. E., & Kershenovich, D. (2001). Metadoxine prevents damage produced by ethanol and acetaldehyde in hepatocyte and hepatic stellate cells in culture. *Pharmacological Research*, 44(5), 431–436, doi: 10.1006/phrs.2001.0883.

Hernández, I., Domínguez-Pérez, M., Bucio, L., Souza, V., Miranda, R. U., Clemens, D. L., Gomez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2015). Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an in vitro model. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 109–115, doi: 10.1016/j.fct.2014.12.005.

Hernández-Aquino, E., Zarco, N., Casas-Grajales, S., Ramos-Tovar, E., Flores-Beltrán, R. E., Arauz, J., Shibayama, M., Favari, L., Tsutsumi, V., Segovia, J., & Muriel, P. (2017). Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGF β -Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(24), 4354, doi: 10.3748/wjg.v23.i24.4354.

Hernández-Quiroz, F., Nirmalkar, K., Villalobos-Flores, L. E., Murugesan, S., Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Hoyo-Vadillo, C., Chavez-Carbajal, A., Pizano-Zárate, M. L., & García-Mena, J. (2020). Influence of moderate beer consumption on human gut microbiota and its impact on fasting glucose and β -cell function. *Alcohol*, *85*, 77–94, doi: 10.1016/j.alcohol.2019.05.006.

Hodskinson, M. R., Bolner, A., Sato, K., Kamimae-Lanning, A. N., Rooijers, K., Witte, M., Mahesh, M., Silhan, J., Petek, M., Williams, D. M., Kind, J., Chin, J. W., Patel, K. J., & Knipscheer, P. (2020). Alcohol-derived DNA crosslinks are repaired by two distinct mechanisms. *Nature*, *579*(7800), 603–608, doi: 10.1038/s41586-020-2059-5.

Hoyt, L. R., Randall, M. J., Ather, J. L., DePuccio, D. P., Landry, C. C., Qian, X., Janssen-Heininger, Y. M., van der Vliet, A., Dixon, A. E., Amiel, E., & Poynter, M. E. (2017). Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. *Redox Biology*, *12*, 883–896, doi: 10.1016/j.redox.2017.04.020.

Krishnasamy, Y., Ramshesh, V. K., Gooz, M., Schnellmann, R. G., Lemasters, J. J., & Zhong, Z. (2016). Ethanol and High Cholesterol Diet Causes Severe Steatohepatitis and Early Liver Fibrosis in Mice. *PLOS ONE*, *11*(9), doi: 10.1371/journal.pone.0163342.

Kwon, H.-J., Won, Y.-S., Park, O., Chang, B., Duryee, M. J., Thiele, G. E., Matsumoto, A., Singh, S., Abdelmegeed, M. A., Song, B.-J., Kawamoto, T., Vasiliou, V., Thiele, G. M., & Gao, B. (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology*, *60*(1), 146–157, doi: 10.1002/hep.27036.

Le Daré, B., Lagente, V., & Gicquel, T. (2019). Ethanol and its metabolites: Update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metabolism Reviews*, *51*(4), 545–561, doi: 10.1080/03602532.2019.1679169.

Li, B., Lei, S., Su, J., Cai, X., Xu, H., He, X., Chen, Y., Lu, H., Li, H., Qian, L., Zheng, X., Lv, G., & Chen, S. (2019). Alcohol Induces More Severe Fatty Liver Disease by Influencing Cholesterol Metabolism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2019*, 1–14, doi: 10.1155/2019/7095684.

Li, M., Diao, Y., Liu, Y., Huang, H., Li, Y., Tan, P., Liang, H., He, Q., Nie, J., Dong, X., Wang, Y., Zhou, L., & Gao, X. (2016). Chronic Moderate Alcohol Intakes Accelerate SR-B1 Mediated Reverse Cholesterol Transport. *Scientific Reports*, *6*(1), 33032, doi: 10.1038/srep33032.

Lieber, C. S., & DeCarli, L. M. (1982). The Feeding of Alcohol in Liquid Diets: Two

Decades of Applications and 1982 Update. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 6(4), 523–531, doi: 10.1111/j.1530-0277.1982.tb05017.x.

Lieber, C. S., & Decarli, L. M. (1989). Review liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol and alcoholism*, 24(3):197-211.

Lluis, J. M., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernández-Checa, J. C. (2003). Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology*, 124(3), 708–724, doi: 10.1053/gast.2003.50089

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, doi: 10.1155/2016/9209825.

