



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Caracterización de un modelo de enfermedad hepática alcohólica basado en  
diferentes hepatotóxicos que conducen al cáncer de hígado**

T E S I S

Que presenta

**M. en C. BRISA RODOPE ALARCÓN SÁNCHEZ**

Para obtener el Grado de  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**BIOLOGÍA CELULAR**

Directores de la Tesis:

**Dr. Jaime Arellanes Robledo**

**Dr. Saúl Villa Treviño**

Ciudad de México

Mayo, 2024

## DIRECTORES

### **Dr. Jaime Arellanes Robledo**

Investigador por México – CONAHCYT perteneciente al Laboratorio de Enfermedades Hepáticas del Instituto Nacional de Medicina genómica – INMEGEN, Ciudad de México.

### **Dr. Saúl Villa Treviño**

Investigador Titular Emérito del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional – CINVESTAV-IPN, Ciudad de México.

## ASESORES

### **Dra. Mireya de la Garza Amaya**

Investigadora Titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México.

### **Dra. Yesennia Sánchez Pérez**

Investigadora en Ciencias Médicas “E” de la Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología – INCan, Ciudad de México.

### **Dr. Francisco García Sierra**

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México.

### **Dr. Pablo Muriel de la Torre**

Investigador Titular del Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México.

(3)

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Tomas e Irene y a mis hermanas Lluvia y Balkis, por su amor,  
paciencia, aliento e inspiración.*

*A Joel y a toda mi familia, por su amor y apoyo incondicional.*

*A mi Paletita*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo, por permitirme continuar mis estudios de posgrado bajo su dirección y por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Saúl Villa Treviño, por permitirme continuar mis estudios de doctorado en su laboratorio bajo su dirección y por todo el apoyo brindado.

A mis asesores, la Dra. Mireya de la Garza Amaya, la Dra. Yesennia Sánchez Pérez, el Dr. Francisco García Sierra, y el Dr. Pablo Muriel de la Torre, por brindarme sus conocimientos y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Julio I. Pérez C., por el apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas.

A los QFB. Sergio Hernández G. y Eunice Romo, a los técnicos Alejandro Cruz H. y Víctor M. Ortiz S., a las secretarías Clara Hernández C. y María de la Luz López G., por su apoyo y asistencia técnica en el laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

Al personal del UPEAL-CINVESTAV conformado por el Dr. Jorge Fernández, a los MVZ. Rafael Leyva M., Ricardo Gaxiola C., Benjamín E. Chávez Á., María A. López L. y Alberto Rojo G., y a la Srta. María T. Hernández M., por el manejo y cuidado de los modelos experimentales utilizados en este proyecto.

A la Dra. María A. Cabañas C., por su apoyo y asistencia técnica en la unidad de microscopía confocal del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

Al personal de la Unidad de Histología del INMEGEN conformado por la M.C. Nayeli B. Gabiño L. y por el Lic. Ricardo Nava M., por su apoyo y asistencia técnica.

A mis compañeros y amigos de laboratorio.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Institución que me permitió realizar mis estudios de posgrado en el Laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular, bajo la dirección del Dr. Emérito Saúl Villa Treviño.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Institución que, en colaboración con el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, me permitió desarrollar la parte experimental de este proyecto en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas bajo la dirección del Dr. Jaime Arellanes Robledo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías – CONAHCYT, por el apoyo económico a través de la beca de doctorado No. 752715, aprobado a la sustentante durante el periodo 2019-2023.

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

**CONTENIDO**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
Capítulo 1. Introducción.....	12
1.1 La enfermedad hepática alcohólica.....	12
1.2 El consumo de etanol y el estrés oxidativo.....	14
1.3 El consumo de etanol y la carcinogénesis hepática.....	17
1.4 El consumo de etanol y las alteraciones en el metabolismo de lípidos.....	19
1.5 El consumo de etanol y el envejecimiento.....	20
1.6 Modelos animales de EHA.....	21
Capítulo 2. Planteamiento del problema.....	22
2.1 Hipótesis.....	23
2.2 Objetivo general.....	23
2.3 Objetivos específicos.....	23
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	24
3.1 Modelo animal.....	24
3.2 Diseño experimental.....	24
3.3 Conservación y procesamiento del tejido hepático.....	28
3.4 Ensayos histopatológicos e inmunohistoquímicos.....	28
3.5 Detección de la SA- $\beta$ -gal <i>in situ</i> .....	29
3.6 Ensayo de TUNEL.....	30
3.7 Ensayo de WB.....	30
3.8 Análisis estadístico.....	33
Capítulo 4. Resultados.....	34
4.1 El modelo MHT-EHA promueve alteraciones asociadas a la EHA.....	34
4.2 El modelo MHT-EHA afecta la ganancia de PC y el peso relativo del hígado.....	38
4.3 El modelo MHT-EHA induce el metabolismo del etanol y estimula la NXN.....	39
4.4 El modelo MHT-EHA aumenta el nivel de la proteína FSP27.....	42
4.5 El modelo MHT-EHA promueve marcadores inflamatorios e inducibles por el LPS.....	44
4.6 El modelo MHT-EHA promueve el proceso de fibrosis.....	47
4.7 El modelo MHT-EHA acelera la aparición marcadores de senescencia celular.....	50
4.8 El modelo MHT-EHA promueve la muerte de las células hepáticas.....	52
4.9 El modelo MHT-EHA promueve la proliferación celular y la hepatocarcinogénesis.....	54

Capítulo 5. Discusión .....	58
Capítulo 6. Conclusión .....	67
Capítulo 7. Perspectivas .....	70
Capítulo 8. Referencias .....	71
Capítulo 9. Anexos .....	78
9.1 Publicaciones .....	78
9.2 Congresos .....	87

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS****Abreviaturas**

<b>CCE</b>	Consumo crónico de etanol
<b>CDS</b>	Control DEN-sacarosa
<b>CEH</b>	Células estelares hepáticas
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CNT</b>	Control no tratado
<b>CNTcp</b>	Control no tratado a corto plazo
<b>CNTpf</b>	Control no tratado de punto final
<b>CS</b>	Control de sacarosa
<b>DEN</b>	Dietilnitrosamina
<b>ED</b>	Estadísticamente diferente
<b>EHA</b>	Enfermedad hepática alcohólica
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FFEP</b>	Fijado en formaldehído al 4% y embebido en parafina
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MHT</b>	Múltiples hepatotóxicos
<b>MHTcp</b>	Aproximación MHT a corto plazo
<b>MHTpf</b>	Aproximación MHT de punto final
<b>PC</b>	Peso corporal
<b>SA-<math>\beta</math>-gal</b>	$\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia
<b>TdM</b>	Tricrómica de Masson
<b>TUNEL</b>	Marcaje del extremo 3'-hidroxilo del ADN fragmentado con dUTP, mediado por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>WB</b>	Western blot



**Símbolos**

<b>ADH1A</b>	Alcohol deshidrogenasa 1A
<b>ALDH2</b>	Aldehído deshidrogenasa 2
<b>CAMK2A</b>	Proteína quinasa II alfa dependiente de calcio/calmodulina
<b>CASP3</b>	Caspasa-3
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CXCL1</b>	Quimiocina 1 con motivo C-X-C
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450 familia 2 subfamilia E miembro 1
<b>FLII</b>	Flightless I
<b>FSP27</b>	Proteína 27 específica de la grasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GSTP1</b>	Glutación S-transferasa Pi-1
<b>KI67</b>	Marcador de proliferación Ki-67
<b>KEAP1</b>	Proteína 1 asociada a Kelch similar a ECH
<b>LY-6G</b>	Antígeno linfocitario 6 familia G6D
<b>MYD88</b>	Gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide-88
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NRF2</b>	Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar a 2
<b>NXN</b>	Nucleorredoxina
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células proliferantes
<b>PFK1</b>	Fosfofructoquinasa-1
<b>p-H2A.X<sup>Ser139</sup></b>	Histona H2A.X fosforilada en serina 139
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll

## RESUMEN

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) surge tras un largo periodo de exposición a los efectos nocivos del consumo crónico de alcohol junto con otros hepatotóxicos. La EHA abarca un amplio espectro de trastornos asociados al hígado, entre los que se encuentran la esteatosis, la esteatohepatitis, la fibrosis, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC). En esta investigación, nos propusimos desarrollar un modelo murino de EHA a través de la administración crónica de múltiples hepatotóxicos (MHT)-EHA (modelo MHT-EHA) como el etanol, la sacarosa, los lipopolisacáridos y dosis bajas de dietilnitrosamina con la finalidad de recapitular las alteraciones y etapas asociadas a la progresión de la enfermedad. Demostramos que el modelo MHT-EHA estimula a las enzimas ADH1A y NXN, un metabolizador de etanol y un sensor de estrés oxidativo, respectivamente; promueve la esteatosis asociada con la proteína formadora de gotas de lípidos FSP27, la inflamación identificada por la infiltración de neutrófilos hepáticos positivos al marcador LY-6G, y el aumento del nivel de MYD88, una proteína implicada en la respuesta inflamatoria; además, estimula la aparición temprana de la senescencia celular identificada por los marcadores de senescencia SA- $\beta$ -gal y p-H2A.X<sup>Ser139</sup>. El modelo también induce la fibrosis asociada con el aumento de desmina, un marcador de las células estelares hepáticas, cuya activación induce la acumulación de fibras de colágeno, acompañada de muerte celular y proliferación compensatoria identificadas por el aumento de la apoptosis mediada por CASP3, y de los marcadores de proliferación KI67 y PCNA, respectivamente. Finalmente, el modelo induce alteraciones histopatológicas asociadas con la aparición de células malignas, e incrementa el nivel del marcador de CHC, GSTP1. En conclusión, proporcionamos un modelo alternativo para la exploración cronológica de las alteraciones y etapas asociadas a la EHA, y que será de utilidad para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

**ABSTRACT**

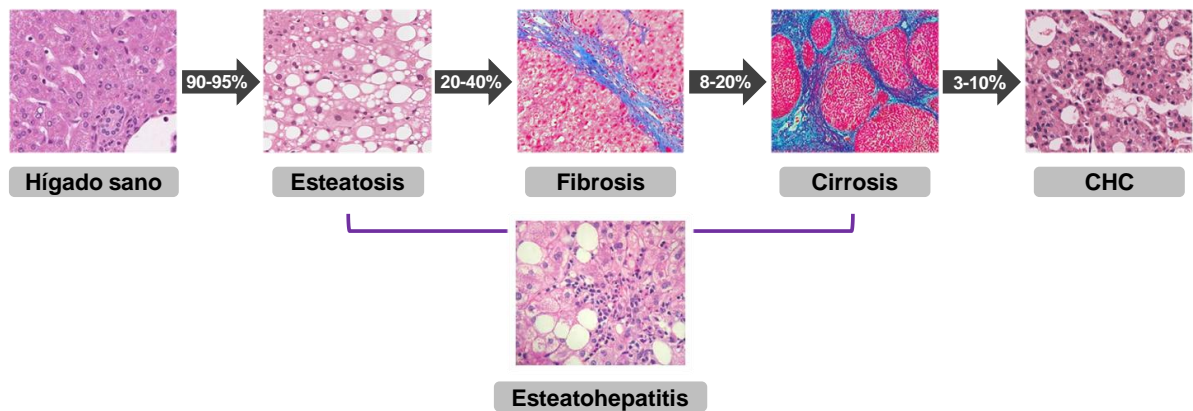
The worst-case scenario related to alcoholic liver disease (ALD) arises after a long period of exposure to the harmful effect of alcohol consumption along with other hepatotoxics. ALD encompasses a broad spectrum of liver-associated disorders, such as steatosis, steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Based on the chronic administration of different hepatotoxics, including ethanol, sucrose, lipopolysaccharide, and low doses of diethylnitrosamine over a short period, here we aimed to develop a multiple hepatotoxic (MHT)-ALD model in the mouse that recapitulates the human ALD-associated disorders. We demonstrated that the MHT-ALD model induces ADH1A and NXN, an ethanol metabolizer and a redox-sensor enzyme, respectively; promotes steatosis associated with the induction of the lipid droplet forming FSP27, inflammation identified by the infiltration of hepatic neutrophils-positive to LY-6G marker, and the increase of MYD88 level, a protein involved in inflammatory response; and stimulates the early appearance of cellular senescence identified by the senescence markers SA- $\beta$ -gal activity and p-H2A.X<sup>Ser139</sup>. It also induces fibrosis associated with increased desmin, a marker of hepatic stellate cells whose activation leads to the deposition of collagen fibers, accompanied by cell death and compensatory proliferation revealed by increased CASP3-mediated apoptosis, and KI67- and PCNA-proliferation markers, respectively. It also induces histopathological traits of malignancy and the level of the HCC marker, GSTP1. In conclusion, we provide a useful model for exploring the chronological ALD-associated alterations and stages, and addressing therapeutic approaches.

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 La enfermedad hepática alcohólica

El consumo excesivo de etanol es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y representa el principal factor de riesgo de las enfermedades hepáticas crónicas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 se registraron alrededor de 3.3 millones de muertes asociadas con el alcoholismo a nivel mundial. Según esta organización, México ocupa el décimo lugar con un consumo per cápita anual de 7 litros para toda la población mayor de 15 años y de 15 litros únicamente para los bebedores mayores de 15 años<sup>1</sup>.

La EHA es el tipo más común de enfermedad hepática crónica provocada por el consumo excesivo de etanol. Esta enfermedad engloba un amplio espectro de trastornos que comienzan con el hígado graso alcohólico, caracterizado por la esteatosis macrovesicular (**Figura 1**). La esteatosis está presente en más del 90% de los bebedores y es considerada una etapa que puede ser reversible con la abstinencia<sup>2,3</sup>. En este sentido, el consumo de 40 g de alcohol por día durante al menos 10 años es suficiente para desarrollar esteatosis<sup>2,4</sup>. El hígado graso puede progresar a esteatohepatitis en el 20% a 40% de los bebedores crónicos, y se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido hepático, predominantemente de origen neutrofílico, con daño y balonamiento de los hepatocitos<sup>2,5</sup>. A su vez, los individuos con esteatohepatitis pueden desarrollar hepatitis alcohólica, un síndrome clínico agudo de mal pronóstico. El daño hepático persistente y la inflamación crónica pueden promover el desarrollo de los estadios más avanzados de la enfermedad<sup>2,3</sup>. Aproximadamente, del 20% al 40% de los pacientes con esteatohepatitis desarrolla fibrosis hepática; de estos, entre el 8% al 20% progresa a cirrosis y hasta un 20% a 40% de los pacientes con cirrosis pueden desarrollar descompensación metabólica asociada a la presencia de ascitis, hemorragia por várices esofágicas y encefalopatía. Finalmente, del 3% al 10% de los pacientes con cirrosis desarrolla CHC, al menos, tras 10 años de consumo excesivo de etanol<sup>2,3,6</sup>.

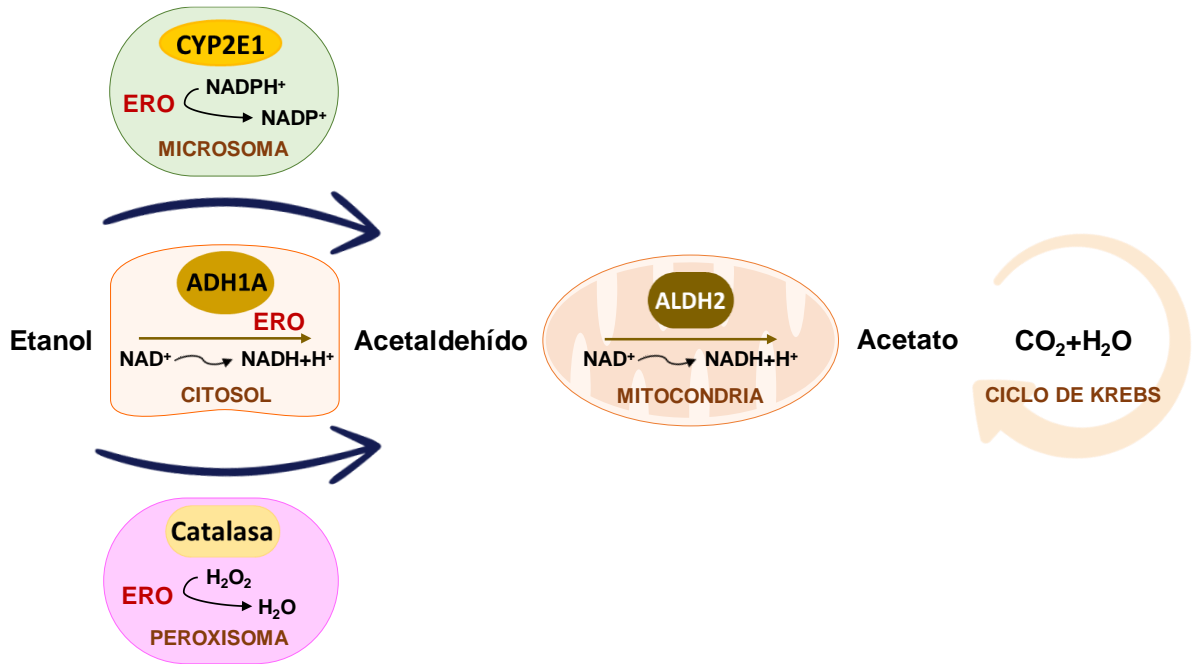


**Figura 1. Espectro patológico de la EHA.** La EHA comprende un espectro de alteraciones entre las que se encuentra la esteatosis asintomática, presente en más del 90% de los bebedores crónicos, única etapa que puede ser reversible con la abstinencia. Sin embargo, la ingesta continua de etanol provoca inflamación y daño hepático persistente, condición conocida como hepatitis alcohólica que, en casos graves, presenta una elevada tasa de mortalidad a corto plazo. A su vez, el hígado graso alcohólico puede progresar a esteatohepatitis alcohólica que, de hacerse crónica, progresa a fibrosis entre un 20% y 40%, y a cirrosis entre un 8% y 20% de los pacientes. Finalmente, entre el 3% y 10% de los pacientes con cirrosis alcohólica establecida desarrollan cáncer de hígado. CHC, carcinoma hepatocelular. Imagen modificada de Singal *et al.*, 2018<sup>7</sup>.

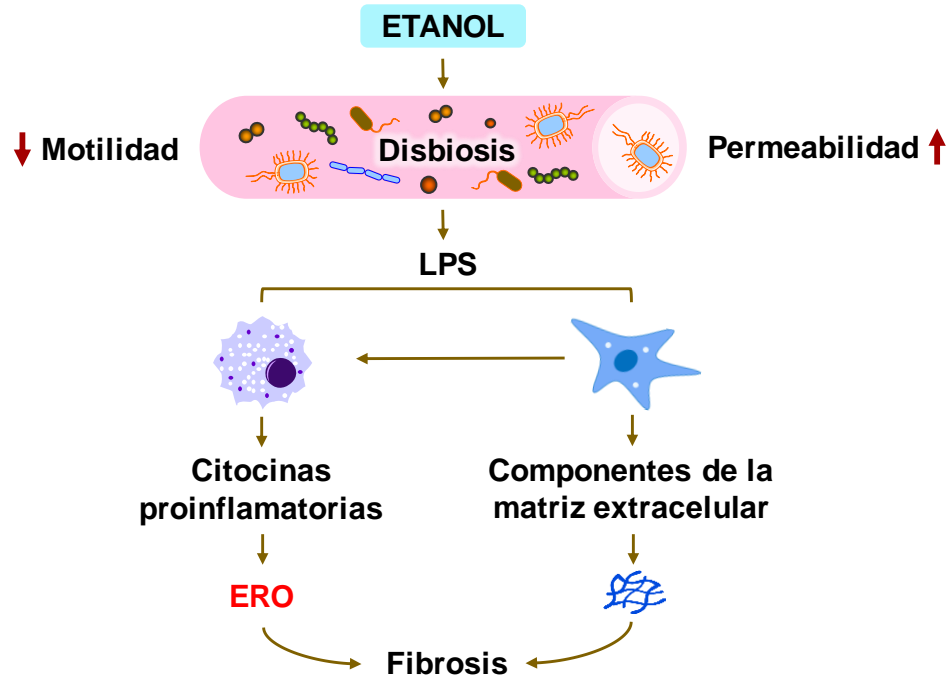
De manera interesante, las alteraciones asociadas a la EHA son promovidas por el efecto combinado del consumo crónico de etanol (CCE) junto con otros factores de riesgo, como la infección ocasionada por el virus de la hepatitis, el consumo excesivo de dietas ricas en grasas y azúcares, la obesidad, la exposición a carcinógenos químicos provenientes de la contaminación ambiental y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, las cuales son metabolitos secundarios producidos por diferentes cepas de hongos del género *Aspergillus* con propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas<sup>2,8</sup>. Por lo tanto, el efecto combinado de diferentes hepatotóxicos junto con el CCE desempeña un papel clave en la patogénesis de la EHA.

## 1.2 El consumo de etanol y el estrés oxidativo

El CCE está estrechamente relacionado con el desequilibrio del estado redox celular ya que el metabolismo del etanol a través de la actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa 1A (ADH1A) y citocromo P450 familia 2 subfamilia E miembro 1 (CYP2E1), entre otras, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que, a su vez, pueden causar disfunción y muerte celular cuando sus niveles exceden la capacidad antioxidante endógena (**Figura 2**)<sup>9</sup>. Sin embargo, el etanol no es el único responsable de la producción de ERO durante la progresión de la EHA. De primera instancia, el consumo de etanol genera un aumento en la permeabilidad de las membranas e inflamación a nivel de intestino delgado, lo cual conduce a una enteropatía cuando la exposición a esta sustancia es prolongada y como resultado, promueve el crecimiento bacteriano, la disbiosis y el deterioro de la barrera intestinal. Esto permite que endotoxinas bacterianas como los lipopolisacáridos (LPS) y demás sustancias tóxicas ingresen a la circulación portal y sistémica (**Figura 3**)<sup>10,11</sup>. El aumento de la concentración de LPS trae consigo una reacción inflamatoria y potencia el daño hepático inducido por el etanol; así, el etanol y los LPS afectan a las células hepáticas de forma conjunta<sup>12</sup>. El efecto producido por el etanol y los LPS ha sido propuesto como un mecanismo de dos vías, en el cual, el primer estímulo es ejercido por el estrés oxidativo inducido por el metabolismo del etanol, y el segundo, es ejercido por el incremento de los niveles de los LPS que, a su vez, perpetúan la liberación de citocinas, la infiltración de células inmunitarias, el daño hepático y la fibrosis<sup>10,11,13</sup>.



**Figura 2. Metabolismo oxidativo del etanol en las células hepáticas.** Entre el 90% y 98% del etanol absorbido es metabolizado en el hígado. En el hepatocito, el etanol sufre un metabolismo oxidativo que produce principalmente acetaldehído mediante las enzimas ADH1A localizada en el citosol, CYP2E1 localizada en los microsomas y por la catalasa en los peroxisomas. El acetaldehído es metabolizado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2). Posteriormente, el acetato se conjuga con la coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA que se oxida, en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante el ciclo de Krebs.  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono; ERO, especies reactivas de oxígeno;  $\text{NAD}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido;  $\text{NADH}$ , nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida;  $\text{NADP}$ , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Imagen modificada de Elamin *et al.*, 2013<sup>14</sup>.

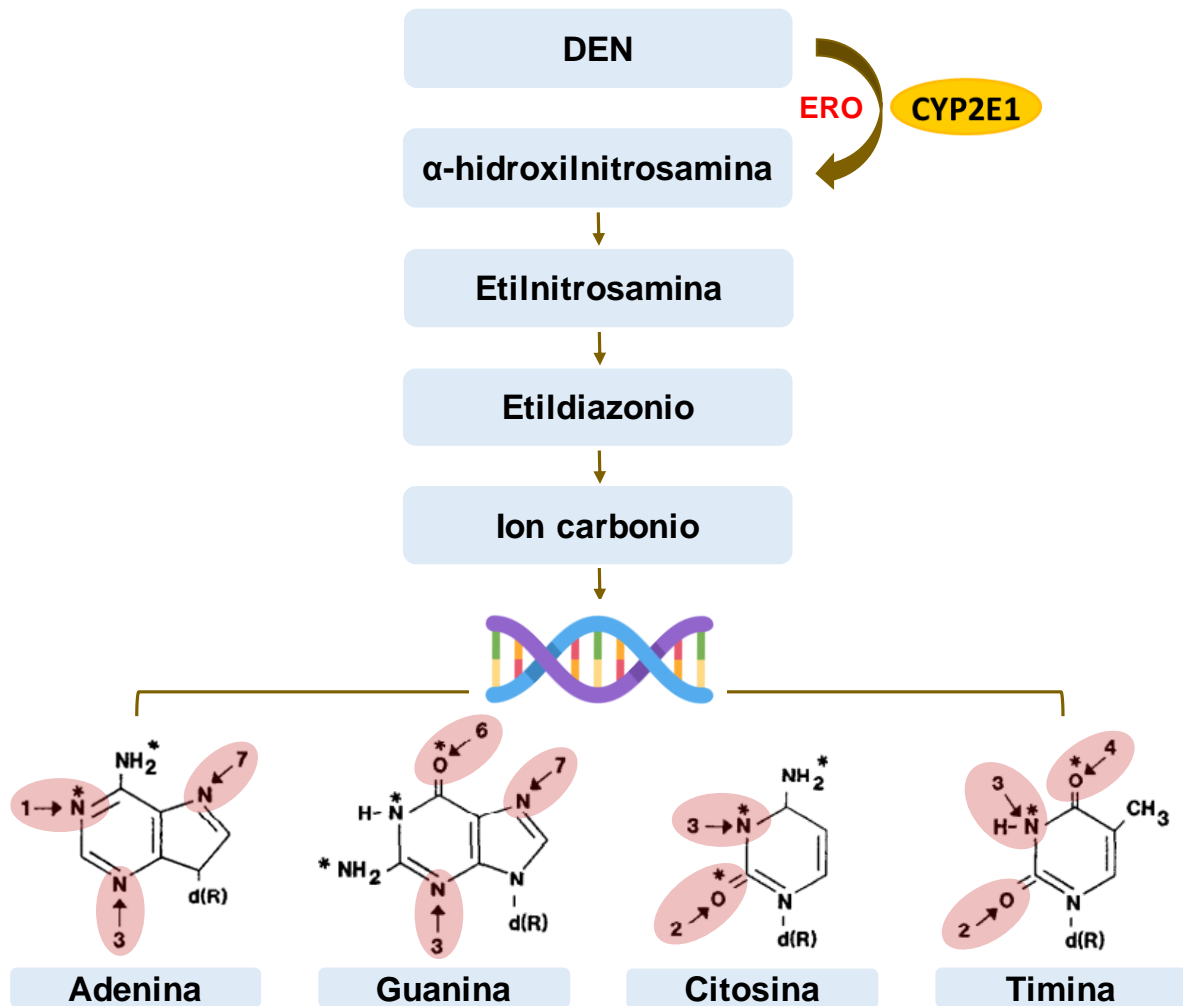


**Figura 3. Participación de los LPS en la progresión de la EHA.** Tanto el consumo de etanol como sus metabolitos resultantes generan una disminución de la motilidad intestinal, disrupción y aumento en la permeabilidad de la barrera epitelial a nivel de intestino delgado. Cuando la exposición a esta sustancia es prolongada, se desencadena una enteropatía y como resultado, se promueve el crecimiento bacteriano y la disbiosis que incrementa la translocación de antígenos luminales; por ejemplo, endotoxinas bacterianas como los LPS a la circulación portal y sistémica. El aumento en la concentración de LPS activa a las células de Kupffer, las cuales producen un gran número de citocinas y factores de crecimiento que perpetúan la reacción inflamatoria, la lesión tisular, favorecen la activación de las células estelares hepáticas (CEH), la acumulación de componentes de la matriz extracelular y en última instancia, promueven la fibrosis. ERO, especies reactivas de oxígeno; LPS, lipopolisacáridos. Imagen adaptada de Seitz *et al.*, 2018<sup>2</sup>.



### 1.3 El consumo de etanol y la carcinogénesis hepática

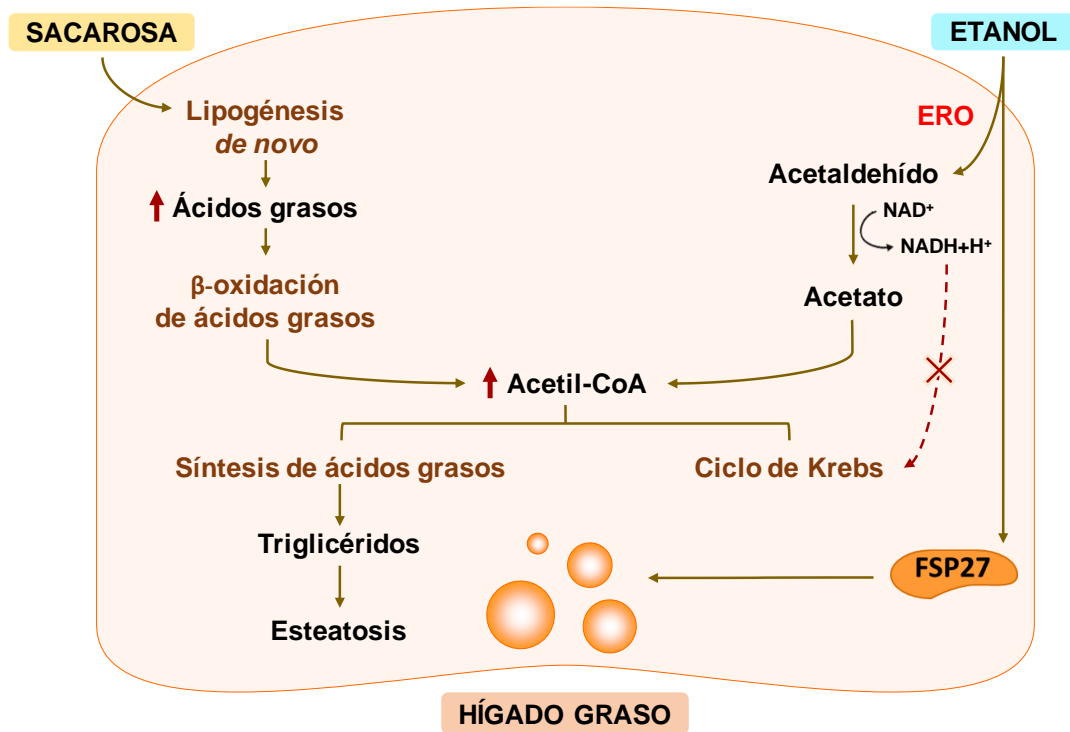
El CCE aumenta el riesgo de padecer distintos tipos de cáncer, incluido el de hígado debido a que el acetaldehído, el primer metabolito de la biotransformación del etanol, es un carcinógeno que favorece la formación de aductos en el ADN y proteínas, así como el intercambio de cromátidas hermanas, entre otros efectos clastogénicos<sup>8,15</sup>. Dado que el carcinógeno hepático dietilnitrosamina (DEN), se encuentra en los alimentos envasados y en la contaminación ambiental, se ha probado su efecto sinérgico junto con el CCE para inducir el estadio más grave de la EHA, es decir, el CHC (**Figura 4**)<sup>3,16</sup>. En estos modelos, la administración de una dosis baja de DEN (1 mg/kg) en ratones jóvenes o varias dosis altas (40 mg/kg) en ratones adultos, dieron lugar a la aparición del CHC<sup>3,16</sup>. Una investigación reciente determinó el potencial carcinogénico de la DEN administrada a 2.5, 5 y 20 mg/kg por un periodo de 18 semanas, e informó que la dosis más alta exacerbó la producción de ERO, promovió la inflamación, la fibrosis, la proliferación celular y el CHC a partir de las 10 semanas. Cabe destacar que, aunque las dosis más bajas de DEN no indujeron el CHC, promovieron alteraciones hepáticas leves y estimularon la aparición de marcadores tempranos de proliferación celular<sup>17</sup>; por lo tanto, con base en la progresión típica de la EHA, durante la cual los seres humanos están expuestos cotidianamente a pequeñas cantidades de varias sustancias hepatotóxicas durante largos periodos, las dosis bajas de DEN en combinación con el CCE y otros hepatotóxicos podrían ser útiles para recapitular experimentalmente y en un periodo más corto, los trastornos asociados a la EHA, incluido el CHC.



**Figura 4. Metabolismo de la DEN en el hepatocito.** La DEN es bioactivada mediante un proceso de hidroxilación mediado por el CYP2E1, los intermediarios reactivos resultantes son metabolitos alquilantes que propician la formación de macromoléculas metiladas (óvalos en color rojo). Las alteraciones en el ADN conducen a la modificación de bases nitrogenadas o a la formación de sitios apurínicos (el asterisco indica los sitios de emparejamiento de bases). Además, como resultado de la bioactivación de la DEN, se generan ERO, que exacerbaban el estrés oxidativo, potencial el daño y las mutaciones en el ADN, desencadenan la lesión hepatocelular, incrementa el número de mutaciones y en última instancia, la carcinogénesis. DEN, dietilnitrosamina; ERO, especies reactivas de oxígeno. Imagen adaptada de Verna *et al.*, 1996<sup>18</sup>.

#### 1.4 El consumo de etanol y las alteraciones en el metabolismo de lípidos

Actualmente, el consumo de dietas ricas en grasas y azúcares es un tema de debate debido a la susceptibilidad observada en las personas obesas y con sobrepeso a los efectos tóxicos del etanol<sup>19</sup>. Los azúcares añadidos, especialmente la sacarosa y la fructosa, elevan el nivel de triglicéridos circulantes que promueven la lipogénesis *de novo* y favorecen el desarrollo de la esteatosis (**Figura 5**)<sup>20</sup>. Una mayor disponibilidad y absorción de ácidos grasos en el hepatocito es seguida por el aumento de la  $\beta$ -oxidación para la síntesis de acetil-coenzima A (CoA). Por su parte, el acetato generado por el metabolismo del etanol se une a la CoA para la síntesis de más acetil-CoA. El exceso de acetil Co-A, se utiliza para generar energía en el ciclo de Krebs o para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, la nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), que también existe en exceso debido al metabolismo del etanol, inhibe el ciclo de Krebs, por lo que la acetil-CoA se utiliza predominantemente para la síntesis de ácidos grasos que se esterifican a triglicéridos y se almacenan en el citoplasma de los hepatocitos<sup>21</sup>. El consumo excesivo de etanol también promueve genes lipogénicos e induce a la proteína 27 específica de la grasa (FSP27), una proteína que estimula la acumulación de triglicéridos en el hígado<sup>22</sup>. Por lo tanto, el CCE exacerba la acumulación de triglicéridos, promueve la esteatosis predominantemente macrovesicular y facilita la progresión de la enfermedad<sup>21,23</sup>.



**Figura 5. Metabolismo de la sacarosa en el tejido hepático.** La sacarosa estimula la lipogénesis *de novo*, que trae consigo una mayor disponibilidad y absorción de ácidos grasos en el hepatocito seguida por un aumento de la  $\beta$ -oxidación para promover la síntesis de acetil-CoA. En este punto converge el acetato generado por el metabolismo del etanol que se une a la CoA e incrementa la síntesis de acetil-CoA. El exceso de acetil-CoA es utilizado para generar energía en el ciclo de Krebs o para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, el NADH producido en exceso, debido al metabolismo del etanol, inhibe el ciclo Krebs por lo que el acetil-CoA se utiliza predominantemente para la síntesis de ácidos grasos que se esterifican a triglicéridos y se almacenan en el citoplasma de los hepatocitos, que promueve la esteatosis predominantemente macrovesicular y el hígado graso. El CCE también promueve el desarrollo del hígado graso mediante la inducción de proteínas lipogénicas como FSP27. CoA, coenzima A; ERO, especies reactivas de oxígeno; NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida. Imagen adaptada de Seitz *et al.*, 2023<sup>21</sup> y Hwang *et al.*, 2020<sup>6</sup>.

### 1.5 El consumo de etanol y el envejecimiento

Recientemente, el efecto del consumo nocivo de etanol sobre el envejecimiento y la senescencia celular han cobrado interés debido a reportes que demuestran que los adultos mayores son más susceptibles a los efectos tóxicos del etanol<sup>24</sup>. La evidencia apunta a una deficiencia en el metabolismo del etanol en las personas mayores que ha sido relacionada con la disminución en la actividad del CYP2E1<sup>25</sup>. Además, otros estudios han señalado que las agresiones continuas al hígado

provenientes de diferentes etiologías conducen a la acumulación de células senescentes que podría aumentar la susceptibilidad del hígado al efecto del CEC<sup>25,26</sup>. La senescencia celular ha sido relacionada con la disfunción hepática en la enfermedad hepática crónica, mientras que la senescencia en los hepatocitos y colangiocitos promueve la progresión de la fibrosis, la senescencia en las células estelares hepáticas (CEH) revierte el proceso. Además, la acumulación de hepatocitos senescentes y su deficiente depuración inmunitaria también ha sido asociada con el desarrollo del CHC<sup>26</sup>.

### **1.6 Modelos animales de EHA**

Durante las últimas décadas se ha generado un cúmulo de evidencias sobre las alteraciones asociadas a la EHA, en gran medida, debido al desarrollo de numerosos modelos animales en los que se han observado los efectos del consumo crónico o agudo de etanol, ya sea solo o en combinación con otros hepatotóxicos durante la progresión de esta enfermedad<sup>27-31</sup>. Los modelos en los que se han probado diferentes dosis, periodos y vías de administración, han sido de utilidad para reproducir una o varias etapas de la EHA, por ejemplo, la esteatosis junto con marcadores de lesión hepática<sup>27,28</sup>, la esteatohepatitis y la fibrosis<sup>30</sup>, la esteatohepatitis junto con la fibrosis y la cirrosis<sup>29,31</sup>, y la esteatosis, la infiltración inflamatoria de origen neutrófilo y la fibrosis<sup>28</sup>. A pesar de su indudable utilidad al reproducir algunas alteraciones asociadas con la progresión de la EHA observada en seres humanos, algunos modelos tienen limitaciones de manejo, altas tasas de mortalidad y no recapitulan el estadio más avanzado de la enfermedad, es decir, el cáncer de hígado<sup>27-31</sup>. Una investigación reciente determinó el efecto del CCE, los LPS y dosis bajas de DEN, como un protocolo de EHA de múltiples insultos, que induce la esteatosis, el infiltrado inflamatorio, la proliferación celular y algunos signos iniciales de malignidad<sup>32</sup>. Las evidencias anteriores demuestran que ningún modelo de EHA reproduce cronológicamente todas las etapas asociadas a la progresión de la enfermedad como ocurre en los seres humanos. Por lo tanto, dilucidar el efecto simultáneo de diferentes hepatotóxicos resulta prometedor para promover cronológicamente todas las fases asociadas con la progresión de la EHA incluidos los estadios más avanzados.

## Capítulo 2. Planteamiento del problema

El consumo de alcohol es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo debido a que promueve el desarrollo de la EHA<sup>23</sup>. Durante las últimas décadas, se ha generado un cúmulo de evidencias sobre el proceso patológico de la enfermedad, en gran medida, debido al desarrollo de numerosos modelos animales en los que se han observado los efectos de la exposición aguda y crónica al alcohol durante la progresión de esta enfermedad. Sin embargo, las opciones de tratamiento eficaces son muy limitadas debido a la falta de modelos *in vivo* adecuados que recapitulen todas las etapas por las que cursa este proceso patológico<sup>28,33</sup>. Debido a la importancia que tiene el desarrollo del CHC como etapa final de la EHA, la caracterización de un modelo en el ratón busca reproducir todas las fases y mecanismos moleculares que se ven alterados como ocurre en el ser humano, con el objetivo de que la reproducción cronológica de la EHA en el ratón sea un modelo útil para la búsqueda de marcadores específicos de su progresión, así como de nuevos enfoques terapéuticos.

## **2.1 Hipótesis**

El desarrollo y caracterización de un modelo de EHA en el ratón, inducido mediante un esquema de múltiples insultos hepatotóxicos, permitirá recapitular todas las etapas y alteraciones moleculares que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Además, el modelo constituirá una herramienta para la identificación de posibles dianas terapéuticas y tratamientos quimiopreventivos.

## **2.2 Objetivo general**

Caracterizar el efecto de la administración crónica de etanol, sacarosa, LPS y dosis bajas de DEN, como un modelo de EHA inducido por múltiples hepatotóxicos (MHT-EHA), que permita recapitular todas las etapas asociadas a la progresión de la EHA en el ratón.

## **2.3 Objetivos específicos**

1. Diseñar un modelo de EHA en el ratón, que mediante un esquema de múltiples hepatotóxicos reproduzca cronológicamente la progresión de la enfermedad.
2. Proporcionar un modelo útil para determinar las alteraciones histopatológicas y los mecanismos moleculares asociados a su progresión.

## Capítulo 3. Materiales y métodos

### 3.1 Modelo animal

Para la caracterización del modelo de inducción de la EHA se emplearon ratones silvestres hembra de la cepa C57BL/6J (*Mus musculus*) de 7 semanas de edad y de un peso corporal (PC) aproximado de 20 g. Estos fueron aclimatados y alimentados *ad libitum* en un ambiente controlado con fotoperíodos de 12 h de luz/oscuridad y a una temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  en jaulas ventiladas mantenidas en bio-burbujas protegidas por un sistema de doble filtración HEPA. Dichos animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). El desarrollo experimental fue realizado de acuerdo con el proyecto número 011414, aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de laboratorio del UPEAL-CINVESTAV y con la Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 correspondiente a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

### 3.2 Diseño experimental

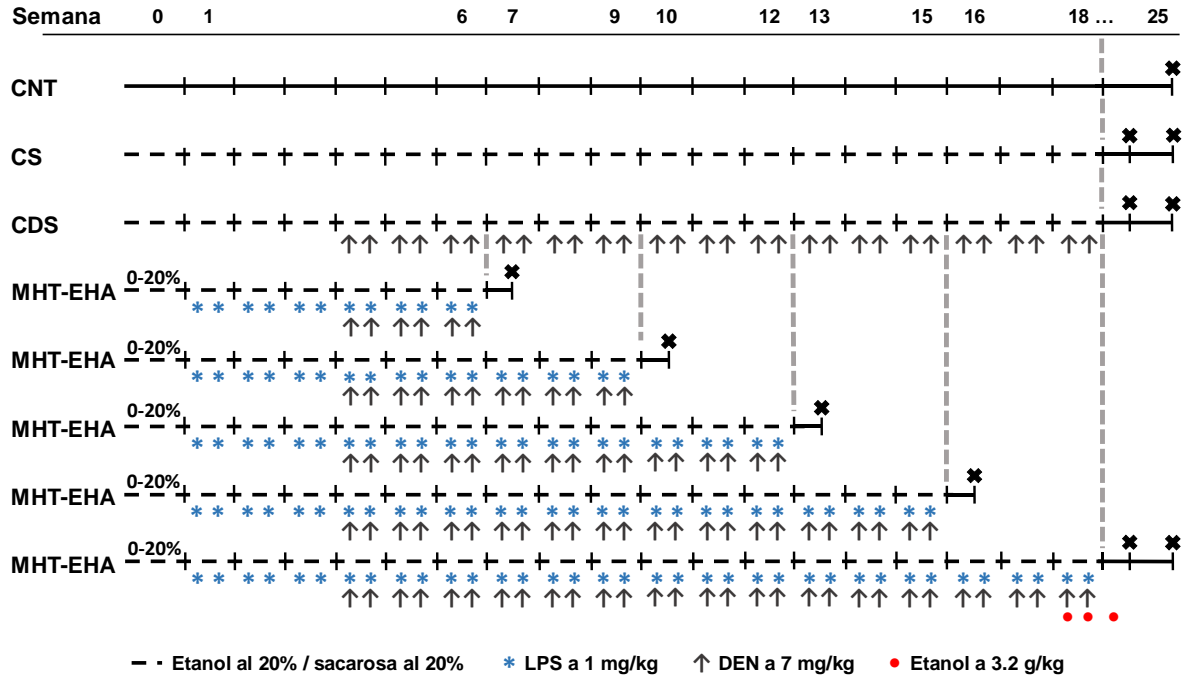
Para el presente modelo de inducción de la EHA, los animales fueron sometidos a un esquema de CCE, tal y como se reportó anteriormente<sup>32</sup>, junto con diferentes hepatotóxicos a los que las personas están expuestas a diario. En primer lugar, se realizaron dos enfoques basados en la administración de MHT; es decir, una aproximación de punto final (MHTpf) y una aproximación de corto plazo (MHTcp), los cuales tuvieron una duración de diez y nueve semanas, respectivamente (**Figuras 6A y B**). Los animales se dividieron aleatoriamente en once grupos experimentales ( $n = 5$  por grupo). Tras un periodo de adaptación de seis días durante los cuales la concentración de etanol se incrementó progresivamente de un 5% hasta alcanzar un 20%, concentración que se mantuvo hasta el final del tratamiento, a los ratones se les proporciono como única fuente de líquido para beber *ad libitum* una mezcla de etanol al 20% (p/v) disuelto en sacarosa al 20% (p/v), como se reportó previamente<sup>34</sup>. Los LPS y la DEN (L2654 y N0756,



respectivamente, de Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), disueltos en PBS, se inyectaron a los animales dos veces por semana por vía intraperitoneal, de acuerdo con los protocolos de Gustot *et al.*<sup>35</sup>; Fuentes *et al.*<sup>17</sup>; y Alarcón *et al.*<sup>32</sup>. El LPS se administró una hora después de la administración de la DEN. Mientras que el LPS se administró a 1 mg/kg de PC para ambas aproximaciones, es decir, la MHTpf y la MHTcp, la DEN se administró a 10 y a 7.5 mg/kg de PC, respectivamente, desde las primeras semanas de administración del etanol. Al final del experimento, la aproximación MHTpf recibió una dosis compulsiva de etanol por sonda oral a 3.2 g/kg de PC, a partir de una solución stock de etanol al 32% (p/v) disuelto en un buffer de sales.

Para el modelo de EHA, denominado modelo MHT-EHA, los animales fueron sometidos al mismo protocolo de consumo de etanol. La administración de la DEN, cuya dosis fue ajustada a 7 mg/kg de PC, inició tres semanas después del consumo de alcohol y finalizó dieciocho semanas después. Durante las últimas semanas de tratamiento, los animales recibieron tres dosis compulsivas de etanol a 3.2 g/kg de PC, en un intervalo de tres días por dosis administrada (**Figura 7**). Los grupos de animales sometidos a los modelos MHTcp y MHT fueron sacrificados cada tres semanas tras el inicio de la administración de la DEN. Se incluyeron grupos control administrados con sacarosa (CS) y con DEN-sacarosa (CDS). Todos los protocolos incluyeron un grupo control no tratado (CNT) que recibió agua purificada *ad libitum*. Durante la experimentación se registró semanalmente el PC de los animales. Para realizar un seguimiento del efecto del modelo MHT tras interrumpir la administración de los hepatotóxicos, veinticinco semanas después del inicio del consumo de etanol, se sacrificaron los grupos de animales sometidos al modelo MHT y sus respectivos controles. Finalizado el periodo experimental, los animales fueron sacrificados por exanguinación mediante una punción cardiaca bajo anestesia con isoflurano a una dosis de 2% para la inducción y de 3% para el mantenimiento de la anestesia. El procedimiento se realizó de acuerdo con los lineamientos del laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.





**Figura 7. Esquema de administración del modelo MHT-EHA.** Los ratones recibieron etanol al 20% (p/v) *ad libitum* disuelto en una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 10 semanas (líneas negras discontinuas). La concentración de 0%-20% indicada al principio de la línea negra discontinua hace referencia al periodo de incremento de la concentración del etanol. El LPS Se administró a 1 mg/kg de PC (asteriscos azules) y la DEN a 7 mg/kg de PC (flechas negras) dos veces por semana vía i.p. Los animales sometidos al modelo MHT-EHA durante 18 semanas, también recibieron por sonda oral tres dosis compulsivas de etanol a 3.2 g/kg de PC (puntos rojos). Varios grupos control fueron considerados, es decir, CS, CDS y un grupo CNT que no recibió tratamiento alguno (líneas negras continuas). Las líneas discontinuas grises indican el final de la administración de los hepatotóxicos y las cruces negras indican la eutanasia realizada una semana después. CNT, control no tratado; CDS, control DEN-sacarosa; CS, control de sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

### 3.3 Conservación y procesamiento del tejido hepático

Inmediatamente después de que el tejido hepático fue diseccionado, una parte del tejido fue fijado en formaldehído al 4% y embebido en parafina (FFEP) mediante el procedimiento estándar, para realizar las tinciones histológicas de hematoxilina y eosina (H&E), la tinción tricrómica de Masson (TdM), los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) y de marcaje del extremo 3'-hidroxilo del ADN fragmentado con dUTP, mediado por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). El tejido se conservó en 2-metilbutano para realizar la tinción histológica de rojo oleoso y determinar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -gal). Adicionalmente, parte del tejido se congeló directamente en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-75^{\circ}\text{C}$  para el aislamiento de proteínas e inmunodetección mediante Western blot (WB).

### 3.4 Ensayos histopatológicos e inmunohistoquímicos

Después del FFEP de los tejidos hepáticos se realizaron cortes de  $3\ \mu\text{m}$  de espesor, que se desparafinaron y se rehidrataron gradualmente. Para la evaluación histopatológica, y la detección de fibrosis y esteatosis, las secciones se procesaron mediante las tinciones estándar de H&E, TdM y rojo oleoso, respectivamente. Los análisis histopatológicos fueron realizados aleatoriamente y las alteraciones tisulares se clasificaron según la clasificación internacional de tumores de ratón<sup>36</sup>. Para los análisis IHQ, los antígenos fueron expuestos y procesados tras la rehidratación del tejido según el kit Mouse-on-Mouse HRP-Polymer Bundle de BioCare Medical (902-MM510-090617, Concord, CA, USA). Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 1**); es decir, marcador de proliferación Ki-67 (KI67, 1:100, GTX16667) y CYP2E1 (1:300, GTX32546) de GeneTex, Irvine, CA, USA; antígeno linfocitario 6 familia G6D (LY-6G, 1:100, sc-53515, Santa Cruz Biotechnol, Dallas, TX, USA); y desmina (1:200, PA5-16705, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tras el protocolo de tinción estándar con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown Detection System (BSB 0005, BioSB, Santa Barbara, CA, USA), las secciones fueron contrateñidas, deshidratadas y montadas con un medio de montaje acuoso. Finalmente, tanto la marca positiva en los ensayos de IHQ, como

la desorganización estructural, las fibras colágeno y las gotas de grasa detectadas mediante las tinciones de H&E, TdM y Rojo oleoso, respectivamente, fueron parámetros analizados bajo microscopía de campo claro, utilizando un microscopio ZEISS Axio-A1 (ZEISS, Oberkochen, BW, DE). Para escanear tanto el área como los núcleos positivos, se capturaron seis imágenes por muestra individual seleccionadas aleatoriamente en campos observados con lentes objetivas de 20x o 40x de aumento, es decir, 30 imágenes por grupo de tratamiento y un total de 330 imágenes por análisis histológico. La marca se cuantificó con el programa ImageJ 1.5.

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ**

Nombre	Especie	Reactividad	Dilución	Casa comercial	# Cat.
<b>CYP2E1</b>	Conejo	Ratón, rata, humano	1:300	GeneTex	GTX32546
<b>Desmina</b>	Conejo	Ratón, rata, oveja, humano	1:200	Thermo Fisher S.	PA5-16705
<b>KI67</b>	Conejo	Ratón, rata, pollo, cerdo, humano	1:100	GeneTex	GTX16667
<b>LY-6G</b>	Rata	Ratón	1:100	Santa Cruz B.	sc-53515

### 3.5 Detección de la SA- $\beta$ -gal *in situ*

La detección de la SA- $\beta$ -gal se realizó como se reportó anteriormente<sup>37</sup>. Brevemente, secciones de tejido hepático congelado de 10  $\mu$ m de espesor se montaron en portaobjetos de vidrio, se fijaron con solución fijadora (glutaraldehído al 0.2%, EGTA a 0.1 M y MgCl<sub>2</sub> a 1 mM) durante 5 min, se lavaron con agua desionizada y se incubaron a 37°C con la solución de  $\beta$ -gal (buffer de ácido cítrico/fosfato sódico a 0.4 M y pH de 6, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a 5 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a 5 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 M y X-gal a 1 mg/mL) durante 24 h. Posteriormente, los tejidos fueron contrateñidos, deshidratados y montados con un medio de montaje acuoso. Las imágenes se colectaron y analizaron mediante microscopía de campo claro utilizando un microscopio ZEISS Axio-A1 (Oberkochen, BW, DE). El número de células positivas a SA- $\beta$ -gal se cuantificó contabilizando 10 campos por muestra individual, los campos fueron seleccionados al azar utilizando una lente objetiva de

20x. Se capturaron 50 imágenes por grupo de tratamiento, es decir, un total de 550 imágenes y la marca se cuantificó mediante el software ImageJ 1.5.

### **3.6 Ensayo de TUNEL**

Para el ensayo de TUNEL se utilizó el kit Click-It TUNEL Alexa Fluor Imaging (C10245, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) al que se le realizaron algunas modificaciones. Tras la rehidratación, los tejidos FFPE se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min a 37°C y se lavaron sumergiéndolos en PBS dos veces durante 5 min por cada lavado. A continuación, las secciones se permeabilizaron con proteinasa K (4485228, Thermo Fisher Scientific) en una cámara húmeda durante 20 min y se lavaron por inmersión en PBS durante 5 min, se fijaron y lavaron nuevamente y se mantuvieron en agua desionizada durante 5 min. La fragmentación del ADN se detectó siguiendo el protocolo indicado en el kit Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging. Los núcleos celulares se tiñeron con la solución Hoechst 33342 durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS, se les retiró el exceso de agua y se fijaron con el medio de montaje Fluoroshield (ab104137; Abcam, Cambridge, MA, USA). Se incluyó un control negativo incubado con la mezcla de reacción sin la desoxinucleotidil transferasa terminal, además de un control positivo incubado con DNasa I (1 µg/mL) durante 30 min con la finalidad de inducir roturas en la cadena de ADN. La detección de la marca positiva y la captura de las imágenes se realizó mediante microscopía confocal con un microscopio Leica TCS SP8 AOBS (Acousto-optical Beam Splitter) DMI6000 (Wetzlar, HE, DE), en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

### **3.7 Ensayo de WB**

La proteína total se extrajo en buffer de lisis de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente<sup>10</sup>. Los lisados obtenidos se incubaron en agitación durante 30 min, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron debidamente a -70°C para su posterior análisis. Tras la cuantificación de las proteínas por el método del ácido bicinonínico, cantidades equivalentes de proteínas previamente desnaturalizadas en buffer de Laemmli fueron analizadas

mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (IPVH00010, Merck KGaA, Darmstadt, HE, DE). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2**); es decir, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA, 1:2000, 13-3900) y desmina (1:5000, PA5-16705) ambos de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; glutatión S-transferasa Pi-1 (GSTP1, 1:2000, SAB3500265, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); CYP2E1 (1:4000, GTX32546) e histona H2A.X fosforilada en la serina 139 (p-H2A.X<sup>Ser139</sup>, 1:1000, GTX628789) ambos de GeneTex, Irvine, CA, USA; nucleorredoxina (NXN, sc-393748) y LY-6G (sc-53515) ambos a 1:1000 de Santa Cruz Biotechnol, Dallas, TX, USA; ADH1A (1:4000, ab108203), selectina-E (1:1000, ab18981) y FSP27 (1:1000, ab198204) todos de Abcam, Boston, MA, USA; caspasa-3 (CASP3, 9664), y el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide-88 (MYD88, 4283) ambos a 1:500 de Cell Signaling Technol, Danvers, MA, USA. Como control de carga se utilizó a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:5000, McAb60004-1-Ig, Proteintech, Rosemont, IL, USA). Para las combinaciones de anticuerpos primarios se aseguró que estos provinieran de diferentes especies con la finalidad de evitar reacción cruzada inespecífica. El análisis densitométrico se realizó mediante el software ImageJ 1.5.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de WB**

<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Reactividad</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b># Cat.</b>
<b>ADH1A</b>	Conejo	Ratón, rata, humano	1:4000	Abcam	ab108203
<b>Anti-conejo HRP</b>	Cabra	Conejo	1:10000	Jackson	111-035-003
<b>Anti-rata HRP</b>	Cabra	Rata	1:10000	Jackson	112-035-003
<b>Anti-ratón HRP</b>	Conejo	Ratón	1:10000	Jackson	315-035-003
<b>CASP3</b>	Conejo	Ratón, rata, humano, mono	1:500	Cell Signaling T.	9664
<b>CYP2E1</b>	Conejo	Ratón, rata, humano	1:4000	GeneTex	GTX32546
<b>Desmina</b>	Conejo	Ratón, rata, oveja, humano	1:5000	Thermo Fisher S.	PA5-16705
<b>FSP27</b>	Conejo	Ratón, humano	1:1000	Abcam	ab198204
<b>GAPDH</b>	Ratón	Ratón, rata, humano, cerdo	1:5000	Proteintech	McAb60004-1-Ig
<b>GSTP1</b>	Conejo	Ratón, rata, humano	1:2000	Sigma-Aldrich	SAB3500265
<b>LY-6G</b>	Rata	Ratón	1:1000	Santa Cruz B.	sc-53515
<b>MYD88</b>	Conejo	Ratón, rata, humano, mono	1:500	Cell Signaling T.	4283
<b>NXN</b>	Ratón	Ratón, rata, humano	1:1000	Santa Cruz B.	sc-393748
<b>PCNA</b>	Ratón	Ratón, rata, humano, mono	1:2000	Thermo Fisher S.	13-3900
<b>p-H2A.X<sup>Ser139</sup></b>	Ratón	Ratón, rata, humano	1:1000	GeneTex	GTX628789
<b>Selectina-E</b>	Conejo	Ratón, rata, humano	1:1000	Abcam	ab18981



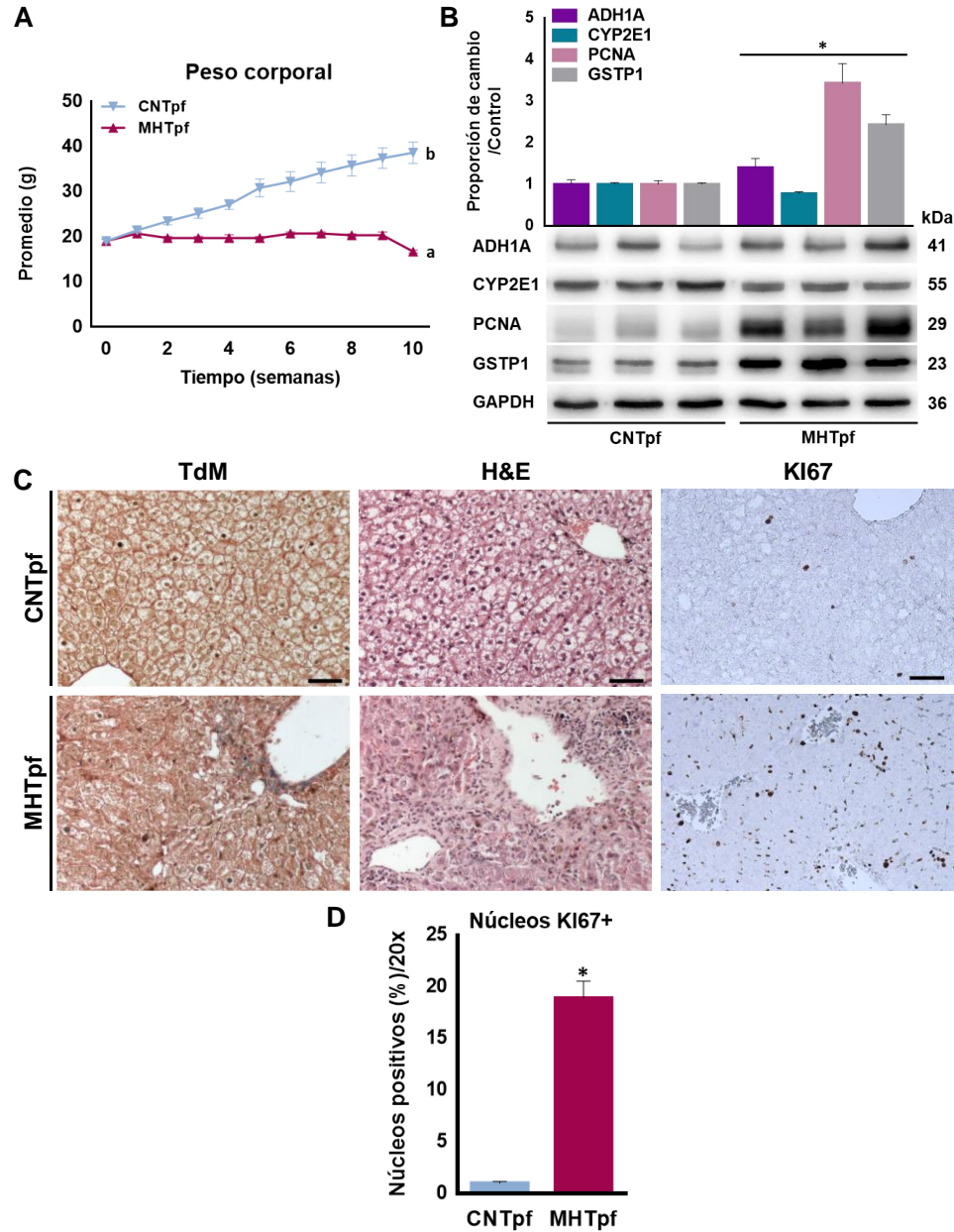
### **3.8 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). La prueba paramétrica *t* de *Student* fue utilizada cuando sólo dos grupos experimentales fueron comparados, mientras que el análisis unidireccional de la varianza (*ANOVA*) fue utilizada para comparaciones múltiples con una prueba Bonferroni *post-hoc*. Como mínimo se incluyeron cinco animales por grupos y todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM y las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## Capítulo 4. Resultados

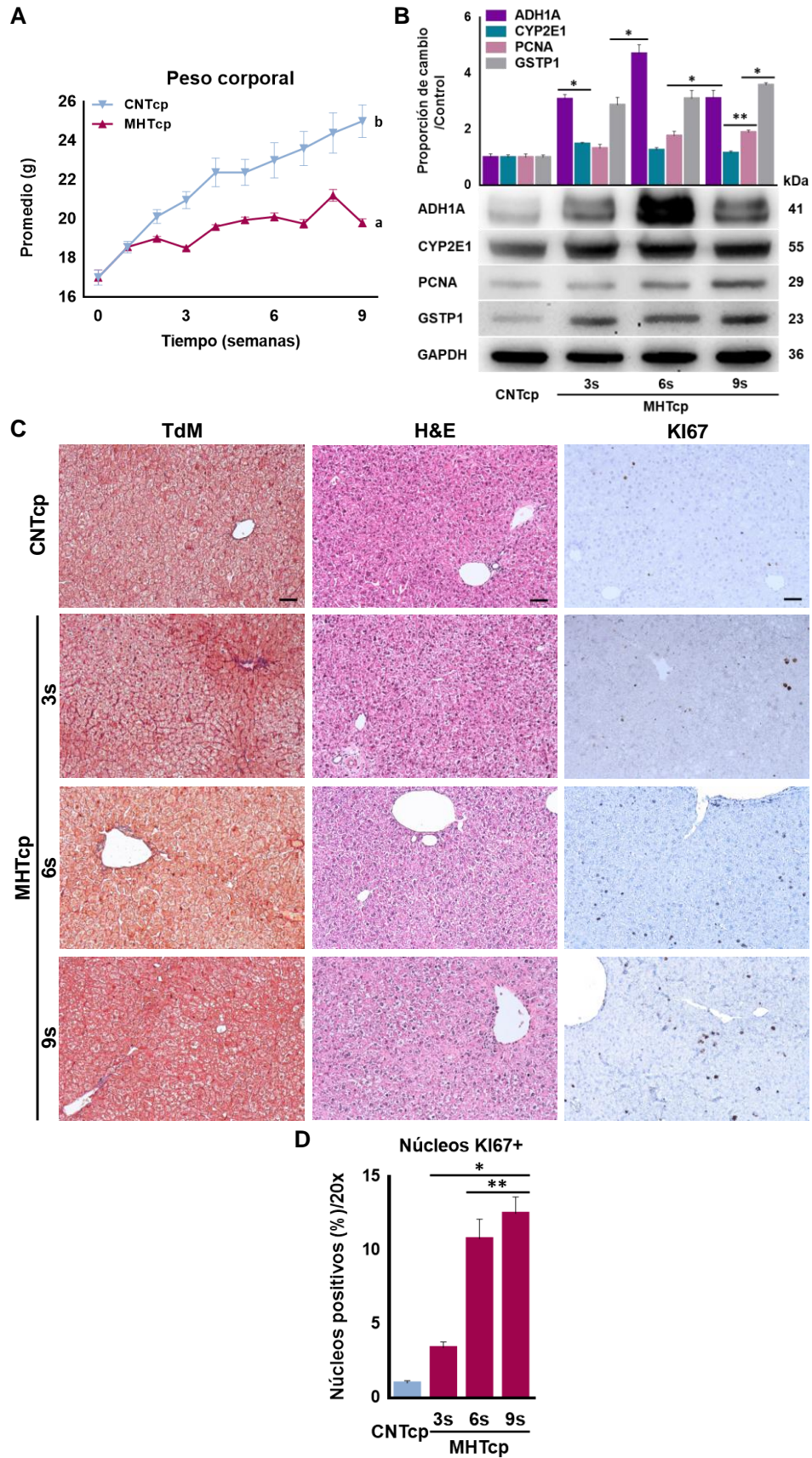
### 4.1 El modelo MHT-EHA promueve alteraciones asociadas a la EHA

Inicialmente investigamos el efecto del CCE, sacarosa, LPS y dosis bajas de DEN (10 mg/kg), en la aproximación MHTpf (**Figura 6A**). Como se describe a continuación, determinamos el efecto combinado de los hepatotóxicos sobre el PC, la arquitectura hepática, la acumulación de fibras de colágeno, además de evaluar el estatus de marcadores del metabolismo del etanol como las enzimas ADH1A y CYP2E1, de proliferación celular como el PCNA y el KI67, y de hepatocarcinogénesis como la GSTP1. La aproximación MHTpf interfirió con la ganancia de PC en comparación con los animales del grupo control ( $p < 0.001$ ; **Figuras 8A**); sin embargo, mientras que aumentó el nivel de la enzima ADH1A ( $p = 0.05$ ; **Figuras 8B**), disminuyó el nivel de CYP2E1 ( $p = 0.0234$ ; **Figura 8B**) comparado con los controles. La aproximación MHTpf indujo una ligera acumulación de fibras de colágeno tisular detectada mediante la tinción TdM y promovió la desorganización del parénquima hepático, la pérdida de la definición de los cordones de hepatocitos y el infiltrado inflamatorio revelado mediante la tinción de H&E (**Figura 8C**). El ensayo de WB reveló que el nivel de los marcadores de proliferación celular y hepatocarcinogénesis, PCNA ( $p = 0.0006$ ;) y GSTP1 ( $p = 0.0002$ ), respectivamente, también fueron inducidos en comparación con los controles (**Figura 8B**). Del mismo modo, el análisis IHQ mostró que el número de núcleos KI67-positivos también incremento comparado con el grupo control ( $p < 0.0001$ ; **Figura 8C y D**). Tomando en cuenta estos hallazgos se planteó un nuevo protocolo de administración en el que las dosis y tiempos de tratamiento fueron ajustados.



**Figura 8. Efecto de la aproximación MHTpf en el hígado de ratón.** (A) El PC de los ratones se registró semanalmente durante todo el periodo experimental. (B) El gráfico corresponde a la cuantificación de proteínas totales analizadas mediante WB. El nivel de las proteínas ADH1A, CYP2E1, PCNA y GSTP1 se normalizó con respecto a GAPDH, proteína utilizada como control de carga. (C) Las imágenes corresponden a secciones de tejido procesado mediante las tinciones TdM y H&E, y al análisis de IHQ para la detección de KI67. La barra de escala equivale a 40  $\mu$ m. (D) El gráfico corresponde a la cuantificación de los núcleos KI67-positivos. Los valores se expresan como veces de cambio del nivel con respecto a los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. <sup>a</sup>Estadísticamente diferente (ED) de la última semana; <sup>b</sup>ED de la primera semana del mismo grupo; \*ED del CNTpf;  $p < 0.05$ . CNTpf, control no tratado de punto final; MHTpf, aproximación MHT de punto final; TdM, tricrómica de Masson.

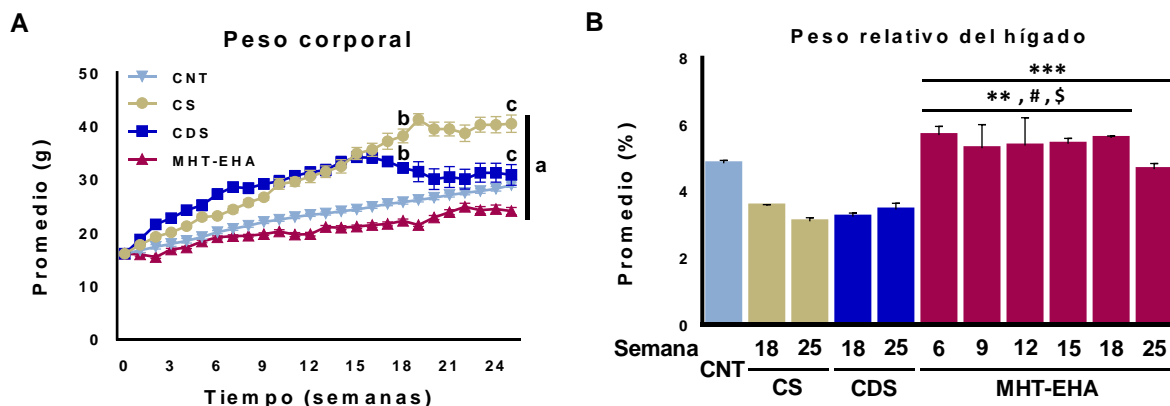
Partiendo de los resultados obtenidos de la primera aproximación, redujimos la dosis de DEN a 7.5 mg/kg y realizamos sacrificios periódicos con la finalidad de identificar la progresión temprana de la EHA, la cual denominamos aproximación MHTcp (**Figura 6B**). Dicha aproximación interfirió en la ganancia de PC en comparación con los animales del grupo control ( $p < 0.001$ ; **Figuras 9A**). Con respecto a los marcadores de metabolismo del etanol, mientras que aumentó el nivel de la enzima ADH1A a las 3, 6 y 9 semanas (para todos los grupos  $p < 0.0001$ ), el nivel de la enzima CYP2E1 aumentó a las 3 semanas ( $p = 0.0016$ ), pero se redujo progresivamente a las 6 y 9 semanas ( $p = 0.0325$ ) en comparación con los controles (**Figura 9B**). Mientras que la tinción TdM reveló una ligera acumulación de fibras de colágeno en el parénquima, la tinción de H&E mostró que el protocolo únicamente indujo la desorganización de los cordones de hepatocitos (**Figuras 9C**). El ensayo de WB reveló que el nivel de la proteína PCNA aumentó progresivamente a partir de las 6 y 9 semanas en comparación con los controles ( $p = 0.0031$  y  $p = 0.0008$ , respectivamente; **Figura 9B**). El análisis IHQ reveló que el número de núcleos KI67-positivos aumentó progresivamente de 3 a 9 semanas comparado con el grupo control ( $p = 0.0077$ ,  $p < 0.0001$ , y  $p < 0.0001$ , respectivamente; **Figura 9C y D**). Por último, el nivel del marcador de hepatocarcinogénesis GSTP1 fue inducido progresivamente de 3 a 9 semanas en comparación con los controles (para todos los grupos  $p < 0.0001$ ; **Figura 9B**). En conjunto, las pruebas indican que el CCE, la sacarosa y los LPS, junto con 10 o 7.5 mg/kg de DEN, promueven alteraciones asociadas a la progresión de la EHA. Con estas evidencias, nos propusimos extender el periodo de exposición crónica a estos hepatotóxicos con la finalidad de identificar la aparición cronológica de las alteraciones asociadas a la enfermedad que, en última instancia, conducen al cáncer de hígado.



**Figura 9. Efecto de la aproximación MHTcp en el hígado de ratón.** (A) El PC de los ratones se registró semanalmente durante todo el periodo experimental. (B) El gráfico corresponde a la cuantificación de proteínas totales analizadas mediante WB. El nivel de las proteínas ADH1A, CYP2E1, PCNA y GSTP1 se normalizó con respecto a GAPDH, proteína utilizada como control de carga. (C) Las imágenes corresponden a secciones de tejido procesado mediante las tinciones TdM, H&E, y al análisis de IHQ para la detección de KI67. La barra de escala equivale a 50  $\mu$ m. (D) El gráfico corresponde a la cuantificación de los núcleos KI67-positivos. Los valores se expresan como veces de cambio del nivel con respecto a los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. <sup>a</sup>ED de la última semana; <sup>b</sup>ED de la primera semana del mismo grupo; \*ED del CNTcp; \*\*ED del MHTcp-3s;  $p < 0.05$ . CNTcp, control no tratado de corto plazo; MHTcp, aproximación MHT de corto plazo; TdM, tricrómica de Masson; 3s, tres semanas; 6s, seis semanas; 9s, nueve semanas de administración.

#### 4.2 El modelo MHT-EHA afecta la ganancia de PC y el peso relativo del hígado

Para este nuevo protocolo se administró la dosis de DEN ajustada a 7 mg/kg durante un periodo mayor al anterior. Aunque los animales sometidos al modelo MHT-EHA registraron un mayor PC al final del periodo experimental; es decir, a las 18 semanas, en comparación con la primera semana de tratamiento ( $p = 0.0013$ ), este fue inferior al de los grupos CS y CDS ( $p < 0.0001$  y  $p = 0.0008$ , respectivamente) al final del experimento (**Figura 10A**). Incluso, siete semanas después de haber retirado la exposición a los hepatotóxicos; es decir, a las 25 semanas, el PC de los animales sometidos al modelo MHT-EHA fue inferior al de los grupos CS y CDS ( $p < 0.0001$  y  $p = 0.0002$ , respectivamente). El PC de los animales del grupo CNT y del modelo MHT-EHA no fue estadísticamente diferente (ED). Curiosamente, el peso relativo del hígado aumentó entre las semanas 6 y 18 en los animales sometidos al modelo MHT-EHA en comparación con los grupos CS (para todos los grupos  $p \leq 0.0183$ ) y CDS (para todos los grupos  $p \leq 0.0023$ ) (**Figura 10B**). Del mismo modo, el peso relativo del hígado de los animales del modelo MHT-EHA fue mayor ( $p = 0.0257$ ) en comparación con el grupo CS a las 25 semanas. Estos datos indican que el modelo MHT-EHA afecta tanto la ganancia del PC como el peso relativo del hígado, lo cual puede deberse a un aumento en el índice de proliferación celular.



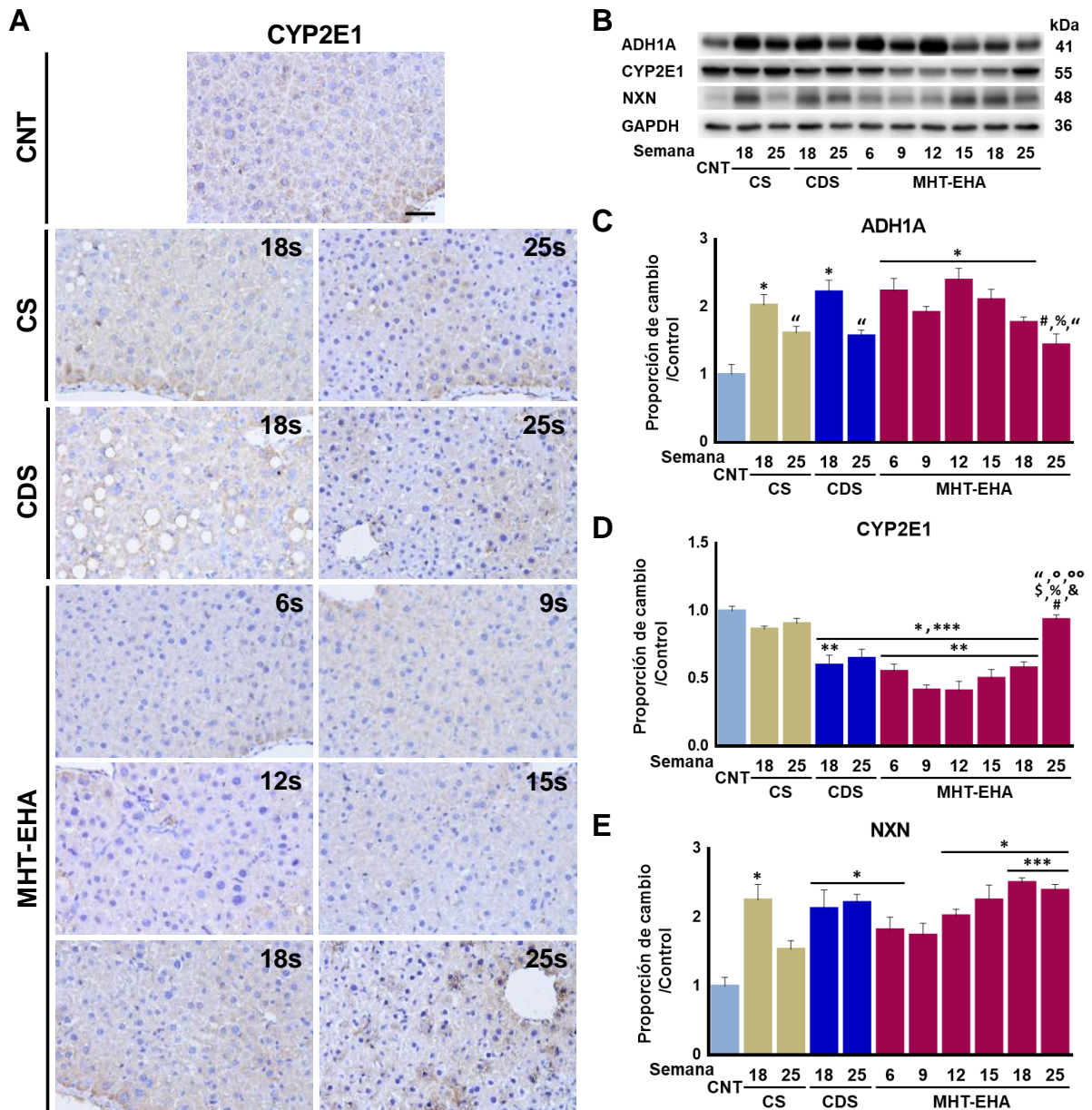
**Figura 10. Efecto del modelo MHT-EHA sobre el PC y el peso relativo del hígado.** (A) El PC y (B) el peso relativo del hígado se registró semanalmente durante todo el periodo experimental. Los valores se expresan como veces de cambio del nivel con respecto a los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. <sup>a</sup>ED de la primera semana del mismo grupo; <sup>b</sup>ED del MHT-EHA18s; <sup>c</sup>ED del MHT-EHA25s; <sup>\*\*</sup>ED del CS18s; <sup>\*\*\*</sup>ED del CS25s; <sup>#</sup>ED del CDS18s; <sup>\$</sup>ED del CDS25s;  $p < 0.05$ . CDS, control DEN-sacarosa; CNT, control no tratado; CS, control de sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica; 6s, seis semanas; 9s, nueve semanas; 12s, doce semanas; 15s, quince semanas; 18s, dieciocho semanas; 25s, veinticinco semanas de administración.

#### 4.3 El modelo MHT-EHA induce el metabolismo del etanol y estimula la NXN

El CCE aumenta la producción de ERO, un factor clave en la progresión de la EHA<sup>38</sup>, promovido principalmente durante el metabolismo del etanol por las enzimas ADH1A y CYP2E1, que a su vez, intervienen en el metabolismo de DEN<sup>18,32,39</sup>. Interesantemente, la NXN, una oxidoreductasa redox-sensible que regula las ERO<sup>40</sup>, también se ha visto alterada por el etanol y otros hepatotóxicos tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*<sup>10,41</sup>. Por lo tanto, determinamos el estatus de estas enzimas en el hígado de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. Mediante ensayos de IHQ demostramos que el nivel de CYP2E1 disminuyó y se localizó principalmente alrededor de las venas centrales y las tríadas portales en los animales sometidos al modelo MHT-EHA; no obstante, su distribución se observó en todo el tejido a las 25 semanas (**Figura 11A**). El análisis de WB confirmó que el nivel de CYP2E1 disminuyó de 6 a 18 semanas (todos los grupos  $p < 0.0001$ ) en comparación con los grupos CNT y CS a las 18 y 25 semanas (todos los grupos  $p \leq 0.0141$ ; **Figuras 11B y D**). De manera interesante, a las 18 y 25 semanas el nivel

de CYP2E1 también disminuyó por efecto del CDS en comparación con el grupo CNT y el grupo CS a las 25 semanas ( $p = 0.0001$  y  $p = 0.0295$ , respectivamente). Cabe destacar que su nivel se restableció a las 25 semanas; es decir, siete semanas después de haber retirado la exposición a los hepatotóxicos, en comparación con todos los grupos sometidos al modelo MHT-EHA ( $p \leq 0.0008$ ), así como con los grupos CDS a las 18 y 25 semanas ( $p = 0.0019$  y  $p = 0.0139$ , respectivamente). El nivel de la proteína ADH1A fue inducido por los grupos CS y CDS a las 18 semanas ( $p = 0.0003$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) y por el modelo MHT-EHA de 6 a 18 semanas (todos los grupos  $p \leq 0.0159$ ), en comparación con el grupo CNT (**Figura 11B y C**). Además, el modelo MHT-EHA aumentó el nivel de la proteína NXN a las 6 ( $p = 0.0391$ ), 12 y 18 semanas (todos los grupos  $p \leq 0.0034$ ) en comparación con el grupo CNT (**Figura 11B y E**). Los grupos CS y CDS también aumentaron ( $p = 0.0002$  y  $p = 0.0008$ , respectivamente) el nivel de la NXN a las 18 semanas y tras la eliminación de los hepatotóxicos su nivel permaneció elevado en el modelo MHT-EHA y en el grupo CDS, en comparación con el grupo CNT ( $p < 0.0001$  y  $p = 0.0003$ , respectivamente). Estos hallazgos demuestran que el modelo MHT-EHA aumenta el nivel de las enzimas ADH1A y NXN, un metabolizador de etanol y un sensor de estrés oxidativo, respectivamente, pero disminuye el nivel de CYP2E1.

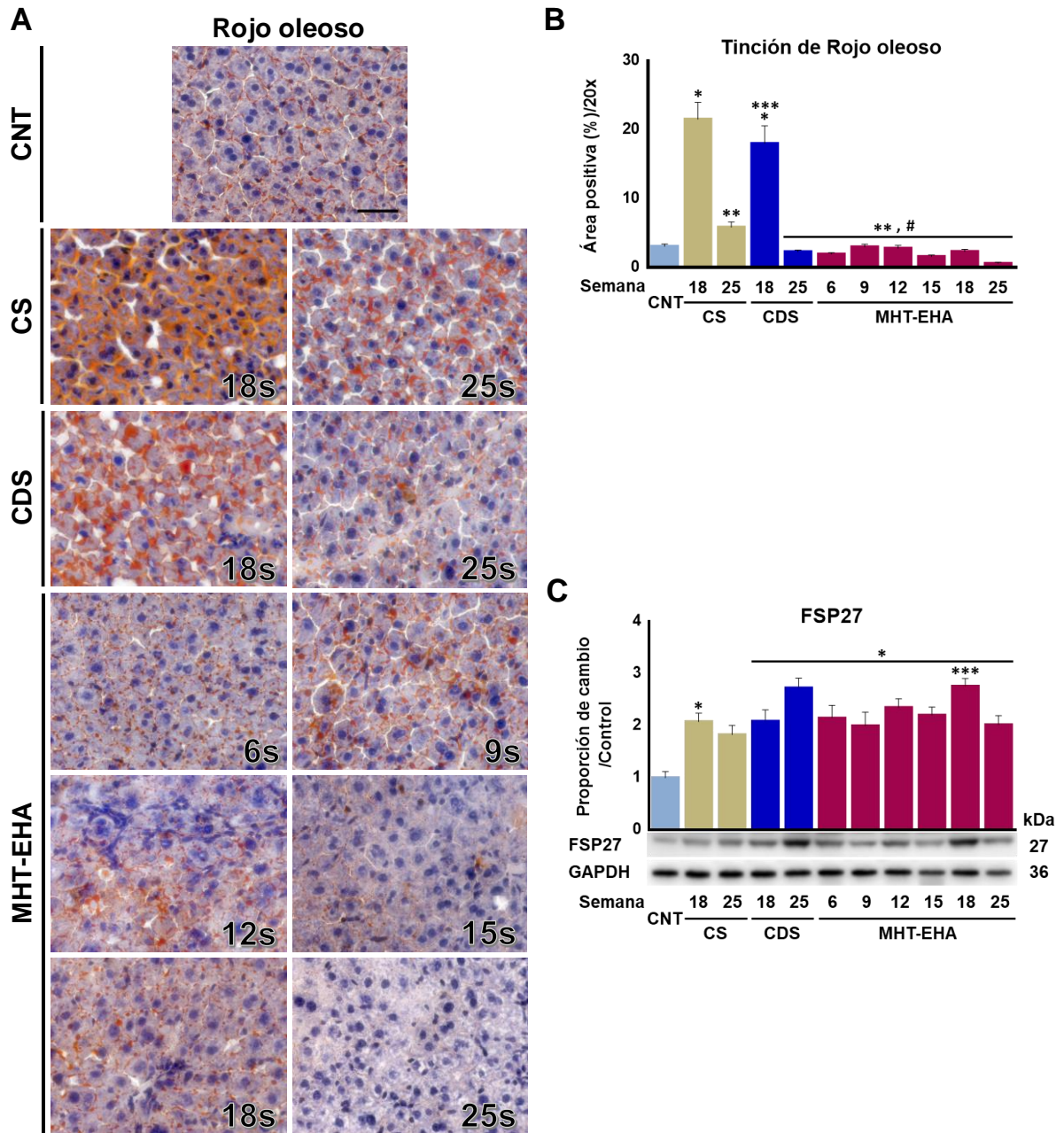




**Figura 11. Efecto del modelo MHT-EHA sobre el metabolismo del etanol y la enzima redox-sensibles NXN en el hígado del ratón.** (A) Análisis de IHQ para la detección del CYP2E1. La barra equivale a 40  $\mu$ m. (B) Análisis de WB y gráficos que muestran la cuantificación de proteínas totales de (C) ADH1A, (D) CYP2E1 y (E) NXN. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores se expresan como veces de cambio en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; #ED del CDS18s; %ED del MHT-EHA6s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s; °ED del MHT-EHA15s; °°ED del MHT-EHA18s;  $p < 0.05$ . CNT, control no tratado; CS, control de sacarosa; CDS, control DEN-sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

#### 4.4 El modelo MHT-EHA aumenta el nivel de la proteína FSP27

El consumo de etanol altera el metabolismo lipídico hepático, promueve el hígado graso y facilita su progresión hacia alteraciones más complejas<sup>23</sup>. Para determinar la acumulación de grasa en el parénquima hepático, evaluamos el almacenamiento de triglicéridos neutros en el tejido mediante la tinción de Rojo oleoso y el estatus de la proteína FSP27, un promotor de la formación de gotas de grasa expresado en el tejido adiposo blanco<sup>22</sup>. La acumulación de grasa se distribuyó en todo el tejido, aunque aumentó significativamente en los grupos CS y CDS a las 18 semanas (ambos  $p < 0.0001$ ; 22% y 18%, respectivamente; **Figura 12A y B**), en comparación con el grupo CNT y con el modelo MHT-EHA de 6 a 25 semanas (todos los grupos  $p < 0.0001$ ). El nivel de la proteína FSP27 aumentó en el modelo MHT-EHA de 6 a 25 semanas (todos los grupos  $p \leq 0.0223$ ; **Figura 12C**); además, en los grupos CS a las 18 semanas y CDS a las 18 y 25 semanas también aumento el nivel de FSP27, en comparación con el grupo CNT ( $p = 0.0095$ ,  $p = 0.0090$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente). Estos datos indican que los tratamientos CS, CDS y el modelo MHT-EHA inducen el aumento en el nivel de FSP27; sin embargo, mientras que el CDS aumenta parcialmente la acumulación de grasa tisular en el hígado del ratón, como era de esperar, el CS aumenta notoriamente la acumulación.

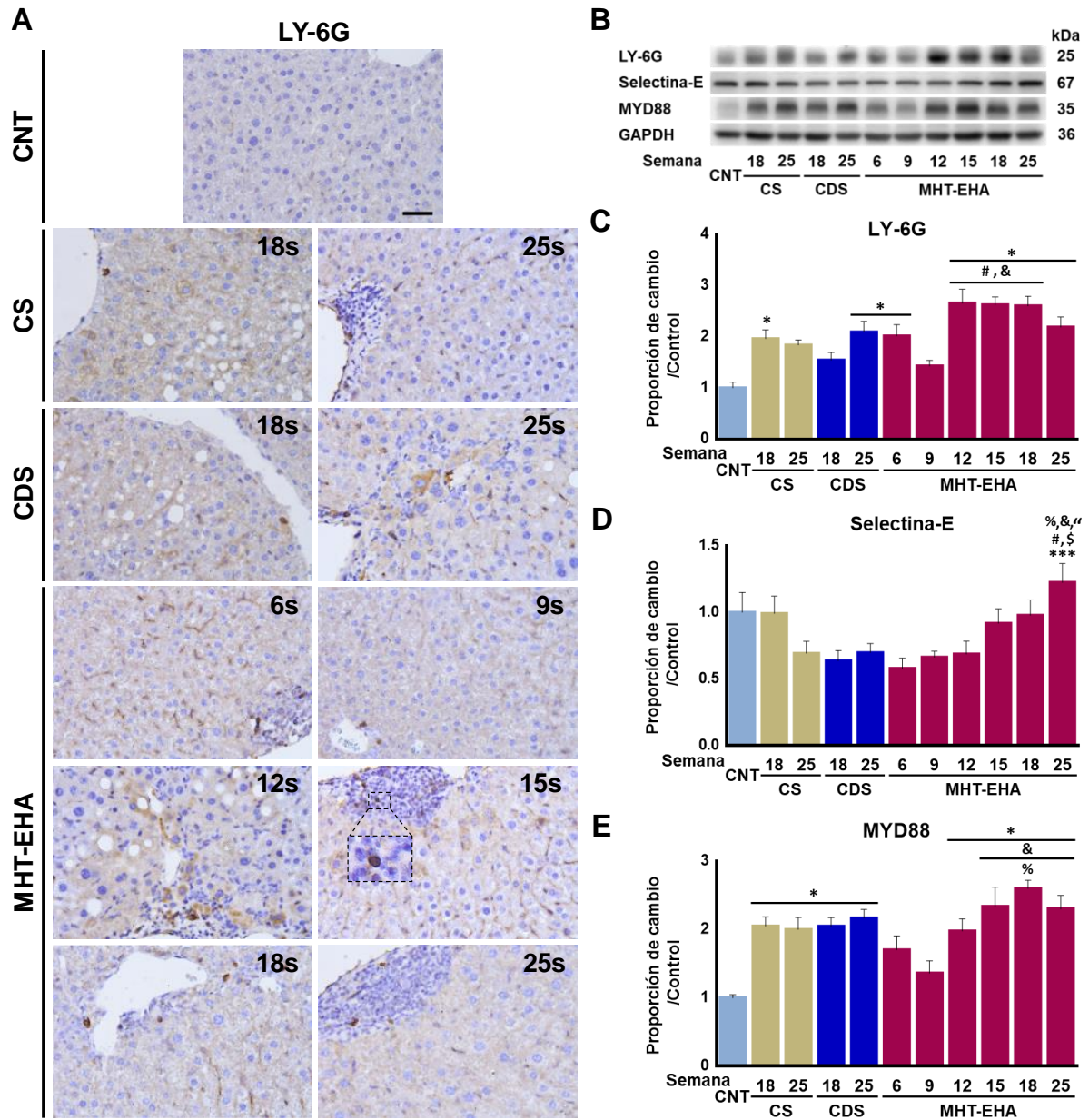


**Figura 12. Evaluación de la acumulación de grasa en el hígado de ratones expuestos al modelo MHT-EHA.** (A) Tinción de Rojo oleoso y (B) cuantificación del área positiva. La cuantificación se realizó en campos colectados con una amplificación inicial de la lente de 20x y la barra equivale a 40  $\mu$ m. (C) Análisis de WB y cuantificación de proteína total de FSP27. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores se expresan como veces de cambio del nivel en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s;  $p < 0.05$ . CNT: control no tratado; CS: control de sacarosa; CDS: control DEN-sacarosa; MHT-EHA: modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

#### 4.5 El modelo MHT-EHA promueve marcadores inflamatorios e inducibles por el LPS

La ingesta excesiva de etanol aumenta la circulación portal y sistémica de LPS, que potencia la lesión hepática inducida por el etanol a través de un mecanismo dependiente de la inflamación que implica la participación de los neutrófilos<sup>12</sup>. Por lo tanto, determinamos el efecto del modelo MHT-EHA sobre marcadores de células de linaje inmunitario e inducibles por el LPS, es decir, LY-6G, E-selectina y MYD88. Las células positivas a LY-6G, un marcador de neutrófilos<sup>5,42</sup>, se encontraron cerca de vasos sanguíneos, como las venas centrales, principalmente en el hígado de los animales sometidos al modelo MHT-EHA; sin embargo, también se observaron en los grupos CS y CDS, y en aquellos animales sacrificados a las 25 semanas, aunque en menor medida (**Figura 13A**). Por su parte, el nivel de la proteína LY-6G aumentó significativamente en el modelo MHT-EHA a las 6 semanas ( $p = 0.0097$ ), de las 12 a las 18 semanas (todos los grupos  $p < 0.0001$ ) y a las 25 semanas ( $p = 0.0012$ ) en comparación con el grupo CNT (**Figura 13B y C**). Además, el aumento del nivel de LY-6G entre las semanas 12 a 18 en el modelo MHT-EHA también fue significativo en comparación con el grupo CDS a las 18 semanas (todos los grupos  $p < 0.0057$ ). Del mismo modo, el nivel de LY-6G aumentó en el grupo CS a las 18 semanas en comparación con el grupo CNT ( $p = 0.0176$ ). Posteriormente se evaluó el nivel de E-selectina, un receptor de células endoteliales que estimula el reclutamiento temprano de neutrófilos y macrófagos del torrente sanguíneo a los sitios de inflamación<sup>43</sup>. El nivel de E-selectina mostró una tendencia a disminuir que no fue significativa de las 6 a las 12 semanas en el modelo MHT-EHA (**Figura 13B y D**); sin embargo, su nivel regresó a niveles basales de las 15 a las 18 semanas de tratamiento en comparación con el grupo CNT. De manera interesante, el restablecimiento del nivel de E-selectina a las 25 semanas fue significativo en comparación con el nivel de los grupos de 6 a 12 semanas de tratamiento (todos los grupos  $p < 0.0279$ ).

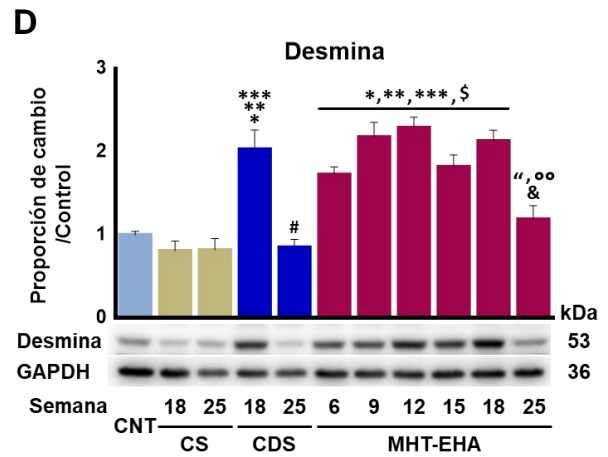
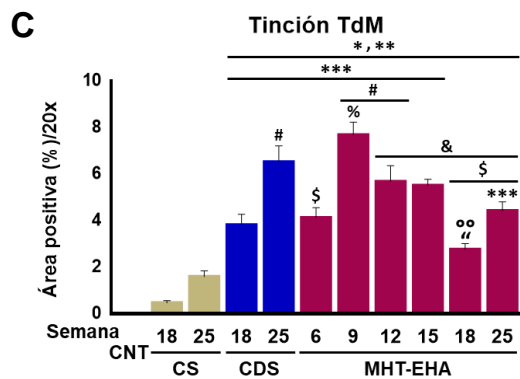
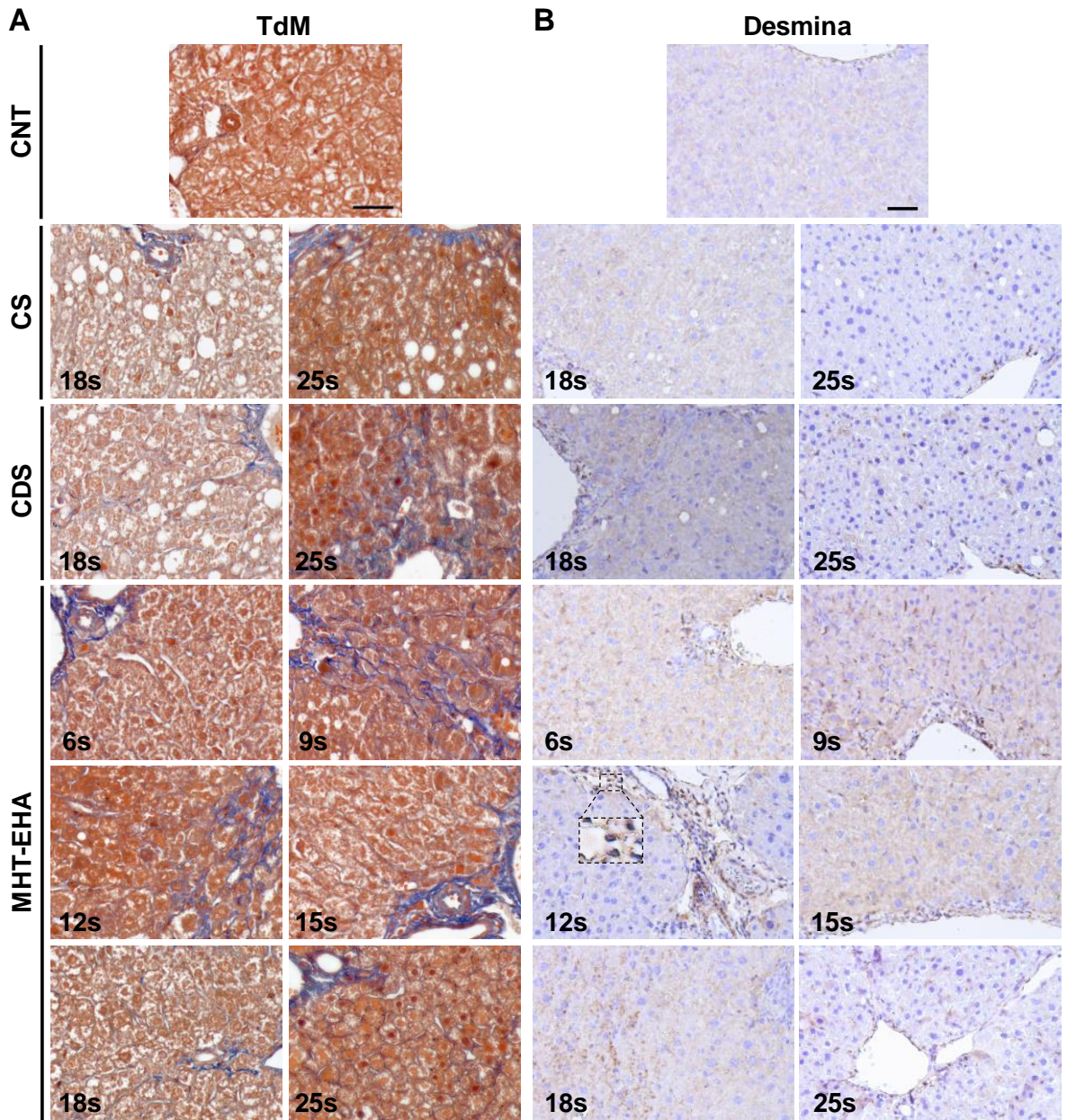
Finalmente, el nivel de MYD88, un transductor de señales en la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLR)<sup>44</sup>, aumentó en el modelo MHT-EHA entre las semanas 12 y 25 ( $p = 0.0084$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  y  $p = 0.0001$ , respectivamente; **Figuras 13B y E**); además, en los grupos CS y CDS a las 18 y 25 semanas también aumentó en comparación con el grupo CNT ( $p = 0.0034$ ,  $p = 0.0063$ ,  $p = 0.0036$  y  $p = 0.0008$ , respectivamente). Estos hallazgos indican que el modelo MHT-EHA promueve un entorno inflamatorio sostenido asociado con la participación de neutrófilos y probablemente, con la activación de la vía de señalización TLR/MYD88.



**Figura 13. Efecto del modelo MHT-EHA sobre marcadores de inflamación e inducibles por el LPS en el hígado de ratón. (A)** Análisis de IHQ para la detección de LY-6G. El recuadro en la imagen correspondiente a las 15s muestra en primer plano la marca positiva para LY-6G. La barra equivale a 40  $\mu$ m. **(B)** Análisis de WB y cuantificación de **(C)** LY-6G, **(D)** selectina-E y **(E)** MYD88 en extractos de proteína total. El nivel de las proteínas se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores están expresados como veces de cambio en el nivel en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s; \$ED del CDS25s; %ED del MHT-EHA6s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s;  $p < 0.05$ . CNT, control no tratado; CS, control de sacarosa; CDS, control DEN-sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

#### 4.6 El modelo MHT-EHA promueve el proceso de fibrosis

Durante el daño del tejido hepático promovido por varios hepatotóxicos, incluido el CCE, se reclutan células inflamatorias implicadas en la producción de citocinas y quimiocinas que pueden estimular la activación de las CEH y posteriormente, desencadenar la acumulación de colágeno en el parénquima y así promover la fibrosis<sup>45</sup>. Por lo tanto, determinamos el estatus de la acumulación de colágeno y la presencia de CEH en el tejido hepático. Observamos un aumento de la acumulación de fibras de colágeno a partir de las 6 a las 25 semanas en el tejido hepático de los animales sometidos al modelo MHT-EHA y en el grupo CDS en comparación con los grupos CNT ( $p \leq 0.0001$ ) y CS ( $p \leq 0.0040$ ) a las 18 semanas, respectivamente. Esta acumulación tenía un patrón pericelular y sinusoidal con aspecto de "malla de gallinero", una característica histológica clásica observada en la EHA (**Figura 14A y C**)<sup>2</sup>. A su vez, el tejido hepático de los animales expuestos al modelo MHT-EHA mostró una marca positiva para desmina, un marcador utilizado para identificar la presencia de CEH, principalmente en la región centrolobular, que fue evidente después de las 12 semanas de tratamiento (**Figura 14B**). El análisis de WB reveló que el nivel de la proteína incrementó de las 6 a las 18 semanas de tratamiento (todos los grupos  $p \leq 0.0240$ ) en el modelo MHT-EHA, así como, en el grupo CS a las 18 semanas ( $p = 0.0002$ ) en comparación con el grupo CNT (**Figura 14D**). Cabe destacar que el nivel de la desmina se observó de manera basal a las 25 semanas. Estas evidencias indican que el modelo MHT-EHA promueve la fibrogénesis y sugieren que la inducción de este proceso puede ser el resultado de la activación sostenida de las CEH debido al estímulo persistente de los hepatotóxicos.

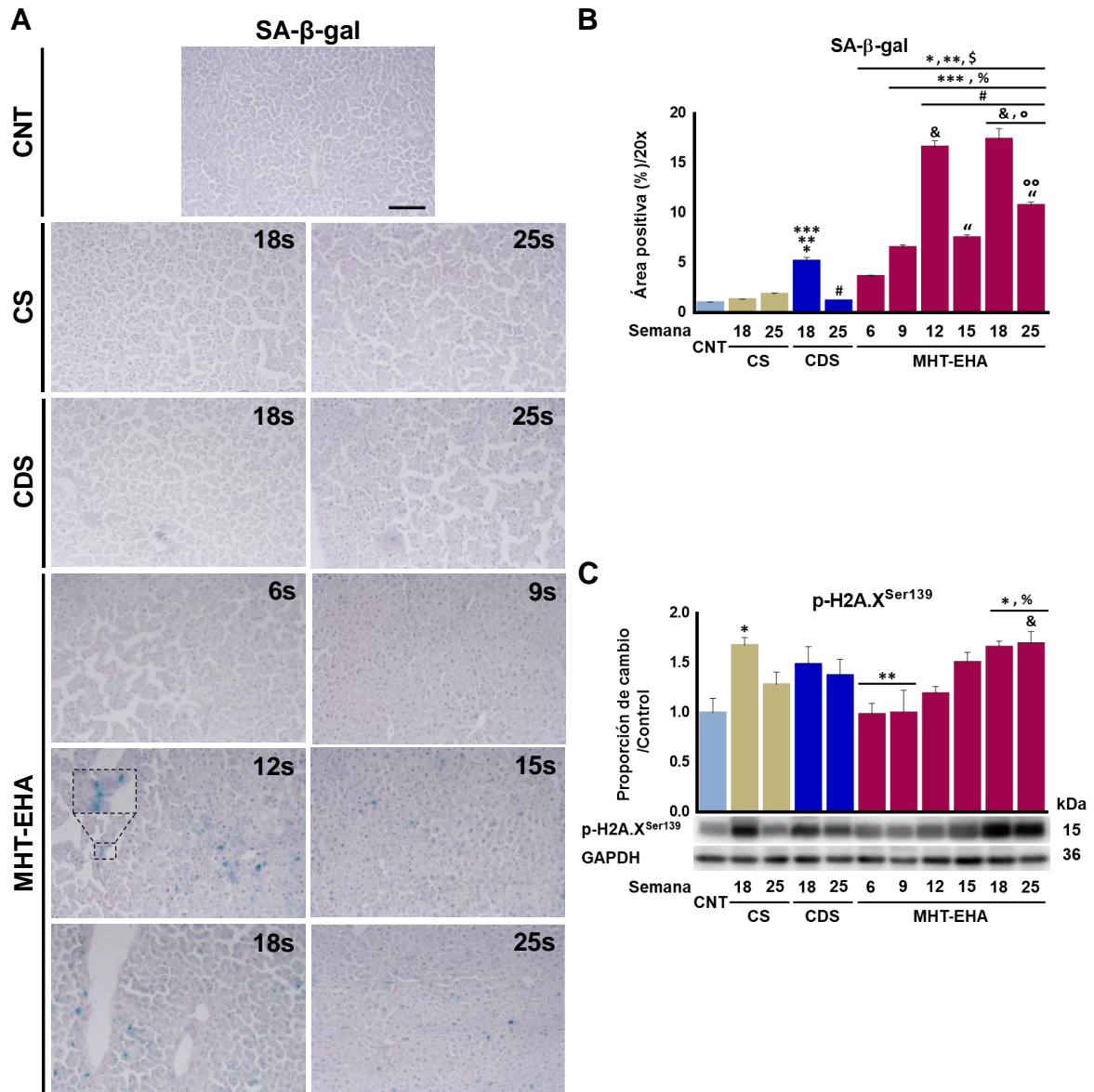




**Figura 14. Efecto del modelo MHT-EHA sobre marcadores de fibrosis en el hígado de ratón.** (A) Tinción TdM y (B) análisis de IHQ para la detección de desmina. El recuadro de la imagen correspondiente a 12s muestra en primer plano la marca positiva para desmina. (C) Cuantificación del área positiva de fibras de colágeno. La cuantificación se realizó en campos colectados con una amplificación inicial de la lente de 20x y la barra equivale a 40  $\mu$ m. (D) Análisis de WB y cuantificación de la desmina en extractos de proteína total. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores están expresados como veces de cambio en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s; §ED del CDS25s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s; °ED del MHT-EHA18s;  $p < 0.05$ . TdM: tinción tricrómica de Masson; CNT: control no tratado; CS: control de sacarosa; CDS: control DEN-sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

#### 4.7 El modelo MHT-EHA acelera la aparición marcadores de senescencia celular

La producción exacerbada de ERO, la inflamación persistente y el daño al ADN mitocondrial promovidos por el consumo excesivo de etanol han sido identificados como mecanismos moleculares desencadenantes del envejecimiento en los seres humanos<sup>46</sup>. La senescencia celular es la detención irreversible del ciclo celular que se produce en las células al experimentar señales de estrés y está estrechamente relacionada con las enfermedades hepáticas crónicas<sup>26,47</sup>. Para determinar si el modelo MHT-EHA promueve la senescencia celular, evaluamos el estatus de dos marcadores de senescencia; es decir, la actividad de la SA- $\beta$ -gal y el nivel de p-H2A.X<sup>Ser139</sup><sup>48</sup>. El análisis de IHQ reveló que la actividad de la SA- $\beta$ -gal aumentó progresivamente en el hígado de los animales expuestos al modelo MHT-EHA desde las 6 y hasta las 18 semanas, lo cual persistió después de siete semanas de haber retirado la exposición a los hepatotóxicos, en comparación con los grupos CNT (todos los grupos  $p \leq 0.0006$ ) y CS (todos los grupos  $p \leq 0.0059$ ; **Figura 15A y B**). Esta actividad también aumentó a las 18 semanas en el grupo CDS en comparación con los grupos CNT ( $p < 0.0001$ ) y CS ( $p \leq 0.0059$ ) a las 18 y a las 25 semanas. El análisis de WB demostró que el modelo MHT-EHA aumentó progresivamente el nivel de p-H2A.X<sup>Ser139</sup> desde las 12 y hasta las 15 semanas de tratamiento; sin embargo, este aumento sólo fue significativo a las 18 ( $p = 0.0449$ ) y 25 ( $p = 0.0270$ ) semanas, en comparación con el grupo CNT ( $p = 0.0282$ ; **Figura 15C**). En el grupo CDS también se observó una tendencia de incremento, sin embargo, éste fue significativo en el grupo CS a las 18 semanas ( $p = 0.0369$ ) en comparación con el grupo CNT. Estos datos indican que el modelo MHT-EHA acelera la aparición de marcadores de senescencia celular muy probablemente inducida por la activación de los procesos inflamatorios antes descritos, así como por el daño al ADN evidenciado por el incremento del nivel de la proteína p-H2A.X<sup>Ser139</sup> en el tejido hepático de los animales sometidos a dicho modelo.

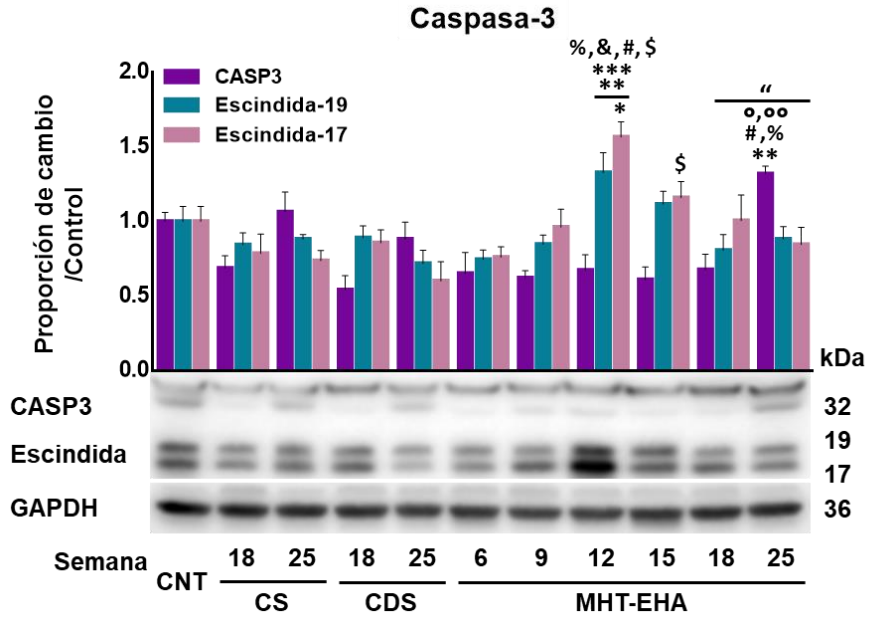


**Figura 15. Efecto del modelo MHT-EHA sobre la senescencia celular en el hígado de ratón.** (A) Análisis de IHQ para detectar la actividad de la SA- $\beta$ -gal *in situ*. El recuadro de la imagen correspondiente a 12s muestra en primer plano la marca positiva a la actividad. (B) Cuantificación del área positiva de la actividad de la SA- $\beta$ -gal. La cuantificación se realizó en campos colectados con una amplificación inicial de la lente de 20x y la barra equivale a 100  $\mu$ m. (C) Análisis de WB y cuantificación de p-H2A.X<sup>Ser139</sup> en extractos de proteína total. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores se expresan como veces de cambio en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s; \$ED del CDS25s; %ED del MHT-EHA6s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s; °ED del MHT-EHA15s; °°ED del MHT-EHA18s;  $p < 0.05$ . CNT, control no tratado; CS, control de sacarosa; CDS, control DEN-sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

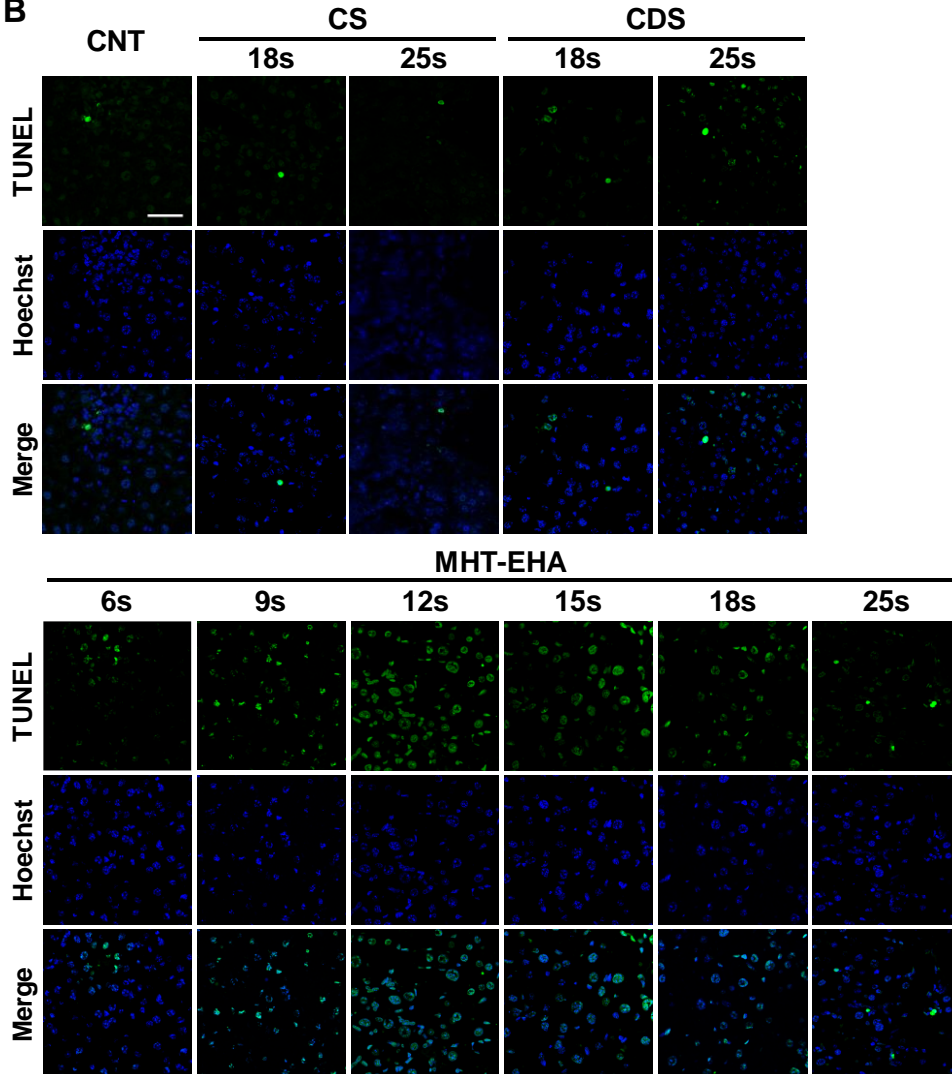
#### **4.8 El modelo MHT-EHA promueve la muerte de las células hepáticas**

El metabolismo del etanol incrementa la producción de ERO, la inflamación local y desencadena la activación de las vías dependientes e independientes de CASP3 que, en última instancia, conducen a la apoptosis de las células hepáticas<sup>49</sup>. Aquí, evaluamos el nivel de la proteína CASP3, una caspasa efectora que requiere del procesamiento proteolítico de su zimógeno en las subunidades p17 y p12 activadas, es decir, CASP3-escindida<sup>50</sup>, en los animales sometidos al modelo MHT-EHA. El nivel de la CASP3-escindida-17 aumentó a las 12 semanas ( $p = 0.0330$ ); no obstante, se observó una tendencia de incremento tanto en el nivel de la CASP3-escindida-19 a las 12 semanas como en el de la CASP3-escindida-19 y -17 a las 15 semanas en comparación con el grupo CNT (**Figura 16A**). Cabe destacar que la forma inactiva de CASP3 mostró una tendencia de aumento a las 25 semanas; por el contrario, el nivel de la forma activa de CASP3 mostró una tendencia de aumento de las 6 a las 15 semanas del tratamiento. También determinamos la fragmentación del ADN, una característica clave de la apoptosis celular<sup>49</sup>, mediante el ensayo de TUNEL. Detectamos un aumento de las células TUNEL-positivas entre las semanas 6 y 18 en el hígado de los animales sometidos al modelo MHT-EHA que alcanzó un pico máximo de la señal a las 12 semanas (**Figura 16B**); sin embargo, ésta disminuyó a las 25 semanas. Estas evidencias demuestran claramente que el modelo MHT-EHA promueve la apoptosis de las células hepáticas a través de un mecanismo dependiente de la CASP3.

A



B



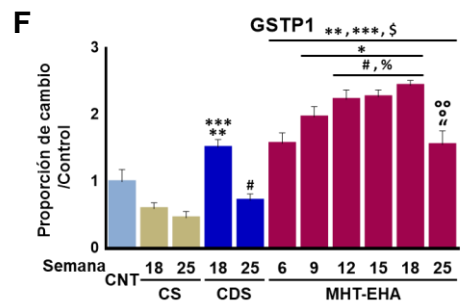
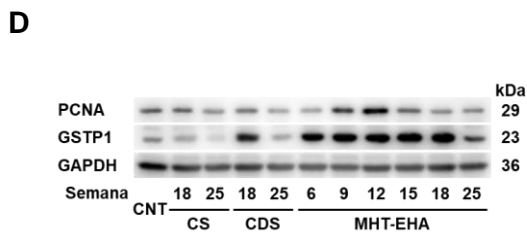
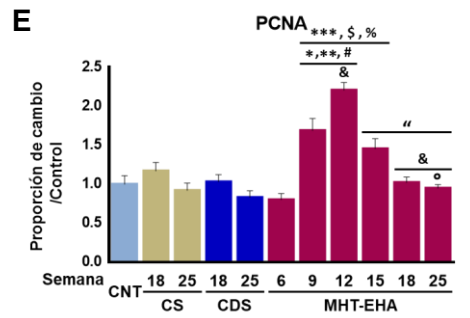
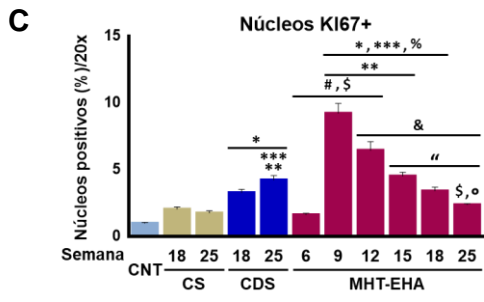
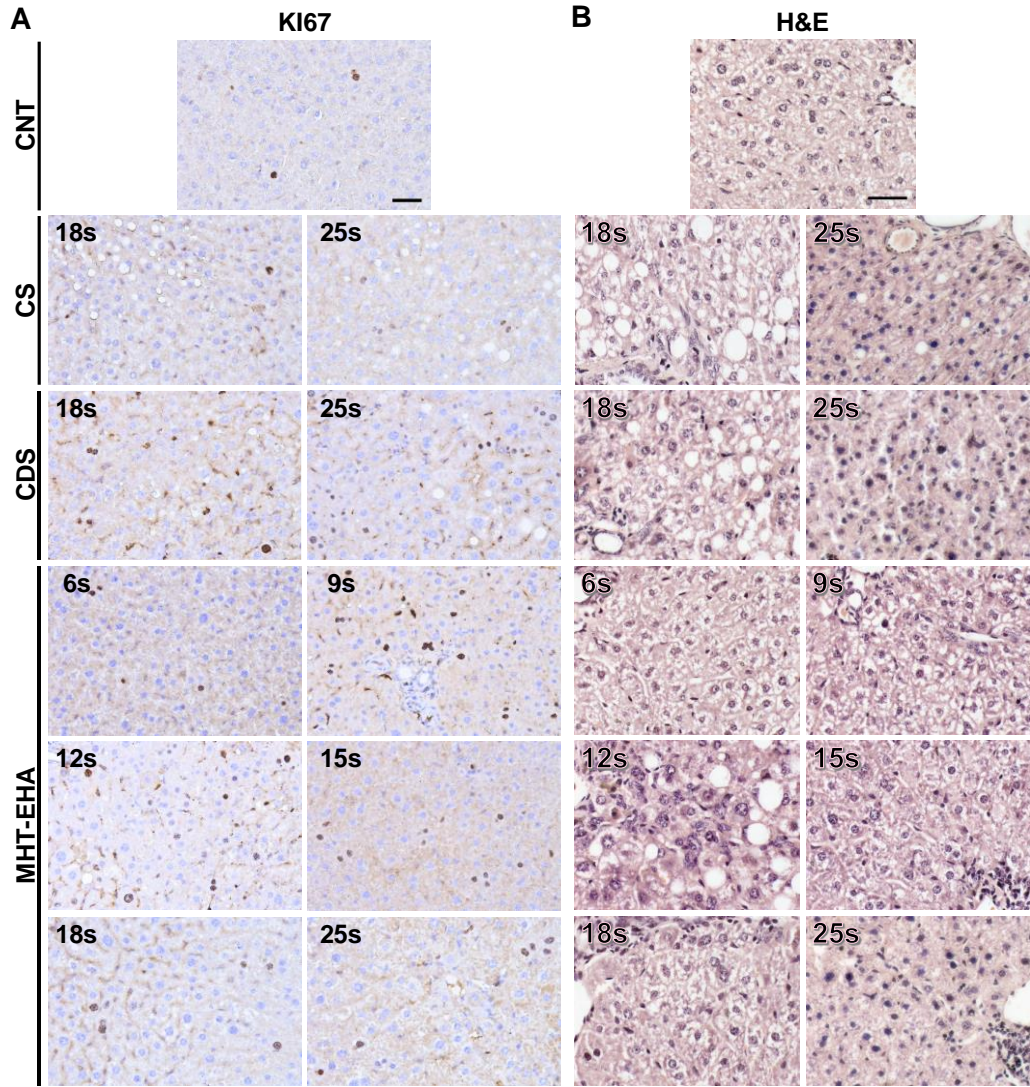
**Figura 16. Efecto del modelo MHT-EHA sobre la muerte celular en el hígado de ratón.** (A) Análisis de WB y cuantificación de la CASP3 en extractos de proteína total. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores están expresados como veces de cambio en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar. (B) Ensayo de TUNEL. La barra equivale a 40  $\mu$ m.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s; §ED del CDS25s; %ED del MHT-EHA6s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s; °ED del MHT-EHA15s; °°ED del MHT-EHA18s;  $p < 0.05$ . CNT: control no tratado; CS: control de sacarosa; CDS: control DEN-sacarosa; MHT-EHA: modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica; TUNEL: Marcaje del extremo 3'-hidroxilo del ADN fragmentado con dUTP, mediado por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal.

#### 4.9 El modelo MHT-EHA promueve la proliferación celular y la hepatocarcinogénesis

Algunas de las características clave de las células cancerosas es su capacidad para mantener la señalización proliferativa y la resistencia a la muerte celular, rasgos que en conjunto pueden indicar malignidad<sup>51</sup>. Para determinar si el modelo MHT-EHA promueve la proliferación celular y como resultado, estimula la hepatocarcinogénesis, primero, evaluamos el estatus de los marcadores de proliferación ampliamente conocidos, KI67 y PCNA<sup>17,52</sup>. El modelo MHT-EHA incrementó el número de núcleos KI67-positivos de las 9 a las 18 semanas, en comparación con los grupos CNT (todos los grupos  $p < 0.0001$ ) y CS a las 25 semanas ( $p \leq 0.0463$ ; **Figuras 17A y C**). En el grupo CDS, este marcador también incrementó en comparación con el grupo CNT a las 18 y a las 25 semanas ( $p = 0.0004$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente). Sin embargo, el mismo marcador disminuyó progresivamente de las 9 a las 25 semanas. Como se muestra en la **figura 17D y E**, el nivel del marcador PCNA fue incrementado por el modelo MHT-EHA a las 9 y 12 semanas ( $p = 0.0008$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente) en comparación con el grupo CNT. Al igual que los núcleos KI67-positivos, el nivel de PCNA disminuyó progresivamente de las 15 a las 25 semanas. Estos datos indican que el modelo MHT-EHA promueve la proliferación celular desde etapas tempranas de la progresión de la EHA, que después disminuye, posiblemente, como resultado de un

proceso de adaptación de las células hepáticas a los efectos tóxicos de los diferentes insultos.

El estadio más avanzado de la EHA es la aparición del cáncer de hígado, principalmente el CHC, una neoplasia maligna altamente agresiva<sup>36</sup>. Mediante el análisis histopatológico y la cuantificación del nivel de la proteína GSTP1, un marcador bien caracterizado del CHC<sup>17</sup>, determinamos la capacidad del modelo MHT-EHA para promover la hepatocarcinogénesis. Mediante la tinción de H&E, una metodología que revela la conformación de estructuras tisulares, observamos que todos los grupos de animales sometidos al modelo MHT-EHA mostraron una desorganización estructural del parénquima hepático (**Figura 17B**). En consenso, se observó una desorganización de los cordones de hepatocitos, pleomorfismo celular como balonamiento celular, núcleos y citoplasma agrandados, polimorfismo e hiperchromasia nuclear, citoplasmas vacíos e indefinidos. Además, también se observaron grandes vesículas translúcidas e infiltrado inflamatorio leve en el tejido hepático de los animales sometidos al modelo MHT-EHA, principalmente después de 12 semanas de tratamiento. No obstante, los tejidos de los grupos anteriores a este tiempo también mostraron algunas de esas características. Como se esperaba, los tejidos de los grupos CS y CDS mostraron un mayor número de vesículas translúcidas a las 18 semanas, probablemente, como resultado de la acumulación de grasa tisular. Es importante destacar que las alteraciones histológicas antes descritas persistieron hasta las 25 semanas. Por otra parte, el nivel de la proteína GSTP1 aumentó progresivamente entre las semanas 9 y 18 en el hígado de los animales sometidos al modelo MHT-EHA, en comparación con los grupos CNT, CS a las 18 y el de 25 semanas (todos  $p \leq 0.0003$ ; **Figura 17D y F**). A su vez, el nivel del marcador GSTP1 fue similar entre el modelo MHT-EHA a las 25 semanas y el grupo CDS a las 18 semanas. Estos hallazgos demuestran que el modelo MHT-EHA promueve rasgos histopatológicos asociados con la progresión del CHC y estimula la aparición del marcador de hepatocarcinogénesis GSTP1. De esta manera, el modelo MHT-EHA tiene la cualidad de promover etapas avanzadas de la EHA.





**Figura 17. Efecto del modelo MHT-EHA sobre la proliferación celular y la carcinogénesis hepática.** (A) Tinción de H&E para el análisis histopatológico. (B) Análisis de IHQ para la detección del marcador de proliferación KI67 y (C) cuantificación de los núcleos KI67-positivos. La cuantificación se realizó en campos colectados con una amplificación inicial de la lente de 20x y la barra equivale a 40  $\mu$ m. (D) Análisis de WB y cuantificación de (E) PCNA y (F) GSTP1 en extractos de proteína total. El nivel de proteína se normalizó con el nivel de GAPDH, proteína utilizada como control de carga. Los valores están expresados como veces de cambio en comparación con los controles. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar.  $n = 5$  animales/grupo. \*ED del CNT; \*\*ED del CS18s; \*\*\*ED del CS25s; #ED del CDS18s; \$ED del CDS25s; %ED del MHT-EHA6s; &ED del MHT-EHA9s; "ED del MHT-EHA12s; °ED del MHT-EHA15s; °°ED del MHT-EHA18s;  $p < 0.05$ . CNT, control no tratado; CS, control de sacarosa; CDS, control DEN-sacarosa; MHT-EHA, modelo de múltiples hepatotóxicos-enfermedad hepática alcohólica.

## Capítulo 5. Discusión

Una gran variedad de modelos animales ha contribuido significativamente en la caracterización de la progresión de la EHA, dado que la exposición al CCE bajo diferentes esquemas reproduce algunas etapas asociadas a dicha enfermedad<sup>27-31</sup>. Sin embargo, el desarrollo de un modelo que recapitule el espectro cronológico completo de los trastornos asociados a la EHA en seres humanos, especialmente los estadios más avanzados, como el cáncer hepático, no ha sido posible. Las alteraciones asociadas a la EHA son el resultado de la interacción del etanol con muchos otros agentes hepatotóxicos y están estrechamente relacionados con los patrones de consumo del etanol<sup>28</sup>. En este trabajo, determinamos experimentalmente la capacidad combinada de diferentes hepatotóxicos para inducir las etapas que caracterizan la progresión de la EHA en seres humanos. Para esto, administramos diferentes hepatotóxicos como el etanol, la sacarosa, los LPS y la DEN de manera crónica como ocurre en el ser humano durante un periodo corto de tiempo.

El CCE exacerba la producción de ERO, que desencadena un desequilibrio redox celular, incrementa la permeabilidad de la membrana intestinal, aumenta la liberación de LPS al torrente sanguíneo y como resultado estimula la inflamación del tejido hepático<sup>12</sup>. De la misma forma, se ha demostrado que la administración exógena y prolongada de LPS en modelos experimentales favorece el crecimiento bacteriano y la disbiosis, potencia el daño hepático y perpetúa la liberación de citoquinas, la infiltración de células inmunitarias y la fibrosis<sup>13</sup>. Por otro lado, los seres humanos están expuestos regularmente a una variedad de nitrosaminas, incluida la DEN, que puede encontrarse en el medio ambiente de las sociedades industrializadas, el humo del tabaco, el agua contaminada y los alimentos envasados; por lo tanto, puede actuar sinérgicamente como cofactor de riesgo para el desarrollo del CHC en hígados expuestos al CCE<sup>8</sup>. El metabolismo de la DEN también incrementa la producción de ERO, altera los sistemas antioxidantes endógenos y puede desencadenar la formación de aductos en el ADN<sup>18</sup>. A su vez, la ingesta elevada de azúcar altera el metabolismo lipídico hepático y estimula la lipogénesis *de novo* que propicia la acumulación de grasa tisular tras el CCE<sup>23</sup>. Esta

combinación del consumo elevado de azúcares y alcohol es típica de las dietas de tipo occidental<sup>53</sup>. Adicional a los agentes hepatotóxicos antes mencionados y debido a que se ha demostrado que una única dosis compulsiva de etanol puede ser suficiente para generar daños irreversibles en el tejido hepático<sup>2,28</sup>, el modelo MHT-EHA también contempló episodios de consumo compulsivo de etanol, debido a que los seres humanos consumen esta sustancia psicoactiva tanto de manera crónica como en episodios aislados de ingesta aguda.

Estudios clínicos han demostrado que los alcohólicos diagnosticados con hígado graso tienen un PC inferior en comparación con los individuos sanos, lo que se ha asociado con una alteración de los mecanismos que regulan la lipogénesis *de novo*, así como con una disminución de la producción de adiponectina<sup>21</sup>. Por su parte, estudios experimentales han revelado que el CCE disminuye la masa grasa debido a la lipólisis del tejido adiposo y a la degradación de los triglicéridos en ácidos grasos libres, que se liberan en la circulación y se almacenan en el hígado<sup>21</sup>. Nuestros resultados demostraron que el modelo MHT-EHA disminuye el PC de los animales en comparación con los que no fueron sometidos al CCE (**Figura 10**). Esta evidencia es consistente con un informe previo que muestra que estos hepatotóxicos disminuyen la ganancia de PC en el ratón incluso cuando se administran con una dosis menor de DEN y durante un período de tiempo más corto, es decir, de solo 10 semanas<sup>32</sup>. Otra investigación demostró que en ratones sometidos al CCE mediante una dieta líquida rica en grasas en combinación con una dosis compulsiva de etanol por un periodo de 10 días, disminuye su PC en los dos primeros días, pero éste se recupera al final del periodo experimental<sup>28</sup>. Nuestros resultados demuestran que la pérdida del PC de los animales sometidos al modelo MHT-EHA persistió incluso siete semanas después de haber suspendido la exposición a los agentes hepatotóxicos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en estudios realizados en seres humanos<sup>21</sup>.

El incremento de las ERO es un factor clave en la progresión de los estadios iniciales de la EHA hacia el cáncer de hígado<sup>38</sup>. Las enzimas ADH1A y CYP2E1 participan en el metabolismo del etanol y aumentan la producción de ERO, además, la CYP2E1 también interviene en el metabolismo de la DEN y favorece la incidencia y

multiplicidad tumoral<sup>18,32,39,54</sup>. Por otra parte, el comportamiento de la NXN, una enzima oxidorreductasa y redox-sensible que elimina a las ERO<sup>40</sup>, también se ha visto alterada por el CCE y por otros agentes hepatotóxicos en sistemas *in vitro* e *in vivo*<sup>10,41</sup>. En esta investigación, el modelo MHT-EHA y el grupo CDS incrementaron el nivel de la enzima ADH1A (**Figura 11**), lo cual concuerda con reportes previos que demuestran que el CCE en combinación con una dieta líquida rica en grasas aumenta su nivel<sup>55</sup>. Además del metabolismo del etanol, la ADH1A interviene en el metabolismo de otros compuestos como el 4-hidroxinonenal, un producto de la peroxidación lipídica<sup>56</sup>, y puede funcionar como una vía oxidativa alterna para varios fármacos que se metabolizan principalmente mediante el sistema de citocromos P450<sup>57</sup>. Nuestros resultados demostraron que el nivel de la ADH1A también incrementa en el hígado de los animales tratados únicamente con sacarosa y sacarosa más DEN, lo que sugiere que esta enzima puede ser activada por el metabolismo lipídico hepático y/o la lipogénesis *de novo* alterados por la ingesta de sacarosa, lo cual es un fenómeno atractivo que debe ser investigado.

Numerosos protocolos de EHA aumentan el nivel de la CYP2E1 en respuesta al consumo de etanol<sup>55,58</sup>. Nuestras pruebas demuestran que el nivel de la CYP2E1 es disminuido por el modelo MHT-EHA (**Figura 11**). Otras investigaciones han mostrado resultados similares cuando el etanol fue administrado en el agua de beber junto con una dieta rica en grasas<sup>59</sup>. Además, en el hígado de animales administrados con DEN a diferentes dosis, ya sea solo o en combinación con etanol, el nivel de la CYP2E1 también disminuye<sup>32</sup>. Estas evidencias apoyan la propuesta que plantea que otros citocromos podrían participar en el metabolismo del etanol y de la DEN<sup>54,60</sup>. Dada la relevancia de la NXN como enzima antioxidante y reguladora de la homeostasis redox celular<sup>61</sup>, también determinamos su estatus y demostramos que su nivel es incrementado por el modelo MHT-EHA y por los tratamientos CS y CDS, incluso después de que los agentes hepatotóxicos habían sido retirados (**Figura 11**). Con base en su actividad antioxidante, estos resultados sugieren que el aumento del nivel de la NXN tiene como objetivo proteger a las células del daño oxidativo generado por el aumento de las ERO, el cual es promovido por los diferentes agentes hepatotóxicos que conforman el modelo<sup>61</sup>.

Los azúcares añadidos, principalmente la sacarosa y la fructosa, favorecen el desarrollo del hígado graso<sup>20</sup>, y el CCE lo exagera y propicia alteraciones más complejas<sup>21,23</sup>. Las dietas ricas en sacarosa favorecen los desórdenes metabólicos, la esteatosis, la síntesis de ácidos grasos, la lipogénesis *de novo*, el daño oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico, entre otras alteraciones observadas en el hígado de los ratones<sup>20</sup>. La ingesta compulsiva de etanol o una dieta rica en grasas en combinación con varias dosis compulsivas inducen el estrés del retículo endoplásmico seguido de la activación de la proteína 3 de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico-similar a la proteína 3 (CREB3L3) y su posterior translocación nuclear que, a su vez, regula positivamente la forma predominante de la proteína FSP27. Ésta interactúa con las proteínas de membrana de las gotas lipídicas y posteriormente favorece la formación de las gotas de lípidos y la esteatosis<sup>22</sup>. Aunque el nivel de FSP27 se incrementó en el modelo MHT-EHA y en los grupos CS y CDS, lo que podría explicar en parte la acumulación de grasa en los animales sometidos a todos los tratamientos, se observó un aumento significativo de la esteatosis macrovesicular únicamente en los grupos CS y CDS (**Figura 12**). Una posible explicación para la disminución de la acumulación de grasa en el modelo MHT-EHA con respecto a los otros grupos, es que el carcinógeno DEN estimula la proliferación celular anormal, lo cual conduce a un aumento del gasto energético en el microambiente celular; de tal manera que la grasa acumulada en el hígado representa una fuente de energía disponible para la rápida proliferación y crecimiento celular inducidos por la DEN. Otra posibilidad es que la DEN podría interferir en el proceso de señalización de la lipogénesis *de novo* promovida por la sacarosa. Aunque estos planteamientos no fueron abordados en esta investigación, representan propuestas alentadoras que deben ser investigadas.

La progresión del hígado graso a la esteatohepatitis es un requisito previo que da paso hacia los estadios más avanzados de la EHA. En el contexto del CCE, la inflamación hepática es potenciada por el aumento de la liberación de patrones moleculares asociados a patógenos de origen intestinal, como los LPS<sup>2,12</sup>. La inflamación también se ve favorecida por los patrones moleculares asociados al daño liberados por los hepatocitos moribundos, como el ADN mitocondrial, y por el

aumento de las respuestas inmunitarias adaptativas inducidas por neoantígenos, como los aductos proteicos inducidos por las ERO y por el acetaldehído<sup>2</sup>. Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa inmunitaria en respuesta a una infección o a una lesión tisular y son rápidamente reclutados para limitar el daño potencial; sin embargo, una respuesta prolongada de los neutrófilos también puede ser contraproducente y causar daños en el tejido. Una característica patológica distintiva del daño hepático asociado a la EHA es la infiltración hepática de neutrófilos observada tanto en pacientes como en modelos animales de EHA<sup>5</sup>. En el hígado de los animales sometidos al modelo MHT-EHA, el análisis de IHQ para detectar a LY-6G, un marcador de neutrófilos, monocitos y granulocitos periféricos<sup>42</sup>, reveló que las células positivas a LY-6G aumentaron cerca de vasos sanguíneos como las venas centrales, hallazgo que fue confirmado con el análisis de WB. A su vez, el nivel de E-selectina, un receptor de células endoteliales que inicia el reclutamiento temprano de neutrófilos y macrófagos sanguíneos a los focos inflamatorios<sup>43</sup>, mostró una tendencia decreciente que se restauró progresivamente durante las últimas semanas en el modelo MHT-EHA (**Figura 13**). Previamente se ha reportado que una dieta alta en grasas combinada con una única o múltiples dosis compulsivas de etanol aumenta tanto la expresión de *Ly-6g* como la infiltración de neutrófilos hepáticos<sup>5</sup>. Aunque la E-selectina se ha identificado como uno de los principales mediadores de la infiltración de neutrófilos inducida por el consumo de etanol tanto agudo como crónico<sup>43</sup>, otros mediadores del proceso inflamatorio, como la quimiocina 1 con motivo C-X-C (CXCL1), han mostrado una mayor regulación positiva, ya que su bloqueo reduce la infiltración de neutrófilos y mejora el daño hepático y la fibrosis<sup>5</sup>. Por lo tanto, la infiltración de neutrófilos inducida por el modelo MHT-EHA y evidenciada mediante la detección del marcador LY-6G podría estar regulada por otros mediadores proinflamatorios.

El nivel de MYD88 también fue evaluado ya que el CCE aumenta la cantidad de los LPS circulantes que, a su vez, es detectada por la vía de señalización de TLR/MYD88 y posteriormente, activa la expresión de genes proinflamatorios. Curiosamente, la activación de esta vía también favorece la carcinogénesis y la metástasis en varios tipos de cáncer en el ser humano<sup>62</sup>. Tanto el modelo MHT-EHA

como los grupos CS y CDS aumentaron significativamente el nivel de la proteína MYD88 (**Figura 13**). De esta forma, aunque se han identificado diferencias significativas entre el sistema inmunitario innato de los seres humanos y los ratones, por ejemplo, la proporción de neutrófilos y linfocitos en el torrente sanguíneo<sup>28,43</sup>, nuestros datos indican que el modelo MHT-EHA promueve un entorno inflamatorio asociado con el reclutamiento de neutrófilos y la participación de MYD88, que reproduce en parte, uno de los signos característicos de la EHA en seres humanos. La inflamación inducida por el CCE también estimula el reclutamiento de macrófagos derivados de la médula ósea y residentes del hígado, que posteriormente promueven la producción de citocinas, quimiocinas y ERO, así como la activación de las CEH. Las CEH activadas secretan componentes de la matriz extracelular que se acumulan para formar tejido cicatricial; sin embargo, la activación sostenida de las CEH puede desencadenar la fibrosis<sup>45</sup>. En esta investigación, observamos que la acumulación de fibras de colágeno y el número de células positivas a desmina, un marcador de CEH<sup>45</sup>, aumentó en los animales sometidos a los protocolos que incluyeron la administración de DEN; es decir, el modelo MHT-EHA y el grupo CDS (**Figura 14**). Aunque el nivel de desmina fue reestablecido después de retirar los agentes hepatotóxicos, la acumulación de fibras de colágeno persistió, lo que sugiere el establecimiento irreversible del proceso de fibrosis. Esta evidencia indica que el modelo MHT-EHA también tiene el potencial de promover la fibrosis.

La producción exacerbada de ERO, la inflamación persistente y otros trastornos derivados del CCE aceleran el envejecimiento en seres humanos ya que inducen la senescencia celular, una detención irreversible del ciclo celular que precede al establecimiento de las últimas fases de las enfermedades hepáticas crónicas<sup>26,46,47</sup>. En la presente investigación, demostramos que la actividad enzimática de la SA- $\beta$ -gal, un conocido marcador de senescencia celular, fue incrementada progresivamente por el modelo MHT-EHA y por el grupo CDS, y persistió tras la eliminación de los hepatotóxicos (**Figura 15**), un fenómeno también observado en cultivos de hepatocitos expuestos a etanol<sup>63</sup>. Además, p-H2A.X<sup>Ser139</sup> es un marcador sensible de rupturas de doble cadena de ADN y del acortamiento de los telómeros,

dos acontecimientos importantes en la senescencia celular<sup>48</sup>. Nuestros resultados muestran que el nivel de p-H2A.X<sup>Ser139</sup> aumentó en el modelo MHT-EHA (**Figura 15**). De manera interesante, se ha documentado que la inhibición de la senescencia celular inducida por el CCE mejora el daño hepático, lo que sugiere que la senescencia desempeña un papel clave en la progresión de la EHA<sup>63,64</sup>. Por lo tanto, estos datos indican que el modelo MHT-EHA induce la senescencia celular y el daño al ADN, los cuales contribuyen a la progresión de la EHA.

En gran medida, la progresión de la EHA es determinada por el equilibrio entre la muerte celular y las respuestas adaptativas de supervivencia celular en el hígado expuesto al CCE<sup>2</sup>. Una de las principales características de la hepatitis alcohólica es el índice elevado de muerte de las células hepáticas mediante el proceso de apoptosis. El metabolismo del etanol desencadena la activación de varias vías de muerte celular, incluidas las vías dependientes e independientes de CASP3, además de la fragmentación del ADN mediada por caspasas, una característica clave de la apoptosis celular<sup>49</sup>. La CASP3 es una caspasa efectora implicada en la fase de ejecución de la apoptosis, cuya activación requiere del procesamiento proteolítico de su zimógeno en subunidades activadas, es decir, la CASP3-escindida, cuya inhibición previene la fibrosis y mejora la esteatohepatitis en ratones<sup>50</sup>. Nosotros demostramos que el modelo MHT-EHA aumentó el nivel de la CASP3-escindida de las 6 a las 12 semanas, pero ésta disminuyó progresivamente a las 25 semanas, lo que en parte puede ser resultado de la suspensión de la exposición a los agentes hepatotóxicos (**Figura 16**). Este hallazgo concuerda con resultados previos que muestran que el CCE promueve la progresión de la EHA a través de la apoptosis mediada por caspasas<sup>58</sup>. En la presente investigación, demostramos que el modelo MHT-EHA promueve la apoptosis de las células hepáticas de una manera dependiente de la activación de CASP3; sin embargo, también podrían estar implicados otros tipos de muerte celular, esto debido a que diferentes tipos de muerte celular podrían ser inducidos durante las distintas etapas de la enfermedad hepática crónica. En este sentido, previos reportes han descrito que mientras la apoptosis es el tipo de muerte celular predominante durante la esteatosis, la necrosis es característica de la hepatitis alcohólica<sup>49</sup>.



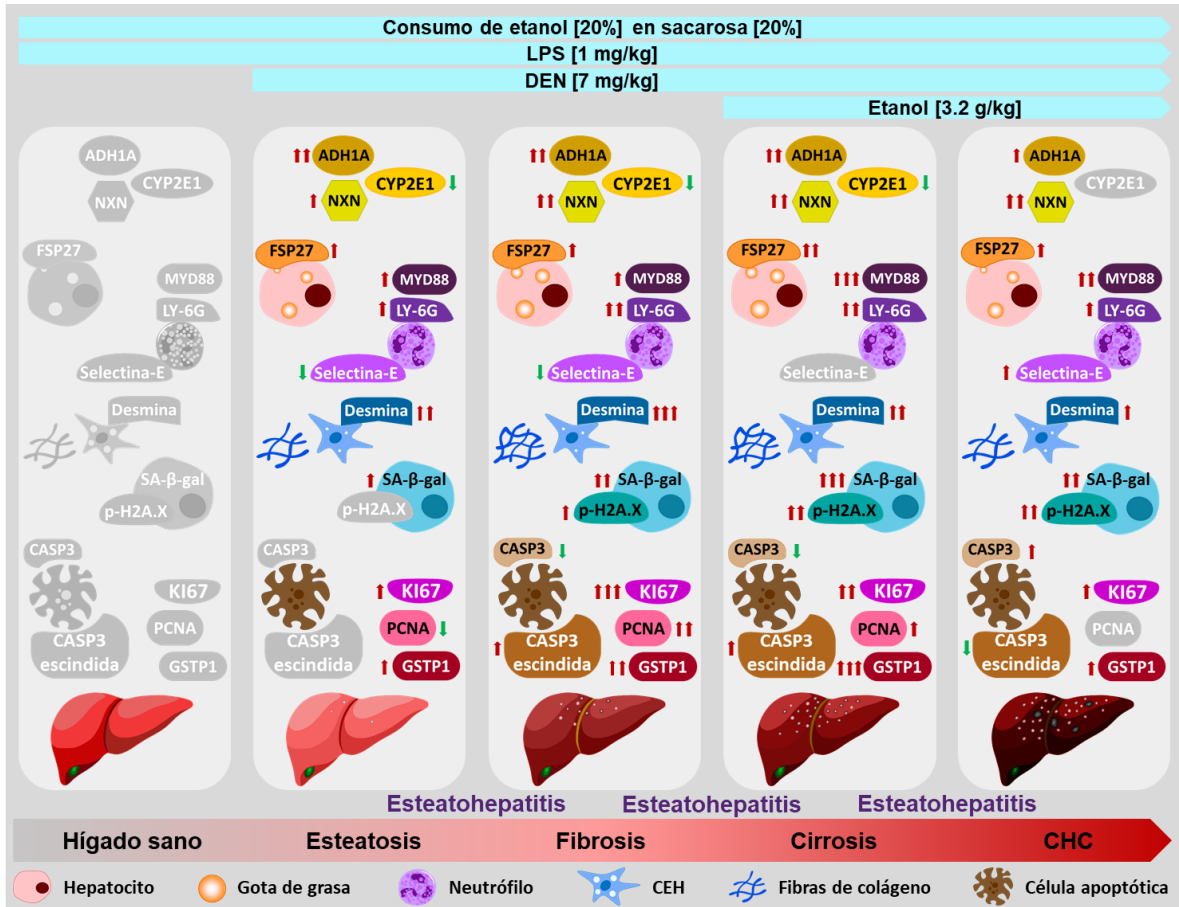
En la actualidad, pocos modelos animales logran recapitular los estadios más avanzados de la EHA. Un rasgo importante de las células cancerosas es su capacidad para mantener la señalización proliferativa y la resistencia a la muerte celular que, junto con otros rasgos, dictan la malignidad de las células<sup>51</sup>. Las evidencias epidemiológicas indican que el CCE aumenta el riesgo de desarrollar tumores en muchos órganos, incluido el hígado<sup>15</sup>. El acetaldehído es un metabolito genotóxico, mutagénico y clastogénico producido por la biotransformación del etanol que provoca varios daños celulares, como aberraciones cromosómicas y aductos en el ADN, lípidos y proteínas los cuales, a su vez, activan una respuesta inmune adaptativa sostenida y el reclutamiento persistente de linfocitos<sup>8,15</sup>. A pesar de que varios estudios han identificado la contribución del CCE en el desarrollo del cáncer, ningún modelo de EHA ha sido adecuado para reproducir el espectro integral de alteraciones asociadas a la EHA, incluido el cáncer de hígado. Algunos estudios han evaluado el efecto combinado del etanol con la DEN administrada a dosis muy bajas (1 mg/kg) en ratones recién nacidos o a dosis altas (40 mg/kg o más) en ratones adultos<sup>3,16</sup>; sin embargo, dichos protocolos no representan las condiciones observadas en la historia natural de la enfermedad. Utilizando a la DEN a una dosis de 7 mg/kg en el modelo MHT-EHA, determinamos el nivel de dos marcadores conocidos de proliferación celular, KI67 y PCNA<sup>17,52</sup>. El hígado de los animales expuestos a la DEN, es decir, el modelo MHT-EHA y el grupo CDS, mostraron un aumento de estos marcadores los cuales disminuyeron progresivamente hasta las 25 semanas (**Figura 17**). Este resultado concuerda con un informe que muestra que el CCE junto con dosis bajas de DEN (5 mg/kg) y de LPS (0.5 mg/kg) aumenta el número de núcleos positivos a KI67 e induce algunas características histopatológicas asociadas a la EHA, como la esteatosis y la infiltración inflamatoria tisular<sup>32</sup>. Nuestros hallazgos demuestran que el modelo MHT-EHA promueve la proliferación celular, un rasgo temprano de la malignidad celular, y un mecanismo conocido como proliferación compensatoria<sup>65</sup>, que podría estar estrechamente relacionado con el aumento de la muerte celular (**Figura 16**). El parénquima hepático portador de células cancerosas presenta características citológicas de diferenciación hepatocelular y desorganización estructural<sup>36</sup>. Un

modelo de CHC inducido por DEN administrada semanalmente a una dosis de 20 mg/kg promovió la aparición de lesiones neoplásicas, fibrosis, colangiocarcinoma y CHC tras 10 semanas de la primera la administración de la DEN<sup>17</sup>. En otro reporte, la administración de dosis bajas de DEN sola o en combinación etanol y LPS generó alteraciones leves en la arquitectura hepática y aumentó el nivel del marcador de hepatocarcinogénesis GSTP1, pero no promovió rasgos citológicos de cáncer de hígado<sup>17,32</sup>. En la presente investigación, el modelo MHT-EHA indujo características citológicas de células cancerosas asociadas a la EHA, por ejemplo, núcleos y citoplasma agrandados, polimorfismo e hipercromasia nuclear, citoplasmas translúcidos e indefinidos y desorganización de los cordones de hepatocitos. De manera interesante, el nivel de GSTP1 aumentó progresivamente en el modelo MHT-EHA incluso después de haber suspendido la exposición de los agentes hepatotóxicos (**Figura 17**). Esta evidencia demuestra que el modelo MHT-EHA también promueve rasgos histopatológicos y moleculares asociados con el establecimiento del cáncer de hígado.

## Capítulo 6. Conclusión

En este trabajo desarrollamos y presentamos un modelo útil de EHA en el ratón basado en la administración de múltiples hepatotóxicos; es decir, etanol, sacarosa, LPS y dosis bajas de DEN por un periodo de 18 semanas, que induce desde alteraciones tempranas como la esteatosis, hasta rasgos de malignidad como el cáncer de hígado, asociados a la progresión cronológica de la EHA. Como se esquematiza en la **figura 18**, el modelo MHT-EHA estimula a la enzima ADH1A, pero no a la CYP2E1, e incrementa el nivel de la enzima redox-sensible, NXN; probablemente como un mecanismo para proteger a las células hepáticas del daño potencial inducido por la producción exacerbada de ERO, que es estimulada por el efecto combinado y nocivo de los cuatro hepatotóxicos. El modelo también promueve la esteatosis y el aumento del nivel de FSP27, una proteína asociada principalmente con la formación de gotas de lípidos; propicia un ambiente inflamatorio persistente evidenciado por la detección de la proteína LY-6G, un marcador de la infiltración de neutrófilos en el hígado, así como por el aumento del nivel de MYD88, una proteína que participa en la activación de la vía de señalización inflamatoria, TLR/MYD88; asimismo, estimula la senescencia celular observada por el aumento tanto de la actividad de la SA- $\beta$ -gal como del nivel del sensor de rupturas de doble hebra, p-H2A.X<sup>Ser139</sup>; lo anterior, relacionado con las etapas iniciales de la EHA. El modelo también tiene la capacidad de promover la fibrosis evidenciada por el aumento del nivel de la proteína desmina, un marcador de CEH, de inducir la muerte celular asociada con la apoptosis mediada por la CASP3 y la proliferación compensatoria detectada por el aumento del nivel de los marcadores KI67 y PCNA. Los rasgos histopatológicos asociados con malignidad, como la desorganización de los cordones de hepatocitos y los pleomorfismos celulares, incluido el balonamiento celular y la formación de grandes vesículas translúcidas compatibles con la acumulación de grasa, así como el aumento en el nivel del marcador de CHC, GSTP1, también fueron promovidos por el modelo MHT-EHA durante un periodo de 18 semanas. Aunque no todas las alteraciones celulares o moleculares persistieron después de haber suspendido la exposición a los agentes hepatotóxicos, los rasgos asociados a la hepatocarcinogénesis sí lo hicieron. Con fundamento en el principio

metodológico y filosófico de la navaja de Ockham<sup>66,67</sup>, que afirma que "ningún modelo es perfecto, pero algunos son útiles", el modelo MHT-EHA cumple con este principio al recapitular las alteraciones y rasgos distintivos asociados a la progresión de la EHA, como ocurre en seres humanos. Dada su naturaleza, nuestro modelo es de utilidad para el abordaje de hipótesis y objetivos específicos que permitan describir la progresión de la EHA y/o evaluar la capacidad de agentes terapéuticos sobre esta enfermedad, utilizando un sistema *in vivo* basado en la exposición crónica a diferentes hepatotóxicos durante un período corto, a los cuales de manera natural el ser humano se ve expuesto durante décadas.



**Figura 18. Representación esquemática de la progresión de las alteraciones promovidas por el modelo MHT-EHA en el hígado del ratón.** En la imagen se muestra que el modelo MHT-EHA induce a la enzima metabolizadora de etanol ADH1A, promueve al sensor de estrés oxidativo NXN, estimula la esteatosis asociada con la proteína FSP27, la inflamación mediada por los marcadores LY-6G y MYD88, y la senescencia celular identificada por los marcadores SA-β-gal y p-H2A.X<sup>Ser139</sup>. El modelo también induce la fibrosis asociada con el aumento en la acumulación de colágeno tisular y del número de CEH positivas a desmina, acompañada de la apoptosis mediada por CASP3 y de la proliferación compensatoria identificada por los marcadores KI67 y PCNA. Finalmente, induce alteraciones asociadas con la malignidad celular e incrementa el nivel del marcador de CHC, GSTP1. El color gris hace referencia al estado basal de las proteínas. DEN, dietilnitrosamina; CEH, células estelares hepáticas; LPS, lipopolisacáridos; SA-β-gal, β-galactosidasa asociada a senescencia; ADH1A, alcohol deshidrogenasa 1A; CASP3, caspasa-3; CYP2E1, citocromo P450 familia 2 subfamilia E miembro 1; FSP27, proteína específica de la grasa 27; GSTP1, glutatión S-transferasa Pi-1; LY-6G, antígeno linfocitario 6 miembro de la familia G6D; MYD88, gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide-88; NXN, nucleorredoxina; PCNA, antígeno nuclear de células proliferantes, p-H2A.X<sup>Ser139</sup>, histona H2A.X fosforilada en serina139.

## **Capítulo 7. Perspectivas**

Con base en los resultados obtenidos, el modelo MHT-EHA resulta atractivo y de utilidad como una herramienta que permitirá recapitular con mayor aproximación la historia natural de la enfermedad y que eventualmente, podría contribuir en un diagnóstico de mayor precisión y en la determinación de la capacidad terapéutica de diferentes compuestos hepatoprotectores. La evaluación del estatus de otros marcadores de importancia como la CXCL1, una quimiocina relacionada con la infiltración de neutrófilos<sup>5</sup> o la determinación del contenido de hidroxiprolina tisular, una prueba utilizada para la evaluación del proceso fibrogénico<sup>29</sup>, entre otros marcadores, además de la determinación del perfil de expresión génica o proteica mediante análisis transcriptómicos o proteómicos, respectivamente, reafirmará la funcionalidad y los alcances del modelo MHT-EHA.

## Capítulo 8. Referencias

- 1 WHO. Global status report on alcohol and health 2018. 450 (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2018).
- 2 Seitz, H. K. *et al.* Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 16, doi:10.1038/s41572-018-0014-7 (2018).
- 3 Brandon-Warner, E., Walling, T. L., Schrum, L. W. & McKillop, I. H. Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* **36**, 641-653, doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01660.x (2012).
- 4 Bishehsari, F. *et al.* Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Res* **38**, 163-171 (2017).
- 5 Zhou, Z. *et al.* Neutrophil-Hepatic Stellate Cell Interactions Promote Fibrosis in Experimental Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**, 399-413, doi:10.1016/j.jcmgh.2018.01.003 (2018).
- 6 Hwang, S., Ren, T. & Gao, B. Obesity and binge alcohol intake are deadly combination to induce steatohepatitis: A model of high-fat diet and binge ethanol intake. *Clin Mol Hepatol* **26**, 586-594, doi:10.3350/cmh.2020.0100 (2020).
- 7 Singal, A. K., Bataller, R., Ahn, J., Kamath, P. S. & Shah, V. H. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol* **113**, 175-194, doi:10.1038/ajg.2017.469 (2018).
- 8 IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some N-nitroso compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* **17**, 1-349 (1978).
- 9 Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K. & Ichijo, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol* **16**, 427-435, doi:10.1016/j.semcancer.2006.09.003 (2006).
- 10 Arellanes-Robledo, J. *et al.* Ethanol targets nucleoredoxin/dishevelled interactions and stimulates phosphatidylinositol 4-phosphate production in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* **156**, 135-146, doi:10.1016/j.bcp.2018.08.021 (2018).

- 11 Chen, P. *et al.* Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* **148**, 203-214.e216, doi:10.1053/j.gastro.2014.09.014 (2015).
- 12 Szabo, G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* **148**, 30-36, doi:10.1053/j.gastro.2014.10.042 (2015).
- 13 Schaffert, C. S. *et al.* Alcohol metabolites and lipopolysaccharide: roles in the development and/or progression of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* **15**, 1209-1218, doi:10.3748/wjg.15.1209 (2009).
- 14 Elamin, E. E., Masclee, A. A., Dekker, J. & Jonkers, D. M. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev* **71**, 483-499, doi:10.1111/nure.12027 (2013).
- 15 Murphy, A. Alcohol: Science, Policy and Public Health. *Addiction* **108**, 2034-2035, doi:<https://doi.org/10.1111/add.12327> (2013).
- 16 Yan, G. *et al.* Chronic Alcohol Consumption Promotes Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis via Immune Disturbances. *Sci Rep* **7**, 2567, doi:10.1038/s41598-017-02887-7 (2017).
- 17 Fuentes-Hernández, S. *et al.* Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **378**, 114611, doi:10.1016/j.taap.2019.114611 (2019).
- 18 Verna, L., Whysner, J. & Williams, G. M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & Therapeutics* **71**, 57-81, doi:[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(96\)00062-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(96)00062-9) (1996).
- 19 Song, M., Chen, T., Prough, R. A., Cave, M. C. & McClain, C. J. Chronic Alcohol Consumption Causes Liver Injury in High-Fructose-Fed Male Mice Through Enhanced Hepatic Inflammatory Response. *Alcohol Clin Exp Res* **40**, 518-528, doi:10.1111/acer.12994 (2016).
- 20 Flister, K. F. T. *et al.* Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de



- novo lipogenesis in weaned male mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **62**, 155-166, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.007> (2018).
- 21 Seitz, H. K., Moreira, B. & Neuman, M. G. Pathogenesis of Alcoholic Fatty Liver a Narrative Review. *Life (Basel)* **13**, doi:10.3390/life13081662 (2023).
- 22 Xu, M. J. *et al.* Fat-Specific Protein 27/CIDEA Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Gastroenterology* **149**, 1030-1041.e1036, doi:10.1053/j.gastro.2015.06.009 (2015).
- 23 Orman, E. S., Odena, G. & Bataller, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* **28 Suppl 1**, 77-84, doi:10.1111/jgh.12030 (2013).
- 24 White, A. M., Orosz, A., Powell, P. A. & Koob, G. F. Alcohol and aging - An area of increasing concern. *Alcohol* **107**, 19-27, doi:10.1016/j.alcohol.2022.07.005 (2023).
- 25 Abdelmegeed, M. A., Choi, Y., Ha, S. K. & Song, B. J. Cytochrome P450-2E1 promotes aging-related hepatic steatosis, apoptosis and fibrosis through increased nitroxidative stress. *Free Radic Biol Med* **91**, 188-202, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.016 (2016).
- 26 Aravinthan, A. D. & Alexander, G. J. M. Senescence in chronic liver disease: Is the future in aging? *J Hepatol* **65**, 825-834, doi:10.1016/j.jhep.2016.05.030 (2016).
- 27 Lieber, C. S., Jones, D. P. & Decarli, L. M. EFFECTS OF PROLONGED ETHANOL INTAKE: PRODUCTION OF FATTY LIVER DESPITE ADEQUATE DIETS. *J Clin Invest* **44**, 1009-1021, doi:10.1172/jci105200 (1965).
- 28 Bertola, A., Mathews, S., Ki, S. H., Wang, H. & Gao, B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* **8**, 627-637, doi:10.1038/nprot.2013.032 (2013).
- 29 Tsukamoto, H. *et al.* Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* **96**, 620-630, doi:10.1172/jci118077 (1995).

- 30 Tsukamoto, H., Reidelberger, R. D., French, S. W. & Largman, C. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am J Physiol* **247**, R595-599, doi:10.1152/ajpregu.1984.247.3.R595 (1984).
- 31 Tsukamoto, H., Towner, S. J., Clofalo, L. M. & French, S. W. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* **6**, 814-822 (1986).
- 32 Alarcón-Sánchez, B. R. *et al.* Nucleoredoxin interaction with flightless-I/actin complex is differentially altered in alcoholic liver disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **127**, 389-404, doi:10.1111/bcpt.13451 (2020).
- 33 Gao, B. *et al.* Animal Models of Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Clinical Relevance. *Gene Expr* **17**, 173-186, doi:10.3727/105221617x695519 (2017).
- 34 Cook, R. T. *et al.* Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol Clin Exp Res* **31**, 1746-1758, doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00478.x (2007).
- 35 Gustot, T. *et al.* Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* **43**, 989-1000, doi:10.1002/hep.21138 (2006).
- 36 Mohr, U. *International Classification of Rodent Tumors. The Mouse*. 1 edn, (2001).
- 37 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367, doi:10.1073/pnas.92.20.9363 (1995).
- 38 Dey, A. & Cederbaum, A. I. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* **43**, S63-S74, doi:<https://doi.org/10.1002/hep.20957> (2006).
- 39 Lu, Y. & Cederbaum, A. I. Cytochrome P450s and Alcoholic Liver Disease. *Curr Pharm Des* **24**, 1502-1517, doi:10.2174/1381612824666180410091511 (2018).
- 40 Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M. & Miki, H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol* **8**, 501-508, doi:10.1038/ncb1405 (2006).

- 41 Arellanes-Robledo, J. *et al.* Flightless-I is a potential biomarker for the early detection of alcoholic liver disease. *Biochem Pharmacol* **183**, 114323, doi:10.1016/j.bcp.2020.114323 (2021).
- 42 Mallya, M., Campbell, R. D. & Aguado, B. Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics* **80**, 113-123, doi:10.1006/geno.2002.6794 (2002).
- 43 Bertola, A., Park, O. & Gao, B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* **58**, 1814-1823, doi:10.1002/hep.26419 (2013).
- 44 Deguine, J. & Barton, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep* **6**, 97, doi:10.12703/p6-97 (2014).
- 45 Kisseleva, T. & Brenner, D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 151-166, doi:10.1038/s41575-020-00372-7 (2021).
- 46 Shadyab, A. H. & LaCroix, A. Z. Genetic factors associated with longevity: a review of recent findings. *Ageing Res Rev* **19**, 1-7, doi:10.1016/j.arr.2014.10.005 (2015).
- 47 Alarcón-Sánchez, B. R., Pérez-Carreón, J. I., Villa-Treviño, S. & Arellanes-Robledo, J. Molecular alterations that precede the establishment of the hallmarks of cancer: An approach on the prevention of hepatocarcinogenesis. *Biochem Pharmacol* **194**, 114818, doi:10.1016/j.bcp.2021.114818 (2021).
- 48 Kudlova, N., De Sanctis, J. B. & Hajdich, M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci* **23**, doi:10.3390/ijms23084168 (2022).
- 49 Wang, S., Pacher, P., De Lisle, R. C., Huang, H. & Ding, W. X. A Mechanistic Review of Cell Death in Alcohol-Induced Liver Injury. *Alcohol Clin Exp Res* **40**, 1215-1223, doi:10.1111/acer.13078 (2016).

- 50 Thapaliya, S. *et al.* Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Dig Dis Sci* **59**, 1197-1206, doi:10.1007/s10620-014-3167-6 (2014).
- 51 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 52 Li, C. M. *et al.* Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cells* **10**, doi:10.3390/cells10112908 (2021).
- 53 Hirsova, P. *et al.* Hepatocyte apoptosis is tumor promoting in murine nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis* **11**, 80, doi:10.1038/s41419-020-2283-9 (2020).
- 54 Kang, J. S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F. J. & Fukushima, S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* **67**, 11141-11146, doi:10.1158/0008-5472.can-07-1369 (2007).
- 55 Gopal, T. *et al.* Nanoformulated SOD1 ameliorates the combined NASH and alcohol-associated liver disease partly via regulating CYP2E1 expression in adipose tissue and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **318**, G428-g438, doi:10.1152/ajpgi.00217.2019 (2020).
- 56 Vasiliou, V., Pappa, A. & Estey, T. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* **36**, 279-299, doi:10.1081/dmr-120034001 (2004).
- 57 Strolin Benedetti, M., Whomsley, R. & Baltes, E. Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 895-921, doi:10.1517/17425255.2.6.895 (2006).
- 58 Buyco, D. G. *et al.* Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **27**, 1-18, doi:10.3748/wjg.v27.i1.1 (2021).
- 59 Bucher, S. *et al.* Moderate chronic ethanol consumption exerts beneficial effects on nonalcoholic fatty liver in mice fed a high-fat diet: possible role of higher formation of triglycerides enriched in monounsaturated fatty acids. *Eur J Nutr* **59**, 1619-1632, doi:10.1007/s00394-019-02017-1 (2020).
- 60 Camus, A. M. *et al.* High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-

- nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* **7**, 268-275, doi:10.1002/mc.2940070410 (1993).
- 61 Idelfonso-García, O. G. *et al.* Is Nucleoredoxin a Master Regulator of Cellular Redox Homeostasis? Its Implication in Different Pathologies. *Antioxidants (Basel)* **11**, doi:10.3390/antiox11040670 (2022).
- 62 Kang, Y., Su, G., Sun, J. & Zhang, Y. Activation of the TLR4/MyD88 signaling pathway contributes to the development of human hepatocellular carcinoma via upregulation of IL-23 and IL-17A. *Oncol Lett* **15**, 9647-9654, doi:10.3892/ol.2018.8586 (2018).
- 63 Jin, H. *et al.* Oroxylin A inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via YAP pathway. *Cell Prolif* **51**, e12431, doi:10.1111/cpr.12431 (2018).
- 64 Dong, R. *et al.* Yangonin inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via miR-194/FXR axis. *Eur J Pharmacol* **890**, 173653, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173653 (2021).
- 65 Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.-L., Leffert, H. & Karin, M. IKK $\beta$  Couples Hepatocyte Death to Cytokine-Driven Compensatory Proliferation that Promotes Chemical Hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**, 977-990, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.014> (2005).
- 66 Box, G. E. P. Science and Statistics. *Journal of the American Statistical Association* **71**, 791-799, doi:10.1080/01621459.1976.10480949 (1976).
- 67 Ofițeru, I. D. & Picioreanu, C. No model is perfect, but some are useful. *Science* **376**, 914-916, doi:10.1126/science.abq0956 (2022).

## Capítulo 9. Anexos

### 9.1 Publicaciones

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

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación proponemos un modelo de CHC en el ratón basado en la administración crónica del carcinógeno DEN a diferentes dosis durante un periodo de hasta 18 semanas. Demostramos que la administración crónica del carcinógeno disminuye el nivel del CYP2E1, induce la proliferación celular, la generación de ERO y la producción del 4-hidroxinonanal y su unión al ADN para generar aductos. En consecuencia, altera la arquitectura del hígado, induce la inflamación y promueve la fibrosis y la hepatocarcinogénesis. Como resultado, en esta investigación presentamos un modelo de daño hepático crónico inducido por la DEN que promueve alteraciones similares a las observadas en el CHC del ser humano.

2. **Alarcón-Sánchez BR**, Guerrero-Escalera D, Rosas-Madrigal S, Ivette Aparicio-Bautista D, Reyes-Gordillo K, Lakshman MR, Ortiz-Fernández A, Quezada H, Medina-Contreras Ó, Villa-Treviño S, Isael Pérez-Carreón J, Arellanes-Robledo J. Nucleoredoxin interaction with flightless-I/actin complex is differentially altered in alcoholic liver disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2020 Nov;127(5):389-404. doi: 10.1111/bcpt.13451. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32524749. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13451>

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación demostramos que la interacción de la NXN con el binomio Flightless I (FLII)/actina forma un complejo ternario que puede alterarse por efecto del etanol y otras hepatotoxinas y en consecuencia, contribuir a la patogénesis de la EHA tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Dado que FLII es una proteína remodeladora del citoesqueleto de actina que interviene en los procesos de reparación de tejido, los resultados en esta investigación también sugieren que la interacción de la NXN con el complejo FLII/actina, podría regular estos procesos celulares. Además, aquí proponemos un primer acercamiento de un protocolo de múltiples hepatotóxicos basado en la administración combinada del etanol con dosis bajas de DEN y LPS como una estrategia útil para recapitular varias etapas de la patogénesis de la EHA, incluyendo rasgos tempranos de carcinogénesis hepática. De manera interesante, dicho protocolo aumenta no sólo el nivel del marcador de metabolismo del etanol, el CYP2E1, sino también el nivel de los marcadores inducibles por los LPS, es decir, las proteínas MYD88 y TLR-4, y el marcador de hepatocarcinogénesis GSTP1.

3. **Alarcón-Sánchez BR**, Pérez-Carreón JI, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo J. Molecular alterations that precede the establishment of the hallmarks of cancer: An approach on the prevention of hepatocarcinogenesis. *Biochem Pharmacol.* **2021** Dec;194:114818. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114818. Epub 2021 Oct 30. PMID: 34757033. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114818>

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación realizamos un análisis integral de una gran variedad de alteraciones moleculares reguladas por diversos agentes quimiopreventivos en etapas tempranas de la carcinogénesis hepática. Además, discutimos el papel que desempeñan dos procesos críticos, como el estrés oxidativo y las alteraciones genéticas, en el daño celular que impulsa la transformación de células preneoplásicas en neoplásicas. Mientras que los agentes quimiopreventivos inhiben o disminuyen los efectos nocivos del estrés oxidativo y las alteraciones genéticas, al mismo tiempo, promueven la activación de la senescencia celular que, a su vez, funciona como un mecanismo clave cuya intención es prevenir la aparición y el establecimiento del cáncer de hígado. En conjunto, presentamos al estrés oxidativo, las alteraciones genéticas y la senescencia como eventos clave que influyen en el destino de las células iniciadas y en el establecimiento de las características distintivas del cáncer de hígado.



4. Guerrero-Escalera D, **Alarcón-Sánchez BR**, Arellanes-Robledo J, Cruz-Rangel A, Del Pozo-Yauner L, Chagoya de Sánchez V, Resendis-Antonio O, Villa-Treviño S, Torres-Mena JE, Pérez-Carreón JI. Comparative subcellular localization of NRF2 and KEAP1 during the hepatocellular carcinoma development in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* **2022** May;1869(5):119222. doi: 10.1016/j.bbamcr.2022.119222. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35093454. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119222>

- **Contribución de la publicación**

En este estudio caracterizamos la localización subcelular del factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar a 2 (NRF2) y de la proteína 1 asociada a Kelch similar a ECH (KEAP1), cuya activación puede proteger o promover la carcinogénesis. Mediante un modelo de hepatocarcinogénesis en rata inducida por DEN demostramos que la activación de la vía persistente junto con el aumento de la expresión de alguno de sus genes diana, como la NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1, hemo oxigenasa 1, prostaglandina reductasa 1 y de la subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa. De manera similar, la translocación nuclear de NRF2, KEAP1 y del factor de transcripción MAF-BZIP aumenta en las células tumorales durante la progresión del CHC. También demostramos que la colocalización de NRF2 con KEAP1 fue mayor en los núcleos celulares de los nódulos neoplásicos que en las células circundantes, y que la interacción de KEAP1 con la actina filamentosa se interrumpe en las células tumorales, lo cual probablemente contribuye a la liberación y translocación nuclear de NRF2 y en última instancia, a la progresión del CHC experimental.

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

- **Contribución de la publicación**

En esta revisión abordamos las múltiples funciones que la NXN tiene en la fisiología celular, entre las que se encuentra su papel clave en el mantenimiento de la homeostasis redox mediante la regulación de diferentes vías de señalización redox-sensibles. A través de su interacción con varias proteínas clave como MYD88, FLII, disheveled, fosfofructoquinasa-1 (PFK1), la proteína fosfatasa 2A, la proteína de translocación homóloga a SEC63 y la proteína quinasa II alfa dependiente de calcio/calmodulina (CAMK2A), la NXN participa en la regulación de varios procesos celulares, incluida la proliferación, la progresión del ciclo celular, la inflamación y el transporte de proteínas al retículo endoplásmico, entre otros procesos; como resultado, la NXN está implicada en diferentes patologías, como el cáncer, la enfermedad hepática alcohólica, la fibrogénesis hepática, la obesidad, la diabetes mellitus, entre otras. En conjunto, esta evidencia propone a la NXN como un regulador redox maestro de la fisiología celular en el centro de diferentes vías de señalización redox sensibles y de las patologías asociadas.

6. Moreno-García DM, Zepeda-Bastida A, Ocampo-López J, **Alarcón-Sánchez BR**, Idelfonso-García OG, Rosas-Madrigal S, Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo J. Erratum to: Aqueous extracts from *Tenebrio molitor* larval and pupal stages inhibit early hepatocarcinogenesis in vivo. *J Zhejiang Univ Sci B*. **2023** Apr 15;24(4):371-372. doi: 10.1631/jzus.B21e0201. Erratum for: the original article. PMID: 37056214; PMCID: PMC10106400. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2100201>

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación evaluamos las propiedades anticancerígenas de los extractos acuosos de *Tenebrio molitor* en su estadio larvario, de pupa y adulto, en un modelo de hepatocarcinogénesis temprana inducida mediante exposición crónica a la DEN en el ratón. Demostramos que la forma larvaria y de pupa bloquean tanto las alteraciones tempranas que preceden al desarrollo del tumor como las asociadas al CHC establecido, por ejemplo, previnieron la desorganización, la hipertrofia y la fibrogénesis del parénquima hepático, además, disminuyen el nivel de los marcadores de proliferación celular KI67 y ciclina D1. Los resultados sugieren que la forma larvaria, pero mejor aún, la de pupa posee mejores propiedades terapéuticas que el estadio adulto de *T. molitor*, ya que probablemente, contienen compuestos bioactivos adicionales con potencial terapéutico contra las alteraciones tempranas que eventualmente conducen a la carcinogénesis hepática, los cuales podrían estar ausentes en la etapa adulta de este insecto.

7. Idelfonso-García OG, **Alarcón-Sánchez BR**, Guerrero-Escalera D, López-Hernández NA, Pérez-Hernández JL, Pacheco-Rivera R, Serrano-Luna J, Resendis-Antonio O, Muciño-Olmos EA, Aparicio-Bautista DI, Basurto-Islas G, Baltiérrez-Hoyos R, Vásquez-Garzón VR, Villa-Treviño S, Muriel P, Serrano H, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Nucleoredoxin Redox Interactions Are Sensitized by Aging and Potentiated by Chronic Alcohol Consumption in the Mouse Liver. *Antioxidants* (Basel). **2024** Feb 20;13(3):257. doi: 10.3390/antiox13030257. PMID: 38539791; PMCID: PMC10967286. <https://doi.org/10.3390/antiox13030257>.

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación determinamos el efecto del CCE sobre algunas interacciones redox-sensibles dependientes de la NXN en el hígado de ratones envejecidos. Encontramos que el envejecimiento empeora los efectos del CCE sobre la interacción de la NXN con las proteínas FLII, MYD88, CAMK2A y PFK1. Detectamos también un incremento en el número de células senescentes preferentemente localizadas junto a células positivas a la presencia de la NXN. De manera interesante, en el tejido hepático de los animales envejecidos sometidos al CCE disminuye la capacidad de interacción de la NXN, aumenta la cantidad de proteínas carboniladas, la proliferación celular y se invierte la proporción de dos componentes de la matriz extracelular, como el colágeno I y el colágeno III. Por lo tanto, evidenciamos que la capacidad de interacción de la NXN con las proteínas antes mencionadas, es alterada de manera significativa por el envejecimiento y potenciada por el CCE, un fenómeno asociado con el desequilibrio de la homeostasis redox en el tejido hepático envejecido.

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

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación desarrollamos un protocolo para detectar la actividad de la SA- $\beta$ -gal y la de la inmunoperoxidasa en muestras de tejidos de especímenes murinos. La actividad de la SA- $\beta$ -gal es uno de los métodos más utilizados para detectar la senescencia celular, un estado de detención indefinida del ciclo celular inducido por el envejecimiento, y por diversos factores asociados a estrés o daño celular, incluido el estrés oxidativo, el daño del ADN y la carcinogénesis, entre otros. Proponemos este protocolo como una herramienta de utilidad para la identificación simultánea de diferentes marcadores, mediante el doble etiquetado en una misma muestra de tejido recién congelado de ratones envejecidos. En este sentido, la detección de la actividad de la SA- $\beta$ -gal, su colocalización con otros marcadores de senescencia celular o diferentes proteínas de interés, representa una estrategia prometedora para explorar y revelar la asociación de diferentes mecanismos moleculares con la senescencia celular inducida por el envejecimiento o por otros procesos celulares alterados.

9. **Alarcón-Sánchez BR**, Germán Idelfonso-García O, Guerrero-Escalera D, Piña-Vázquez C, de Anda-Jáuregui G, Luis Pérez-Hernández J, de la Garza M, García-Sierra F, Sánchez-Pérez Y, Baltiérrez-Hoyos R, Rocío Vásquez-Garzón V, Muriel P, Isael Pérez-Carreón J, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo J. A model of alcoholic liver disease based on different hepatotoxics leading to liver cancer. *Biochem Pharmacol.* **2024** Apr 13:116209. doi: 10.1016/j.bcp.2024.116209. Epub ahead of print. PMID: 38621424. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116209>

- **Contribución de la publicación**

En esta investigación, desarrollamos un modelo murino de EHA a través de la administración crónica de múltiples hepatotóxicos, denominado modelo MHT-EHA, con la finalidad de recapitular las alteraciones y etapas asociadas a la progresión de la enfermedad en un periodo corto. Los hepatotóxicos administrados fueron el etanol, la sacarosa, los LPS y dosis bajas de DEN. Demostramos que el modelo MHT-EHA estimula el metabolismo del etanol, el estrés oxidativo y la senescencia celular; además, promueve la esteatosis y la inflamación, dos rasgos característicos en la progresión de la EHA. El modelo también induce la fibrosis, acompañada de la muerte celular y proliferación compensatoria. También, promueve el desarrollo de alteraciones histopatológicas y moleculares asociadas con rasgos característicos de malignidad celular y hepatocarcinogénesis, respectivamente. En conclusión, esta investigación nos permitió desarrollar y presentar un modelo alternativo de utilidad para explorar cronológicamente las alteraciones y los estadios característicos de la EHA durante su progresión que, además, podría ser de utilidad para el desarrollo y determinación de la eficiencia de nuevos agentes terapéuticos.

## 9.2 Congresos

1. Fuentes-Hernández S, Pérez-Hernández JL, **Alarcón-Sánchez BR**, Martínez-Aguilar KE, Montes-Aparicio A, Aparicio-Bautista DI, Rosas-Madrigal S, Higuera-De-La-Tijera F, Manjarréz-Martínez DA, Pérez-Soto F, Villa-Treviño S, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Characterization of an hepatocarcinogenesis model induced by diethylnitrosamine in mouse; a tool to study the synergistic effect of other hepatotoxic substances. XIII national congress on hepatology. **2018** June.

- **Aportación del trabajo en el congreso**

El trabajo fue presentado en la modalidad de poster durante el XIII congreso nacional de hepatología organizado por la Asociación Mexicana de Hepatología, llevado a cabo en el estado de Quintana Roo, México. En el trabajo se mostraron los resultados obtenidos de la caracterización de un modelo de hepatocarcinogénesis en ratón inducida por diferentes dosis del carcinógeno DEN administrada hasta 18 semanas. La administración crónica del carcinógeno exacerbó el estrés oxidativo, alteró la arquitectura del hígado, indujo la inflamación, la proliferación celular, el nivel de un subproducto del estrés oxidativo, el 4-hidroxinonenal, la fibrosis y finalmente el desarrollo de alteraciones asociadas al CHC que fueron similares a las observadas en el ser humano.

2. **Alarcón-Sánchez BR**, Idelfonso-García OG, Vásquez-Garzón VR, Muriel P, Pérez-Carreón JI, Villa-Treviño S, Arellanes-Robledo, J. Low doses of different hepatotoxins induce alcohol-related liver disease and drive hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **2023** June; Vol 78, SUPPLEMENT 1:151-152. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(23\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(23)00661-X). [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(23\)00661-X/pdf](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(23)00661-X/pdf)

- **Aportación del trabajo en el congreso**

El trabajo fue presentado en la modalidad de poster durante el congreso EASL 2023 organizado por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (European Association for the Study of the Liver), llevado a cabo en la ciudad de Viena, Austria. En el trabajo se mostró el efecto sinérgico que el etanol, la sacarosa, los LPS y dosis bajas de DEN tienen sobre diferentes parámetros fisiológicos, celulares y moleculares asociados a la EHA y su progresión hacia el CHC experimental. Brevemente, se mostró que la administración combinada de estos hepatotóxicos interfiere con la ganancia de PC, inducen alteraciones estructurales en la arquitectura hepática e incrementa el nivel de una variedad de marcadores de metabolismo del etanol, inflamación, esteatosis, fibrosis, proliferación celular y carcinogénesis.



3. Idelfonso-García OG, **Alarcón-Sánchez BR**, Vásquez-Garzón VR, Villa-Treviño S, Muriel P, Serrano H, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Nucleoredoxin-dependent functioning is dysregulated by chronic alcohol consumption and is associated with the establishment of cellular senescence in the liver of aged mice. *Journal of Hepatology*. **2023** June; Vol 78, SUPPLEMENT 1: 160. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(23\)00673-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(23)00673-6). [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(23\)00673-6/pdf](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(23)00673-6/pdf)

- **Aportación del congreso**

El trabajo fue presentado en la modalidad de poster durante el congreso EASL 2023 organizado por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (European Association for the Study of the Liver), llevado a cabo en la ciudad de Viena, Austria. En el trabajo se mostró el efecto que el etanol tiene sobre el envejecimiento inducido mediante un modelo de CCE en el ratón. Brevemente, se mostró que el CCE exacerba la senescencia celular y aumenta el estrés oxidativo, disminuye el nivel de la NXN, altera sus interacciones proteína-proteína y promueve su traslocación al núcleo de las células senescentes; además, modifica el perfil de expresión génica hepática en el hígado de ratones envejecidos en comparación con el hígado de ratones jóvenes. Los resultados sugieren que la NXN desempeña un papel central en la protección de las células hepáticas frente al incremento exacerbado del estrés oxidativo inducido por el CCE en ratones jóvenes, pero no en ratones envejecidos.

4. Idelfonso García OG, **Alarcón-Sánchez BR**, Vásquez-Garzón VR, Villa-Treviño S, Muriel P, Serrano H, Pérez-Carreón JI, Arellanes-Robledo J. Nucleoredoxin activity is altered by oxidative stress generated by chronic alcohol consumption and is associated with increased cellular senescence in the liver of aged mice. VIII Congress of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine. **2023** September.

- **Aportación del congreso**

El trabajo fue presentado en la modalidad de poster durante el VIII Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica, llevado a cabo en Tlaxcala, México. En el trabajo se mostró que el consumo de etanol promueve el estrés oxidativo y disminuye el nivel de la NXN en el hígado de ratones envejecidos sometidos al CCE mediante un modelo de EHA. Por efecto del modelo se redujo considerablemente la relación de interacción de FLII, entre otras proteínas reguladas por la NXN a través de interacciones redox sensibles. Las evidencias sugieren que el incremento en la producción de ERO derivadas del CCE en el contexto de la EHA oxidan proteínas y sensibilizan a las células hepáticas a los efectos del estrés oxidativo y como resultado, alteran la regulación dependiente de la NXN. En resumen, se concluyó que el CCE puede acelerar el establecimiento de la senescencia celular en el hígado de ratones envejecidos.

El jurado designado por el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprobó esta tesis de Doctorado titulada: “Caracterización de un modelo de enfermedad hepática alcohólica basado en diferentes hepatotóxicos que conducen al cáncer de hígado”, que presenta la M. en C. Brisa Rodope Alarcón Sánchez, para obtener el grado de Doctora en Ciencias en la Especialidad de Biología Celular el día 17 de mayo del año 2024.

Tutores:

**Dr. Jaime Arellanes Robledo**

\_\_\_\_\_

**Dr. Saúl Villa Treviño**

\_\_\_\_\_

Asesores:

**Dra. Mireya de la Garza Amaya**

\_\_\_\_\_

**Dra. Yesennia Sánchez Pérez**

\_\_\_\_\_

**Dr. Francisco García Sierra**

\_\_\_\_\_

**Dr. Pablo Muriel de la Torre**

\_\_\_\_\_