Luther, J., Khan, S., Gala, M. K., Kedrin, D., Sridharan, G., Goodman, R. P., Garber, J. J., Masia, R., Diagacomo, E., Adams, D., King, K. R., Piaker, S., Reinecker, H.-C., Yarmush, M. L., Argemi, J., Bataller, R., Dienstag, J. L., Chung, R. T., & Patel, S. J. (2020). Hepatic gap junctions amplify alcohol liver injury by propagating cGAS-mediated IRF3 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11667–11673, doi: 10.1073/pnas.1911870117

Ma, H.-Y., Yamamoto, G., Xu, J., Liu, X., Karin, D., Kim, J. Y., Alexandrov, L. B., Koyama, Y., Nishio, T., Benner, C., Heinz, S., Rosenthal, S. B., Liang, S., Sun, M., Karin, G., Zhao, P., Brodt, P., Mckillop, I. H., Quehenberger, O., Kisseleva, T. (2020). IL-17 signaling in steatotic hepatocytes and macrophages promotes hepatocellular carcinoma in alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology*, 72(5), 946–959, doi: 10.1016/j.jhep.2019.12.016.

Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J. C., & García-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 4(3), 185–198, doi: 10.1016/j.cmet.2006.07.006.

Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2685–2700, doi: 10.1089/ars.2009.2695.

Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2014). Mitochondrial cholesterol accumulation in alcoholic liver disease: Role of ASMase and endoplasmic reticulum stress. *Redox Biology*, 3, 100–108, doi: 10.1016/j.redox.2014.09.005.

Mehta, G., & Sheron, N. (2019). No safe level of alcohol consumption – Implications for global health. *Journal of Hepatology*, 70(4), 587–589, doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.021.

Meroni, M., Longo, M., Rametta, R., & Dongiovanni, P. (2018). Genetic and Epigenetic

Modifiers of Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3857, doi: 10.3390/ijms19123857.

Mitra, S., De, A., & Chowdhury, A. (2020). Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 5, 16–16, doi: 10.21037/tgh.2019.09.08.

Muriel, P. (2017). The Liver. In Muriel, P. (Ed), *Liver Pathophysiology* (pp. 3–22). Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00001-1.

Muriel, P. (2019). Fighting liver fibrosis to reduce mortality associated with chronic liver diseases: The importance of new molecular targets and biomarkers. *EBioMedicine*, 40, 35–36, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.002.

Naghdi, S., Slovinsky, W. S., Madesh, M., Rubin, E., & Hajnóczky, G. (2018). Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism. *Cell Death & Disease*, 9(10), 1028, doi: 10.1038/s41419-018-1070-3.

Neumark, Y. D., Friedlander, Y., Durst, R., Leitersdorf, E., Jaffe, D., Ramchandani, V. A., Connor, S., Carr, L. G., & Li, T.-K. (2004). Alcohol Dehydrogenase Polymorphisms Influence Alcohol-Elimination Rates in a Male Jewish Population: *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 28(1), 10–14, doi: 10.1097/01.ALC.0000108667.79219.4D.

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., 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, doi: 10.1155/2016/9895176.

Olivares, I. P., Bucio, L., Souza, V., Cárabez, A., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (1997). Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology*, 120(2), 133–144, doi: 10.1016/S0300-483X(97)03650-0

Osna, N., Donohue, T., Kharbanda, K. (2017). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Research*, 38, 147-161.

Ren, T., Mackowiak, B., Lin, Y., Gao, Y., Niu, J., & Gao, B. (2020). Hepatic injury and inflammation alter ethanol metabolism and drinking behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 111070, doi: 10.1016/j.fct.2019.111070.

Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Arellanes-Robledo, J., Hernández-Nazara, Z., Rincón-Sánchez, A. R., Inagaki, Y., Rojkind, M., & Lakshman, M. R. (2014). Mechanisms of Action of Acetaldehyde in the up-regulation of the Human $\alpha 2(I)$ Collagen Gene in Hepatic Stellate Cells. *The American Journal of Pathology*, 184(5), 1458–1467, doi:

10.1016/j.ajpath.2014.01.020

Ribas, V., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5: 151, doi: 10.3389/fphar.2014.00151.

Rocco, A. (2014). Alcoholic disease: Liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14652, doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14652.

Román, J., Colell, A., Blasco, C., Caballeria, J., Parés, A., Rodés, J., & Fernández-Checa, J. C. (1999). Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: Effect on transcription factors AP-1 and NF-κB: Differential Role of Ethanol and Acetaldehyde in the Induction of Oxidative Stress in HEP G2 Cells: Effect on Transcription Factors AP-1 and NF-κB. *Hepatology*, 30(6), 1473–1480, 10.1002/hep.510300623.

Rosales-Cruz, P., Domínguez-Pérez, M., Reyes-Zárate, E., Bello-Monroy, O., Enríquez-Cortina, C., Miranda-Labra, R., Bucio, L., Gómez-Quiroz, L. E., Rojas-Del Castillo, E., Gutiérrez-Ruíz, M. C., & Souza-Arroyo, V. (2018). Cadmium exposure exacerbates hyperlipidemia in cholesterol-overloaded hepatocytes via autophagy dysregulation. *Toxicology*, 398–399, 41–51, doi: 10.1016/j.tox.2018.02.007.

Seitz, H. K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., & Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 16, doi: 10.1038/s41572-018-0014-7.

Setshedi, M., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2010). Acetaldehyde Adducts in Alcoholic Liver Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(3), 178–185, doi: 10.4161/oxim.3.3.12288.

Shimizu, I., Kamochi, M., Yoshikawa, H., & Nakayama, Y. (2012). *Gender Difference in Alcoholic Liver Disease*. 20, doi: 10.5772/27178.

Simoni-Nieves, A., Clavijo-Cornejo, D., Gutiérrez-Ruíz, M., Gómez-Quiroz, L. (2017). Acetaldehyde Effects on Cellular Redox State. In Vinood Patel. (Ed), *The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, Elsevier, 63-70.

Solsona-Vilarrasa, E., Fucho, R., Torres, S., Nuñez, S., Nuño-Lámbarri, N., Enrich, C., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2019). Cholesterol enrichment in liver mitochondria impairs oxidative phosphorylation and disrupts the assembly of respiratory supercomplexes. *Redox Biology*, 24, 101214, doi: 10.1016/j.redox.2019.101214.

Souza, C. E. A. de, Stolf, A. M., Dreifuss, A. A., Lívero, F. dos R., Gomes, L. de O., Petiz, L., Beltrame, O., Dittrich, R. L., Telles, J. E. Q., Cadena, S. M., & Acco, A. (2015). Characterization of an alcoholic hepatic steatosis model induced by ethanol and high-fat diet in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(3), 367–378, doi: 10.1590/S1516-8913201500294.

Szabo, G., Kamath, P. S., Shah, V. H., Thursz, M., & Mathurin, P. (2019). Alcohol-Related Liver Disease: Areas of Consensus, Unmet Needs and Opportunities for Further Study. *Hepatology*, 69(5):2271-2283, doi: 10.1002/hep.30369.

Teschke, R. (2018). Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects. *Biomedicines*, 6(4), 106, DOI: 10.3390/biomedicines6040106.

Wang, Y., Seitz, H. K., & Wang, X.-D. (2010). Moderate Alcohol Consumption Aggravates High-Fat Diet Induced Steatohepatitis in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(3), 567–573, DOI: 10.1111/j.1530-0277.2009.01122.x.

Wilson, D. F., & Matschinsky, F. M. (2020). Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Medical Hypotheses*, 140, 109638, doi: 10.1016/j.mehy.2020.109638.

Xu, J., Ma, H.-Y., Liu, X., Rosenthal, S., Baglieri, J., McCubbin, R., Sun, M., Koyama, Y., Geoffroy, C. G., Saijo, K., Shang, L., Nishio, T., Maricic, I., Kreifeldt, M., Kusumanchi, P., Roberts, A., Zheng, B., Kumar, V., Zengler, K., ... Kisseleva, T. (2020). Blockade of IL-17 signaling reverses alcohol-induced liver injury and excessive alcohol drinking in mice. *JCI Insight*, 5(3), e131277, doi: 10.1172/jci.insight.131277.



CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO CAUSADO A NIVEL HEPÁTICO POR LA INGESTA CRÓNICA DE ALCOHOL, EN UN AMBIENTE CON SOBRECARGA DE COLESTEROL




JOSE MANUEL ALONSO MORA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ
DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES
DRA. MARIA DEL REFUGIO DENISE CLAVIJO CORNEJO
DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

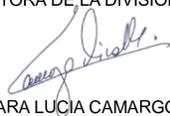
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE MANUEL ALONSO MORA

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUJÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

VOCAL

DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES

VOCAL

DRA. MARIA DEL REFUGIO DENISE CLAVIJO CORNEJO

SECRETARIO

DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO

El presente documento cuenta con la firma –autégrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella