



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA EXPOSICIÓN AGUDA A ETANOL INDUCE
ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN
LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TANIA MEDINA SÁNCHEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. KARLA HERNÁNDEZ FONSECA
(Cd. Mx. Octubre, 2022)**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Medina

Sánchez

Tania

5544735312

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

312289319

2. Datos del tutor

Dra.

Karla

Hernández

Fonseca

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Lucía Alba

Martínez

Mota

4. Datos del sinodal 2

Olivia Tania

Hernández

Hernández

5. Datos del sinodal 3

Silvia Lorenia

Cruz

Martin del Campo

6. Datos del sinodal 4

Patricia

Ramos

Morales

7. Datos del trabajo escrito

La exposición aguda a etanol

induce estrés del retículo

endoplasmático en la rata

47 p

2022

A mis padres María Estela y Jesús

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz, por ser parte de mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto CB-2015-252348-B-1537 y la beca que se me otorgó en el periodo junio 2019-abril 2020.

A mi tutora la Dra. Karla Hernández Fonseca, por todo el apoyo, conocimiento y experiencia durante la realización de este proyecto, por ver el potencial que tengo como científica y por toda la confianza que ha depositado en mí.

A los miembros del jurado que se tomaron el tiempo de revisar esta tesis y que con sus comentarios me orientaron a enriquecerla.

A mis compañeros del laboratorio de neuroquímica, Bruno, Andrea, Mariel y Julio, por hacer el que hacer científico mas ameno.

A mis mejores amigos de la facultad, Vianney, Miguel, Manuel y Alejandro, sin ustedes la carrera no hubiese sido lo mismo.

A Alejandro por todo el apoyo y comprensión.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción.....	3
1.1 Historia del consumo de alcohol en México	3
1.2 Consumo de alcohol en México	4
1.3 ¿Qué es el alcohol?	5
1.4 Metabolismo del alcohol	6
1.5 Intoxicación alcohólica aguda	9
1.6 Daño neuronal asociado al alcohol	12
1.7 Alcohol como inductor de estrés de retículo endoplasmático.....	14
1.8 Retículo Endoplasmático	15
1.9 Estrés de retículo endoplasmático	15
1.10 UPR	16
2. Justificación.....	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. Materiales y métodos	20
5.1 Animales.....	20
5.2 Tratamiento.....	20
5.3 Determinación de alcohol en sangre	21
5.4 Western Blot	22
5.5 Análisis estadísticos.....	23
6. Resultados	23
7. Discusión	32
8. Conclusión.....	36
9. Perspectivas	38
10. Referencias	39
11. Anexo A	46
12. Anexo B	47

Resumen

Las personas beben para socializar, celebrar o relajarse. El etanol es la sustancia psicoactiva e intoxicante más utilizada en el mundo, actúa como un depresor de muchas funciones del sistema nervioso central (SNC), el cual es particularmente vulnerable al daño inducido por el etanol, se han observado alteraciones patológicas en distintas estructuras cerebrales y alteraciones en la función neuronal en pacientes y en modelos animales. Diversos estudios han demostrado que el estrés del retículo endoplásmico juega un papel relevante en la patogénesis de varias enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Huntington, la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La causa de la neurodegeneración inducida por etanol no es clara, sin embargo, a partir de estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* se ha propuesto la participación del estrés reticular en el daño neuronal inducido por alcohol. El retículo endoplásmico (RE) es un importante organelo subcelular implicado en la síntesis, modificación post-traducciona l y plegamiento de proteínas; así como en la homeostasis de calcio intracelular. Una variedad de condiciones fisiológicas, como la hipoxia, el estrés, la hipoglucemia, etc; provocan una disrupción en el proceso de plegamiento de las proteínas, que tiene como consecuencia la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del RE, una condición denominada como estrés del RE, en el cual se activan varios procesos que tienen como finalidad la disminución en el acumulamiento de proteínas mal plegadas. Usando un modelo de intoxicación aguda de alcohol en la rata Wistar, estudiamos si el etanol induce estrés del RE en el cerebro adulto. Ratas Wistar macho fueron administradas intraperitonealmente con una dosis de 3 g/Kg de etanol, posteriormente sacrificadas a distintos tiempos (0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 hrs); se colectó la sangre troncal para determinar la concentración de alcohol en plasma y se obtuvo el hipocampo, el cual se ha identificado como una de las regiones más sensibles a los efectos del alcohol. Posteriormente, se homogenizó el tejido y mediante la técnica de western blot se analizó la expresión de proteínas marcadoras y proteínas que participan en las vías de señalización asociadas al estrés reticular. Los resultados muestran que la administración intraperitoneal de 3.0 g/kg de etanol incrementó significativamente la concentración de alcohol en sangre solo durante las 4 horas posteriores a la administración de la droga, descendiendo la concentración después de este tiempo a niveles basales. En cuanto a la expresión de las proteínas marcadoras de estrés reticular, los datos muestran que

la exposición aguda a una dosis alta de etanol aumentó significativamente la expresión de las proteínas GRP78 y CHOP, lo cual desencadenó la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, unfolded protein response, por sus siglas en inglés), a través de las vías de los sensores transmembranales del RE, IRE1 y PERK. El incremento en la expresión de los estos sensores se traduce en la inducción del procesamiento de la proteína XBP1, la fosforilación de eIF2 α y la traducción selectiva de ATF-4. Los resultados demuestran que la exposición aguda a altas concentraciones de etanol puede causar estrés en el RE de neuronas maduras del hipocampo de la rata. Estos datos proporcionan una visión novedosa de los mecanismos potenciales del daño inducido por el etanol en las neuronas maduras y rompen con el paradigma de que se requiere un consumo crónico de alcohol para inducir daño neuronal.

1. Introducción

La gente bebe para socializar, celebrar o relajarse. Según el Informe Mundial de Situación sobre Alcohol y Salud 2018 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de la mitad de la población consume alcohol en solo tres regiones del mundo (América, Europa y el Pacífico Occidental). Actualmente 2,300 millones de personas son bebedores. El informe muestra que, en México, el 77% de alcohol que se consume corresponde a la cerveza, el 20% a los alcoholes destilados, el 2% al vino y el 1% a otras bebidas.

1.1 Historia del consumo de alcohol en México

El alcohol ha estado presente en muchas culturas durante siglos, en México el pulque es una de las bebidas alcohólicas más antiguas, existen antecedentes de su consumo desde el primer milenio de nuestra era, unas décadas antes de la destrucción del reino de Tula, cuando un noble llamado Papatzin descubrió la manera de obtener el aguamiel y sus derivados (Muriá et al., 1998, Molina Piñeiro, 1983)

Dentro de la mitología mexicana se cuenta la leyenda de Quetzalcóatl, el cual subió al cielo a buscar a Mayahuel, una estrella, para convencerla de ir a la Tierra con él. Furiosa, su abuela, la gran *Tzizimitl* fue en su búsqueda; al saberse perseguidos, Quetzalcóatl y Mayahuel se fusionaron en un árbol de dos ramas. Sus esfuerzos fueron en vano, los encontraron y la abuela arrancó la rama correspondiente a su nieta. Al volver a su forma humana, Quetzalcóatl recogió los restos de Mayahuel y los enterró, brotando de ellos el maguey. De Mayahuel nacieron los 400 conejos a quienes alimenta con sus 400 pechos, símbolos de la fertilidad, sus hijos representaban un nivel de fermentación y estado de embriaguez diferente. Así podía aparecer el conejo melancólico, el triste o el cantador, entre una infinidad de estados que el *octli* (pulque) podría inducir (Muriá et al., 1998).

Los mexicanos heredaron de las culturas precedentes la mayoría de los conocimientos relativos al maguey y al pulque, sobre todo de los toltecas, que con el tiempo les permitiría alcanzar un amplio dominio de las técnicas de cultivo de la planta y de las cualidades nutritivas y curativas de la bebida (Muriá et al., 1998).

En cuanto a las cualidades curativas, las mujeres recién paridas lo usaban para aminorar sus dolores y aumentar su producción de leche. Los ancianos mayores de 50 años podían beber aguamiel a placer para calentar la sangre y poder dormir. Se sabe que los Mexicas castigaban severamente a los jóvenes que incurrían en el exceso, eran rapados, derribaban sus casas, e inclusive sí cometían una ofensa grave se les lapidaba o apaleaba hasta la muerte (Molina Piñeiro, 1983, Valdez, 2005).

A raíz de la conquista, el pulque paso de ser la bebida de los valientes y sabios a ser el licor de los vencidos, y cuando dejaron de estar en vigor las severísimas leyes con las cuales castigaban a los que bebían en forma desmedida, el alcoholismo se extendió de modo general en la Nueva España, en este momento no solo había pulque si no también aguardiente de caña (ron) (Molina Piñeiro, 1983).

El índice de embriaguez aumentó considerablemente ajustándose a las celebraciones de las numerosas festividades de la iglesia católica. A la par de la conquista, las autoridades indígenas ya no ejercían ningún control para evitar el abuso, y los españoles no hicieron nada para regularlo. A pesar de que la cultura católica prescribía restricciones para el consumo del alcohol, tanto en las celebraciones, como en la vida cotidiana; éstas no resultaron efectivas (Valdez, 2005).

1.2 Consumo de alcohol en México

Con base en la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017 (ENCODAT, 2016-2017), el 77.3% de la población adulta en México (18-65 años) ha consumido alcohol alguna vez en la vida, el consumo de alcohol per cápita es de 4.4 litros por año; sin embargo, el patrón de consumo se caracteriza por ser excesivo.

Por otro lado, la encuesta muestra que el 39.8% de los jóvenes entre 12 y 17 años ha consumido alcohol alguna vez en su vida; además, el 15.2% de los jóvenes reportan un consumo excesivo de esta sustancia. Los datos muestran que el consumo de alcohol en menores de edad ha ido en aumento.

El consumo de alcohol genera una carga sanitaria, social y económica considerable para la sociedad, es un factor causal de más de 200 enfermedades y trastornos. Está asociado con el riesgo de desarrollar problemas de salud tales como trastornos mentales y conductuales, incluido el alcoholismo, importantes enfermedades no transmisibles tales como la cirrosis hepática, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, así como traumatismos derivados de la violencia y los accidentes de tránsito (OMS, 2018).

1.3 ¿Qué es el alcohol?

Los alcoholes son una clase de compuestos orgánicos volátiles e inflamables con una amplia variedad de usos; se usan tanto en aromatizantes y perfumes, como disolventes en medicamentos y diversos compuestos químicos, por ejemplo, antisépticos médicos y desinfectantes para manos, en combustibles para cocinar y calentar, y en bebidas intoxicantes. Nos referimos al alcohol, en general, como a las bebidas alcohólicas que contienen etanol. El etanol es un líquido incoloro, translúcido, de olor característico, que se obtiene a través de la fermentación anaerobia de los hidratos de carbono, su fórmula química semidesarrollada es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ (Myers, et al. 2011).

El etanol es la sustancia psicoactiva e intoxicante más utilizada en el mundo, actúa como un depresor de muchas funciones del sistema nervioso central (SNC), incluidos el juicio, el razonamiento, las habilidades motoras finas y gruesas, la percepción y la memoria, también desinhibe el comportamiento y las emociones. Sin embargo, los efectos del alcohol en el SNC dependen de la dosis administrada, particularmente a nivel conductual, exhibiendo efectos bifásicos característicos, tanto en animales como en el hombre. Dosis bajas de la sustancia inducen estimulación locomotora en roedores, así como activación psicomotora y euforia en humanos, mientras que dosis altas disminuyen la actividad locomotora y producen sedación deprimiendo las funciones corporales vitales como la respiración, con un efecto mortal (Myers, et al., 2011; Méndez, 2013).

1.4 Metabolismo del alcohol

Los efectos del alcohol sobre el cuerpo dependen de la concentración en sangre (BAC, Blood Alcohol Concentration, por sus siglas en inglés), la BAC está determinada por la rapidez con la que el alcohol se absorbe, distribuye, metaboliza y excreta, y aumenta a medida que las personas beben. BAC puede expresarse en miligramos por decilitro (mg/dl) o como un porcentaje de alcohol en el torrente sanguíneo (Zakhari, 2006).

El etanol que pasa de la sangre a los tejidos se absorbe como todos los nutrientes en el sistema gastrointestinal, el 20% se absorbe en el estómago y el resto en el duodeno y el yeyuno (primera y segunda sección del intestino delgado, respectivamente), posteriormente ingresa a los capilares del intestino delgado a través de la difusión pasiva (Schlesinger-Piedrahita, *et al.* 2017). Una vez que el alcohol ingresa al torrente sanguíneo, la vena porta lo transfiere al hígado, su principal órgano de degradación. Ahí se expone a las enzimas y es metabolizado (Zakhari, 2006).

El alcohol es principalmente metabolizado en el cuerpo por la vía oxidativa, la cual incluye a las enzimas, alcohol deshidrogenasa (ADH), citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y a la catalasa. También puede ser metabolizado a través de una vía no oxidativa.

En el hígado se metaboliza aproximadamente un 70% del etanol por la vía oxidativa de mayor importancia, el sistema ADH. El etanol se oxida a acetaldehído, por acción de la enzima ADH citosólica en un proceso dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+); con una nueva oxidación, dicho compuesto es convertido en acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) mitocondrial. El acetato es transformado a acetil coenzima A (CoA) por medio de la enzima acetato-CoA-ligasa con consumo de ATP; a partir de allí se degrada predominantemente en el ciclo de Krebs a CO_2 y H_2O . Como resultado, estas reacciones dejan a las células del hígado en un estado particularmente vulnerable al daño de los subproductos del metabolismo del etanol, como los radicales libres y el acetaldehído, un subproducto altamente reactivo y tóxico que puede contribuir al daño tisular y, posiblemente, al proceso adictivo (Zimatkin & Deitrich, 1997; Zakhari, 2006; Schlesinger-Piedrahita, *et al.*, 2017).

Aproximadamente 10-30% del etanol se oxida por medio del sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS), las isoenzimas del citocromo P450, que incluyen CYP2E1, 1A2 y 3A4, que están presentes predominantemente en los microsomas o vesículas del retículo endoplásmico, también contribuyen a la oxidación del alcohol en el hígado. CYP2E1 es inducido por el consumo crónico de alcohol y tiene un papel importante en el metabolismo del etanol a acetaldehído a concentraciones elevadas de etanol. Además, la oxidación del etanol dependiente de CYP2E1 puede ocurrir en otros tejidos, como el cerebro, donde la actividad de ADH es baja (Zakhari, 2006). También produce especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen hidroxietilo, anión superóxido y radicales hidroxilo, que aumentan el riesgo de daño tisular (Zimatkin & Deitrich, 1997; Zakhari, 2006; Schlesinger-Piedrahita, et al., 2017).

Un tercer sistema de metabolización del etanol es el de la catalasa, enzima presente en los peroxisomas, que oxida al etanol utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La tasa fisiológica de producción de H_2O_2 es pequeña, lo que indica que la catalasa sólo representaría alrededor del 2% de la tasa *in vivo* de oxidación del etanol. Este sistema parecería ejercer su acción sólo ante concentraciones elevadas de la droga y ser importante en el metabolismo del alcohol en el cerebro (Zimatkin & Deitrich, 1997; Zakhari, 2006; Schlesinger-Piedrahita, et al., 2017).

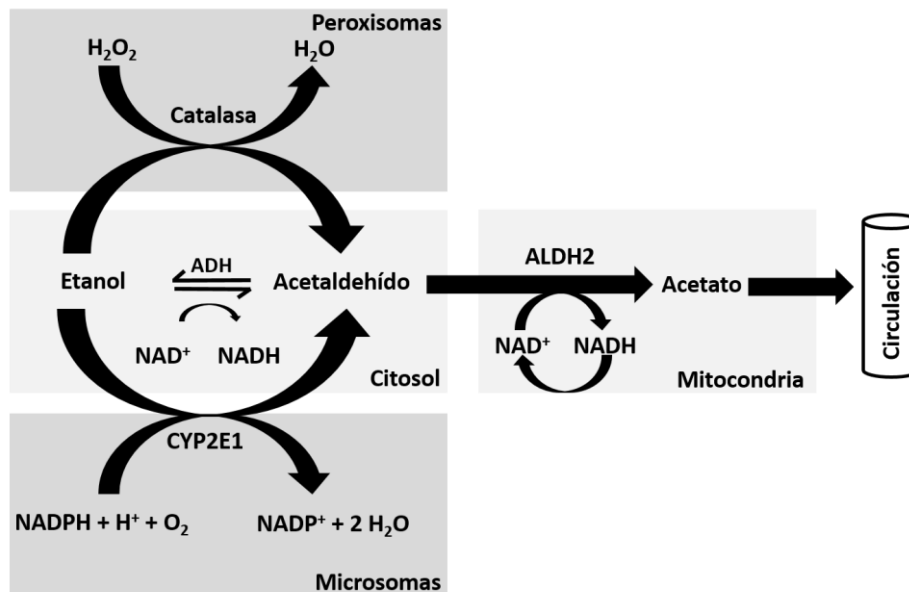


Fig. 1 Vías oxidativas del metabolismo del alcohol. La ADH presente en el citosol convierte el etanol en acetaldehído. La catalasa, ubicada en los peroxisomas, requiere peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar el alcohol. CYP2E1, presente predominantemente en los microsomas asume un papel importante en la metabolización del etanol a acetaldehído a concentraciones elevadas de etanol. El acetaldehído se metaboliza principalmente por la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) en las mitocondrias para formar acetato y $NADH$ (Modificado de Zakhari, 2006).

El metabolismo no oxidativo del alcohol ocurre a una tasa muy baja y sucede por dos vías. La primera conduce a la formación de moléculas llamadas ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs, por sus siglas en inglés) a partir de la reacción del alcohol con ácidos grasos, los FAEEs son detectables en el suero y otros tejidos después de la ingestión de alcohol y persisten mucho después de la eliminación de éste. El papel de los FAEEs en el daño tisular inducido por el alcohol aún no se ha evaluado. La segunda vía del metabolismo no oxidativo del alcohol da como resultado la formación de fosfatidiletanol, un tipo de lípido que contiene fósforo y requiere la enzima fosfolipasa D (PLD) que descompone los fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina) para generar ácido fosfatídico (PA). La reacción enzimática ocurre predominantemente a altas concentraciones de alcohol circulante. El producto de esta reacción se metaboliza poco y puede acumularse a niveles detectables después del consumo crónico de grandes cantidades de alcohol, pero sus efectos en la célula aún no se han establecido (Zakhari, 2006).



Fig. 2 El etanol se metaboliza de forma no oxidativa por dos vías, una reacción catalizada por la enzima éster etílico de ácido graso (FAEE) sintasa, que conduce a la formación de moléculas conocidas como FAEEs. En la otra reacción, participa la enzima fosfolipasa D (PLD) y da como resultado la formación de un fosfolípido conocido como fosfatidiletanol (Modificado de Zakhari, 2006).

El alcohol se difunde fácilmente a través de las membranas y se distribuye a todas las células y tejidos, puede afectar de manera aguda la función celular al interactuar con ciertas proteínas y membranas celulares.

1.5 Intoxicación alcohólica aguda

La intoxicación aguda puede ser una condición clínica peligrosa, es el trastorno más frecuente por el cual los sujetos bebedores de alcohol son remitidos a los servicios de urgencias (Vonghia, et al. 2008). Uno de los efectos en salud más obvios producido por el consumo de cantidades masivas de alcohol, es el incremento de la BAC (Valencia et al., 2020). Las BACs altas pueden provocar depresión y paro respiratorio (+ 300 mg/dl), y la muerte (+ 500 mg/dl) en personas que no hayan desarrollado tolerancia al alcohol (Tabla 1) (Izquierdo, 2002).

TABLA I. ESTADIOS DE LA INTOXICACIÓN ALCOHOLICA

ALCOHOLEMIA (MG/100 ML)	EFFECTOS Y ALTERACIONES EN LA CONDUCTA	Tiempo requerido para que sea eliminado todo el alcohol
20-30	Sensación de bienestar, reducción del tiempo de reacción, ligera alteración del juicio y memoria	2 horas
30-60	Desinhibición, relajación, sedación leve, alteración de coordinación y del tiempo de reacción	4 horas
80-90	Dificultad en la discriminación auditiva y visual, alteraciones de la marcha, de la coordinación, sentimientos de tristeza o de exaltación, deseo de seguir bebiendo, enlentecimiento del habla	6 horas
110-120	Torpeza motriz evidente, dificultad en las actividades mentales, como memoria y juicio, disminución de la desinhibición, aparición de estados emocionales de agresividad ante contrariedades	8 horas
140-150	Deterioro de todas las funciones intelectuales y físicas, conducta irresponsable, sentimiento general de euforia, dificultad para permanecer levantado, andar y hablar. Alteración de la percepción y del juicio. Confianza en la capacidad de conducción e incapacidad para darse cuenta de que su funcionamiento intelectual y físico no es el adecuado	10 horas
200	Sentimiento de confusión o aturdimiento, dificultades para deambular sin ayuda o para permanecer levantado	12 horas
300	Disminución importante en la percepción y comprensión, así como de la sensibilidad	
400	Anestesia casi completa, ausencia de percepción, confusión y coma	
500	Coma profundo	
600	La muerte sobreviene por falta de respuesta del centro respiratorio	

La intoxicación aguda por alcohol puede causar varias alteraciones metabólicas, incluyendo hipoglucemia, acidosis láctica, hipopotasemia, hipomagnesemia, hipoalbuminemia, hipocalcemia e hipofosfatemia. Los efectos cardiovasculares relacionados con la intoxicación alcohólica aguda incluyen: 1) la inducción del estrés oxidativo vascular y cambios en la función endotelial, 2) el rebote del estado protrombótico secundario a la retirada del efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria, 3) efectos adversos en el perfil lipídico con elevación del colesterol LDL, sin incremento del colesterol HDL, 4) disminución de la presión arterial dentro de las primeras 4 horas de consumo, seguida de

una elevación significativa entre las 20-24 h y 4) afectaciones en la conducción del impulso eléctrico, ocasionando un mayor riesgo de arritmias (Valencia et al., 2020).

La principal consecuencia respiratoria potencialmente mortal de la intoxicación aguda por alcohol es la depresión respiratoria. Otros efectos respiratorios incluyen disminución de la sensibilidad de las vías respiratorias a cuerpos extraños, disminución del aclaramiento ciliar y aspiración, y un mayor riesgo de infección bacteriana con la consiguiente bronquitis y neumonía. Los efectos gastrointestinales incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal secundario a gastritis, úlcera péptica y pancreatitis. Los vómitos prolongados pueden provocar hiponatremia (Vonghia, et al. 2008).

El alcohol es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en un 90%, por esta razón se le atribuye un efecto directo sobre el cerebro, pues influye directamente en el potencial de acción neuronal, desencadenando efectos sobre la conducta a causa de alteraciones en la actividad eléctrica de la corteza, el metabolismo y en el sistema circulatorio cerebral (Schlesinger *et al*, 2017).

Estudios en modelos animales han demostrado una relación entre los cambios de comportamiento, la temperatura corporal y la concentración de neurotransmisores en el cerebro, ya que la administración de varias dosis de etanol (0.088-1.75 g/kg) ejerció una alteración bifásica dosis dependiente en el comportamiento y la temperatura corporal en ratones: dosis bajas (0.175 g/kg) causaron excitación e hipertermia, mientras que dosis de 0.875 y 1.75 g/kg produjeron un estado depresivo e hipotermia, estos efectos inducidos por etanol presentaron una fuerte correlación con cambios en los niveles cerebrales de histamina, indicando que el etanol produce cambios bifásicos dependientes de la dosis tanto en la temperatura corporal como en los niveles de histamina cerebral. Además, los cambios de comportamiento inducidos por el etanol pueden estar relacionados con los cambios inducidos por el etanol en la temperatura corporal y/o los niveles de histamina cerebral (Papanicolaou et al., 1980)

1.6 Daño neuronal asociado al alcohol

Durante el consumo de dosis agudas de etanol se incrementa la depresión funcional de las células nerviosas debido a la inhibición de la respiración celular, reduciendo el metabolismo oxidativo y con ello los fosfatos que aportan energía. Las regiones que son más susceptibles al efecto del alcohol son la corteza prefrontal, la corteza del cíngulo, el hipocampo y el cerebelo (Schlesinger et al, 2017).

El consumo crónico y severo de alcohol puede producir cambios en las emociones, en la personalidad, en la percepción, en el aprendizaje y en la memoria de las personas consumidoras. Investigaciones con técnicas de neuroimagen demuestran que los jóvenes con un patrón de consumo tipo *binge* (“atracción”), en el cual se consumen grandes cantidades de alcohol en períodos cortos, sufren una pérdida significativa del volumen hipocampal (Manzini, 2007).

La ingesta abundante de alcohol puede llegar a producir cambios neurodegenerativos y alteraciones mentales graves. Investigaciones en seres humanos demostraron que esta droga produce alteraciones en la memoria después de haber ingerido tan sólo uno o dos tragos. Este deterioro amnésico es dosis-dependiente: a mayor cantidad de alcohol, mayor alteración en la memoria. Incluso, bajo ciertas circunstancias, el alcohol puede bloquear completamente la capacidad para formar memorias de eventos que transcurren mientras una persona está intoxicada. Este tipo de alteraciones en la memoria son conocidas como *blackouts* (Manzini, 2007).

Los *blackouts* son causados por la ruptura en la transferencia de la memoria a corto plazo al almacenamiento a largo plazo. Se ha demostrado que el alcohol suprime profundamente la actividad de las células piramidales CA1 del hipocampo. Esta región hipocampal contiene una alta concentración de neuronas piramidales que facilitan la comunicación del hipocampo con otras regiones del cerebro. El hipocampo incorpora información de otras regiones del cerebro para formar nuevos recuerdos autobiográficos, y las células piramidales CA1 envían los resultados de este procesamiento a la neocorteza. El deterioro del hipocampo inducido por el alcohol, se deriva de la combinación de interacciones

directas entre los diferentes tipos de neuronas del hipocampo y las interacciones con neuronas de sus estructuras aferentes. Se ha propuesto que en el mecanismo por el cual el etanol induce los *blackouts*, es por la potenciación de la inhibición mediada por el ácido gamma-aminobutírico-alfa (GABA) y la interferencia en la activación del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) excitatorio del hipocampo, lo que da como resultado una disminución de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés, *Long-term potentiation*). La LTP se define como el establecimiento de una mayor capacidad de respuesta duradera a las señales de otras células. La LTP es una forma de plasticidad sináptica rápidamente inducida y de larga duración hipotéticamente relacionada con el aprendizaje y la memoria. Un requisito crítico para establecer LTP en el hipocampo es la activación del receptor NMDA, que facilita la entrada de calcio (Ca^{2+}) en la célula, lo que da como resultado una secuencia de eventos que conducen a cambios duraderos en la estructura y función de la célula. El mecanismo principal que subyace a los efectos del alcohol en la LTP es la interferencia de la activación del receptor NMDA del hipocampo, lo que impide la entrada de Ca^{2+} y los cambios que siguen, esta interrupción inducida por el alcohol del establecimiento de LTP comienza después de solo 1 o 2 tragos estándar (Rose, 2010).

En un estudio británico donde se utilizó el *UK Biobank*, investigadores evaluaron la salud del cerebro mediante resonancia magnética cerebral estructural y funcional en 25,378 adultos, los participantes proporcionaron información detallada sobre su consumo de alcohol. La cohorte incluyó 691 personas que nunca habían bebido, 617 ex bebedores y 24,069 bebedores actuales. La ingesta media de alcohol fue de 13,5 unidades (102 g) semanales, casi la mitad de la muestra (48,2 %) bebía por encima de las pautas actuales consideradas de bajo riesgo en el Reino Unido (14 unidades, 112 g semanales) y un bajo porcentaje bebía mucho (>50 unidades, 400 g semanales). Después de realizar múltiples comparaciones, un mayor volumen de alcohol consumido semanal, se asoció con un menor volumen de materia gris en casi todas las áreas del cerebro. De manera interesante se observó que el consumo de alcohol representó el 0,8 % de la variación del volumen de materia gris. Estos cambios cerebrales se han asociado anteriormente con envejecimiento y demencia, así como, con una disminución en el desempeño de la memoria, concluyendo

que no existe un nivel seguro de consumo de alcohol para la salud del cerebro y que no está claro cuál es la cantidad ni el tiempo de exposición necesarios para causar un efecto dañino (Topiwala et al., 2021).

El consumo excesivo de alcohol causa daño oxidativo en numerosos órganos del cuerpo, incluyendo el cerebro, el corazón y el hígado. Diversos estudios han propuesto que la muerte neuronal asociada al consumo de alcohol está relacionada con un mecanismo de estrés oxidativo (Tiwari y Chopra, 2011; Ikonomidou y Kaindl, 2011), ya que el etanol induce la producción de especies reactivas de oxígeno y la alteración del potencial de membrana mitocondrial (Heaton et al., 2011). Otros mecanismos que contribuyen de manera importante a la muerte celular programada inducida por etanol es la sobrecarga sostenida de Ca^{2+} intracelular, a través de la activación de caspasas (Nilsen et al., 2006; Kahraman et al., 2008). Alternativamente, se ha propuesto también que la muerte neuronal inducida por exposición al alcohol en neuronas en desarrollo y en líneas celulares se debe a un mecanismo de estrés reticular (Chen et al., 2008; Ke et al., 2011).

1.7 Alcohol como inductor de estrés del retículo endoplasmático

El SNC es particularmente vulnerable al daño inducido por el etanol y se han observado alteraciones patológicas en la estructura cerebral y la función neuronal en pacientes y modelos animales (Yang y Luo, 2015). Estudios han demostrado que el estrés del retículo endoplásmico juega un papel relevante en la patogénesis de enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Huntington, la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La causa de la neurodegeneración inducida por etanol no es clara, sin embargo, a partir de estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* se ha propuesto la participación del estrés reticular en el daño neuronal inducido por alcohol (Ji, 2012).

Ke y colaboradores (2011) demostraron que la administración aguda por inyección subcutánea de etanol (2.5 g/Kg al 20% v/v) en ratones C57BL/6 estimuló un incremento significativo en la expresión de proteínas inducidas por estrés reticular, GRP78, CHOP y ATF6; así mismo, indujo la fosforilación de IRE1, eIF2 α , PERK y PKR, 4 horas después de la administración de la droga, algunas de estas proteínas se mantuvieron elevadas hasta

las 24 h. El incremento en la fosforilación de eIF2 α , la expresión de caspasa-12 y CHOP inducido por etanol fue observado en áreas específicas de la corteza cerebral, tálamo e hipocampo. Estos datos demuestran que el etanol induce estrés reticular en neuronas inmaduras y proporcionan una nueva visión de los efectos neurotóxicos de esta droga en el SNC en desarrollo.

1.8 Retículo endoplásmico (RE)

El RE es un organelo compuesto por una membrana continua que comprende la envoltura nuclear. Se pueden identificar dos tipos, el RE rugoso, constituido por láminas periféricas aplanadas con ribosomas donde ocurre la síntesis y plegamiento de proteínas y el RE liso, que es una red compleja de túbulos lisos que se extienden por toda la célula y es donde se llevan a cabo varias funciones celulares, como la desintoxicación de fármacos, la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, y el almacenamiento de Ca²⁺ (Healy, et al., 2012).

1.9 Estrés del retículo endoplásmico

La mayoría de las proteínas secretadas recién sintetizadas se someten a modificación, plegamiento y oligomerización post-traduccionales en el lumen del RE, lo que les permite asumir su forma terciaria correcta, que es necesaria para sus funciones fisiológicas. Este proceso es complejo y depende de la función de varias proteínas chaperonas residentes en el RE, así como de enzimas glicosilantes, niveles de Ca²⁺ adecuados y un entorno altamente oxidante en el lumen. Hay diversos factores, que son desfavorables para el funcionamiento del RE (hipoxia, privación de energía, estrés oxidativo, ciertas mutaciones de proteínas que transitan por el RE, mutaciones de enzimas involucradas en la glicosilación o en el control de calidad de las proteínas, la pérdida de la homeostasis del calcio o del entorno oxidante), que comprometen el proceso de plegamiento de proteínas, que conlleva a la acumulación y/o agregación de proteínas desplegadas/mal plegadas en el lumen del RE desencadenando una condición conocida como "estrés del RE". (Healy, et al., 2012; Sovolyova, et al., 2014).

Para combatir el estrés del RE y restaurar el funcionamiento normal de las células, ha evolucionado un mecanismo de respuesta al estrés altamente conservado denominado "respuesta a proteínas desplegadas" (UPR, *unfolded protein response* por sus siglas en

inglés). La existencia de la UPR se propuso hace 25 años, cuando Kozutsumi y sus colegas informaron sobre la inducción de proteínas reguladas por glucosa (GRP) residentes en el RE tras la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE en las células de mamíferos (Kozutsumi et al., 1988). En ese momento, se desconocían las señales posteriores iniciadas como consecuencia de esta acumulación de proteínas, pero estaba claro que existía un mecanismo adaptativo mediante el cual las células monitorean los eventos en el lumen del RE y activan las señales posteriores. Ahora tenemos una comprensión mucho mejor de la UPR y su función como una respuesta adaptativa a favor de la supervivencia, proporcionando un mecanismo por el cual las células pueden sobrevivir al estrés hasta que se restablezca la homeostasis. En los casos en que el estrés del RE es severo, la señalización UPR cambia de pro-supervivencia a pro-apoptótica, lo que compromete a la célula a la muerte (Schröder y Kaufman, 2005; Healy, *et al.*, 2012).

Durante la última década, la vía de estrés del RE se ha convertido en un factor importante que contribuye a la patogenia de varias enfermedades, la lista incluye distroglicanopatías, mala localización y tráfico de proteínas, microvascularización y tumorigénesis, replicación del virus de Epstein-Barr, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades renales y trastornos neurodegenerativos, entre otras. Es la evidencia que respalda la asociación del estrés del RE con varias enfermedades humanas, especialmente la diabetes y el cáncer, lo que está impulsando en gran medida el interés por comprender el estrés del RE y los mecanismos relacionados (Gerlach, 2012).

1.10 UPR

El objetivo de la UPR es restaurar la homeostasis del RE mediante la coordinación y el cierre temporal de la traducción de proteínas, junto con un programa complejo de transcripción de genes para aumentar la capacidad de plegamiento del RE. La UPR es mediada por tres sensores transmembranales de estrés: el factor de activación de transcripción 6 (ATF6), la cinasa transmembranal que requiere inositol/endoribonucleasa 1 (IRE1) y la proteína cinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) parecida a la cinasa del factor de iniciación eucariótico 2 α (eIF2 α) (PERK). Normalmente, en células sanas, la proteína de unión a inmunoglobulina (GRP78) se une a las proteínas sensores en

los dominios luminales del RE e inhibe su activación. Sin embargo, tras la acumulación de proteínas mal plegadas, la GRP78 se disocia de los sensores en respuesta al estrés del RE y se une a las proteínas mal plegadas, lo que lleva a la activación de los sensores. Una vez activadas, las proteínas de señalización PERK, IRE1 y ATF6 coordinan un extenso programa de expresión génica mediado por la activación de factores de transcripción en sentido descendente. (Healy, et al., 2012; So, 2018).

IRE1

Después de la disociación de GRP78, IRE1 se dimeriza y sufre trans-autofosforilación, lo que resulta en IRE1 activo. Una vez que se activa IRE1, la actividad de la endoribonucleasa C-terminal escinde un intrón de 26 nucleótidos del ARNm de la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1), lo que desencadena una mutación de cambio de marco que permite la generación de un factor de transcripción más estable, XBP1 empalmado (XBP1s), que está dotado de un nuevo C-terminal que contiene un potente dominio de transactivación. XBP1s regula un subconjunto de genes UPR involucrados en el plegamiento de proteínas, control de calidad, biogénesis lipídica y la degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD, *ER-associated degradation*, por sus siglas en inglés).

PERK

PERK es una proteína serina / treonina cinasa que en condiciones de estrés sufre oligomerización y autofosforilación del dominio cinasa. La proteína PERK activada fosforila al eIF2 α en la serina 51, lo que produce una inhibición general de la traducción de proteínas. Sin embargo, el eIF2 α fosforilado aumenta selectivamente la traducción del factor de activación de transcripción 4 (ATF-4), que induce la expresión del factor proapoptótico CHOP (proteína homóloga de C/EBP o GADD153), lo que lleva a la apoptosis inducida por el estrés del RE.

ATF6

ATF6 bajo condiciones de estrés se transloca desde el RE al aparato de Golgi donde es escindido por las proteasas S1P y S2P para producir el extremo amino-terminal de ATF6 (ATF6-N), que luego migra al núcleo. Uno de los objetivos transcripcionales de ATF6 es el

sustrato XBP1. Otros objetivos transcripcionales incluyen proteínas que aumentan la actividad de chaperonas y ERAD. Aunque ATF6 no es esencial para la expresión basal de chaperonas, desempeña un papel importante en la recuperación del estrés agudo del RE. Además, un estudio reciente muestra que ATF6 también contribuye, de manera independiente de XBP1s, a la biogénesis lipídica y a la expansión del RE, una respuesta al estrés del RE que se pensaba que estaba mediada predominantemente por la vía IRE1.

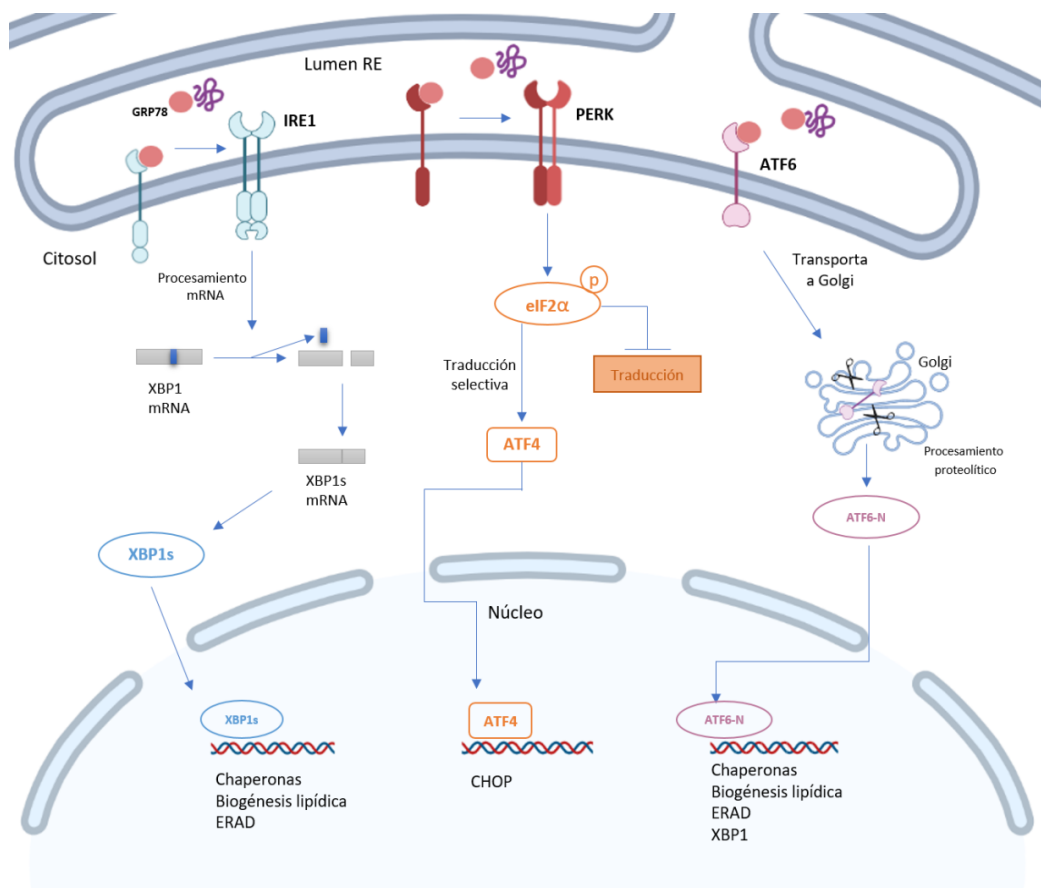


Fig. 3 Vías de señalización de la UPR. En condiciones normales, GRP78 se une a las proteínas sensores en los dominios luminales del RE e inhibe su activación. GRP78 se disocia de los sensores en respuesta al estrés del RE y se une a las proteínas desplegadas, lo que lleva a la activación de los sensores. El estrés induce la oligomerización y autofosforilación de IRE1, el cual activado realiza un corte y empalme no convencional de XBP1 en células de mamíferos. Este empalme induce un cambio de marco de

traducción, como factor de transcripción, XBP1s activa genes relacionados con la UPR, incluidas las chaperonas, los componentes ERAD y las enzimas biosintéticas de lípidos. En condiciones de estrés PERK sufre oligomerización y autofosforilación, su activación fosforila eIF2 α lo que produce una inhibición general de la traducción de proteínas. Sin embargo, el eIF2 α fosforilado aumenta selectivamente la traducción de ATF4, que regula al alza el ARNm de CHOP, la incapacidad de aliviar el estrés del RE conduce a la apoptosis mediada por CHOP. ATF6 se traslada desde el RE al aparato de Golgi bajo estrés, donde es escindido para producir el ATF6 activo (ATF6-N), que luego migra al núcleo y regula al alza los genes diana que codifican chaperonas, componentes ERAD y XBP1 (Modificado de So, 2018).

2. Justificación

La ingesta abundante y prolongada de alcohol puede dar lugar a cambios neurodegenerativos en el SNC, sin embargo, no se conoce si otras modalidades de consumo inducen el mismo daño, qué es lo que sucede con las personas que ingieren mucho alcohol en poco tiempo y qué pasa con los que toman sólo dos copas en una fiesta. Estudios sugieren que el daño cerebral inducido por alcohol no tiene como condición necesaria la ingesta crónica de la sustancia (Manzini, 2007), es decir, que otros patrones de consumo también podrían provocar cambios neuropatológicos en seres humanos y se ha sugerido que no existe un nivel seguro de consumo de alcohol para la salud del cerebro y no está claro cuál es la cantidad ni el tiempo de exposición necesarios para causar daño (Topiwala et al., 2021). Hasta el momento no se conoce el mecanismo exacto por el cual el alcohol causa daño en el cerebro. Sin embargo, se ha demostrado que el etanol causa estrés reticular en hepatocitos (Kaplowitz y Ji, 2006) y células pulmonares (Kaphalia et al., 2014). Recientemente se ha reportado que la exposición aguda a etanol (2.5 g/Kg, subcutánea) en ratones de 7 días postnatales induce estrés reticular en la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo. Esta evidencia sugiere que el etanol induce directamente estrés del RE en el cerebro en desarrollo (Ke et al., 2011). Sin embargo, no existe evidencia de que este mecanismo se presente en neuronas maduras expuestas agudamente a etanol, por lo que este trabajo tiene como objetivo, estudiar si la administración aguda de dosis altas de etanol inducen estrés reticular en el hipocampo de ratas adultas.

3. Hipótesis

La exposición aguda a altas dosis de etanol induce estrés del retículo endoplásmico en el hipocampo de la rata activando una respuesta a proteínas mal plegadas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar marcadores de respuesta al estrés del retículo endoplásmico en hipocampo de ratas Wistar expuestas de manera aguda a una dosis alta de etanol de 3g/Kg peso.

4.2 Objetivos Específicos

1. Validar si la exposición aguda a altas dosis de etanol induce estrés del retículo endoplásmico en hipocampo mediante la técnica de Western blot.
2. Identificar la participación de las vías IRE1, PERK y ATF-6 de la respuesta a proteínas desplegadas por la cual se produce un cese al estrés reticular.

5. Materiales y Métodos

5.1 Animales

Utilizamos como modelo animal ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de 4 meses de edad, que ya se consideran adultos en base a su peso corporal, crecimiento óseo, madurez sexual y musculo-esquelético (Enesto y Leblond, 1962; Quinn, 2005; Sengupta, 2013). Las ratas (200-250 g) fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y mantenidas en cajas de policarbonato (5 sujetos por caja) en un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 h (7:00 AM-7:00 PM) hasta alcanzar los 350-400 g. Recibieron agua y alimento *ad libitum*, y su manejo se realizó de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, y con el protocolo aprobado por el Comité de Ética del INPRFM (CONBIOÉTICA-09-CEI-010-20170316).

5.2 Tratamiento

Las ratas Wistar macho de 350-400 gr (4 sujetos por grupo: Naïve, Control, 0.5, 1 2, 4, 8, 12 y 24 h) fueron administradas intraperitonealmente (i.p.) con una dosis de agua (control)

o etanol (25% v/v) de 3.0 g/Kg (5.0-6.0 ml de volumen inyectado), no se observaron signos de irritación de la cavidad peritoneal, dolor, malestar o inflamación periférica inducida por la concentración de etanol intraperitoneal, lo que concuerda con otros estudios que han utilizado la administración de etanol intraperitoneal (Allen-Worthington, et al., 2015) . En el Departamento de Neuroquímica del INPRFM, se ha demostrado que la administración aguda i.p. de una dosis de 3.0 g/kg de etanol al 25% v/v causa disminución en la actividad locomotora y sedación (Hernández-Vázquez et al, 2019). Diversos estudios han demostrado que la administración de etanol a concentraciones mayores al 25% causa daño endotelial, trombosis e irritación mucointestinal, evitando su absorción (Strubelt, et al. 1974). El grupo naïve no tuvo ninguna manipulación para descartar estrés por la administración. Posterior al tratamiento, las ratas fueron sacrificadas a distintos tiempos (0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h, con el fin de analizar el curso temporal de la expresión de las proteínas marcadoras de estrés reticular), se colectó la sangre troncal y se extrajo el cerebro. El grupo control fue sacrificado a las 24 horas después del tratamiento y al mismo tiempo que el grupo naïve. La sangre troncal fue procesada con EDTA (1.5 mM) y centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos para obtener el plasma, el cual fue congelado hasta la determinación de la BAC. El cerebro fue inmediatamente congelado en hielo seco y mantenido a -70°C hasta su procesamiento.

5.3 Determinación de etanol en sangre

A partir del plasma de las ratas tratadas con agua o etanol, se determinó la concentración de etanol en sangre, mediante la reacción de oxidación de etanol a acetaldehído catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en presencia del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺).



La concentración de alcohol en sangre se determinó siguiendo la técnica reportada por Poklis y Mackell (1982), con algunas modificaciones. Brevemente, el plasma (300 µl) se desproteinizó con 450 µl de ácido tricloroacético, se agitó y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se construyó una curva estándar de etanol (5-320 mg/dl), en la que se interpolaron los resultados obtenidos a partir de 100 µl de las muestras de plasma

desproteinizadas de los animales tratados, a las que se le agregó 100 μ l de NAD, 100 μ l de ADH y 2.7 ml de buffer de glicina-hidrazina. Se leyó la absorbancia del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro 25 minutos después del inicio de la reacción.

5.4 Western Blot

5.4.1 Preparación de las muestras

A partir de los cerebros congelados de los animales experimentales se obtuvo diferentes regiones cerebrales, disecando el cerebro congelado sobre una caja petri con hielo seco para evitar la degradación de las proteínas, se utilizó el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1982) para trazar los cortes y realizar rebanadas, se localizó el hipocampo, se extrajo, congeló y almacenó para su subsecuente procesamiento. Posteriormente, el hipocampo se homogenizó con 600 μ L de buffer RIPA con inhibidor de proteasas (Complete, Roche), el homogenado se centrifugó 30 minutos a 15,000 rpm obteniéndose el sobrenadante. Se cuantificó la proteína de los sobrenadantes utilizando el kit micro BCA (ThermoFisher) mediante el método establecido por el proveedor. La lectura de la absorbancia se realizó a 562 nm en un lector de placa (Epoch, Biotek). Los inmunoblots se realizaron con 50 μ g de proteína total, previamente desnaturalizada.

5.4.2 Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles al 10-12% de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes con un buffer de electroforesis (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH 8.3). En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, BioRad). Los geles se corrieron a 20 mA por gel en la cámara de electroforesis (Mighty Small II SE 250, Amersham bioscience).

5.4.3 Electrotransferencia

Posterior a la separación de las proteínas por electroforesis, fueron transferidas a una membrana de PVDF. Para ello, la membrana se activó con metanol y posteriormente se colocó en el buffer de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%, metanol 20% v/v, pH 8.3). Se montó el casete de transferencia y se colocó en la cámara de

transferencia húmeda (TE 22 Mighty Small™, Amersham Bioscience). La transferencia se realizó por 3.5 horas a 400 mA.

5.4.4 Inmunodetección

Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en agitación por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (ver anexo A), se lavó el exceso con TBS-T, para posteriormente incubar el anticuerpo secundario apropiado acoplado a HRP (ver anexo A), se lavó la membrana con TBS-T y con PBS. Las bandas de las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (Western Bright ECL HRP substrate, Advasta). Las inmunotransferencias se escanearon y se cuantificaron utilizando Molecular Image® ChemiDoc™ XRS+ con Image Lab™ Software. Posterior a la detección de la proteína de interés, se realizó un lavado con buffer Mild stripping de Abcam y se procedió a incubar con el anticuerpo primario contra actina (1:5000) para normalizar la carga.

5.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc Tukey-HSD de comparación múltiple, utilizando el programa Statview y se presentan como media \pm error estándar, con una n de 4 animales para cada grupo experimental. En todos los casos se tomaron como significativos valores de $p < 0.05$.

6. Resultados

Para conocer y asociar los posibles cambios en la expresión de las proteínas marcadoras de estrés reticular con la administración aguda de una dosis alta de etanol, se determinó la BAC a diferentes tiempos. Los niveles de alcohol en sangre en el curso temporal se muestran en la figura 4. Los resultados muestran que los niveles de alcohol en sangre incrementaron significativamente desde los 30 min, alcanzado su nivel máximo entre 1 y 2 horas después la administración del etanol. A las 4 horas la BAC desciende un 46%. Después de 8 horas de administrada la droga se observa que los niveles de alcohol en sangre retornan a niveles basales, lo que sugiere que el etanol se metabolizó.

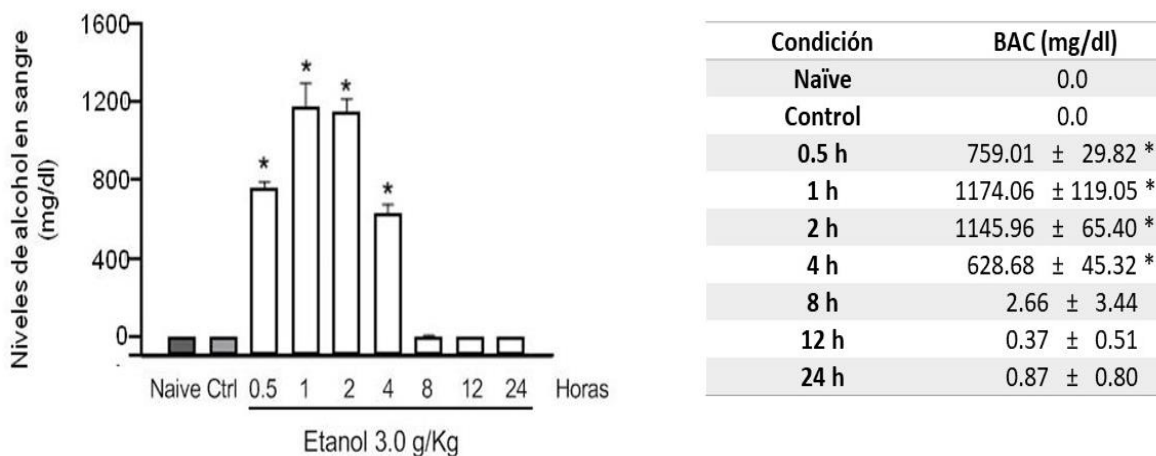


Fig. 4 Niveles de alcohol en sangre de ratas Wistar macho adultas a las 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después del tratamiento intraperitoneal 3.0 g/Kg con etanol 25% (v/v) o con agua como control. Los valores se expresan como el promedio \pm EEM de 4 animales en cada grupo. * $p < 0.001$ vs control.

Posteriormente, se analizó mediante western blot la expresión de las proteínas marcadoras de estrés reticular (GRP78, CHOP, IRE1, IRE1-p, XBP1, PERK, eIF2 α , eIF2 α -p ATF4, y ATF6,) en homogenados de hipocampo de ratas tratadas agudamente con una dosis alta de etanol. Inicialmente se examinó la expresión de las proteínas GRP78 y CHOP, los principales marcadores de estrés reticular, observándose un incremento significativo de 1.9 veces en la expresión de ambas proteínas 2 horas después de la exposición al etanol. La expresión de la proteína GRP78 permanece elevada significativamente 1.6 veces hasta las 24 horas después de la exposición a la droga. En el caso de CHOP, se observó un nivel máximo de incremento de 2.6 veces respecto al control a las 8 horas y se mantuvo elevado hasta las 12 horas después de la administración del etanol. Este incremento en la expresión de las proteínas GRP78 y CHOP indicó que el tratamiento con una dosis alta de etanol induce estrés reticular.

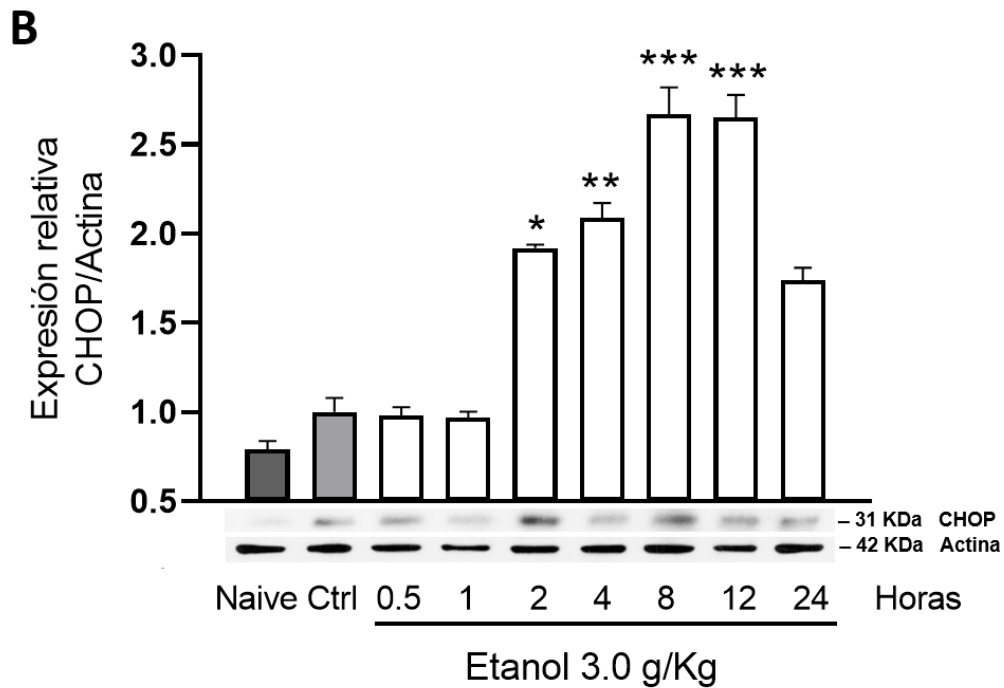
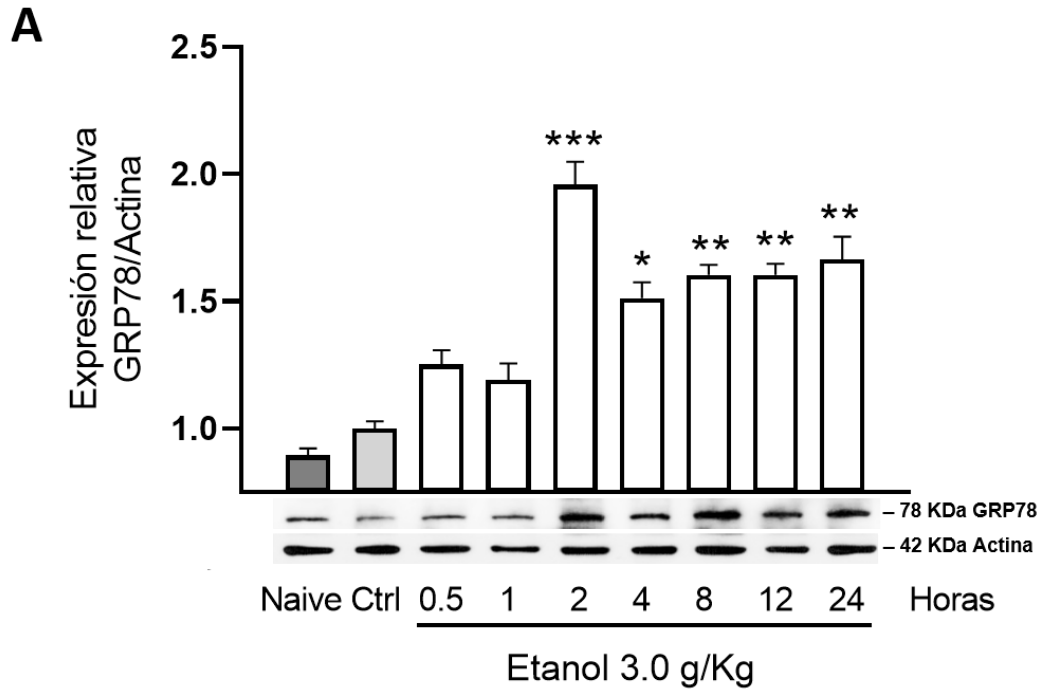


Fig. 5 Curso temporal de la expresión relativa de las proteínas inducibles por estrés reticular GRP78 (A) y CHOP (B) en hipocampo de rata después del tratamiento agudo de 3.0 g/Kg de etanol (25% v/v, i.p) Los valores se expresan como veces con respecto al control, normalizado a 1. Se muestra un blot representativo de cada grupo experimental en la parte inferior de cada histograma. Los asteriscos representan la significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$ vs control.

Una vez que se observó que la expresión de las proteínas GRP78 y CHOP incrementaron con el protocolo de administración aguda de 3.0 g/kg de etanol, se continuó con la determinación de cambios en la expresión de las proteínas sensores de la UPR: IRE1, PERK y ATF-6. En el caso del sensor IRE1, se observó una disminución en la expresión de la proteína a partir de los 30 min y hasta las 24 h en un 0.3-0.5 veces después de la administración del etanol con respecto al tratamiento de agua (Fig. 6A). Por otro lado, la proteína IRE1 fosforilada (IRE1-p) incrementó significativamente 3.7 veces a partir de los 30 min y se mantuvo elevada significativamente en promedio 2 veces a las 1, 4, 8 y 12 horas (Fig. 6B). Estos datos indican que la vía de IRE1 se está activando y se observan dos fases de activación en el transcurso de las 24 h. De la misma manera, se observó que la proteína corriente abajo de IRE1, XBP1, se procesa, ya que hay un incremento significativo de 1.9 veces de la proteína procesada (40 kDa) a partir de los 30 min y de 1.6 veces hasta las 4 h (Fig. 6C).

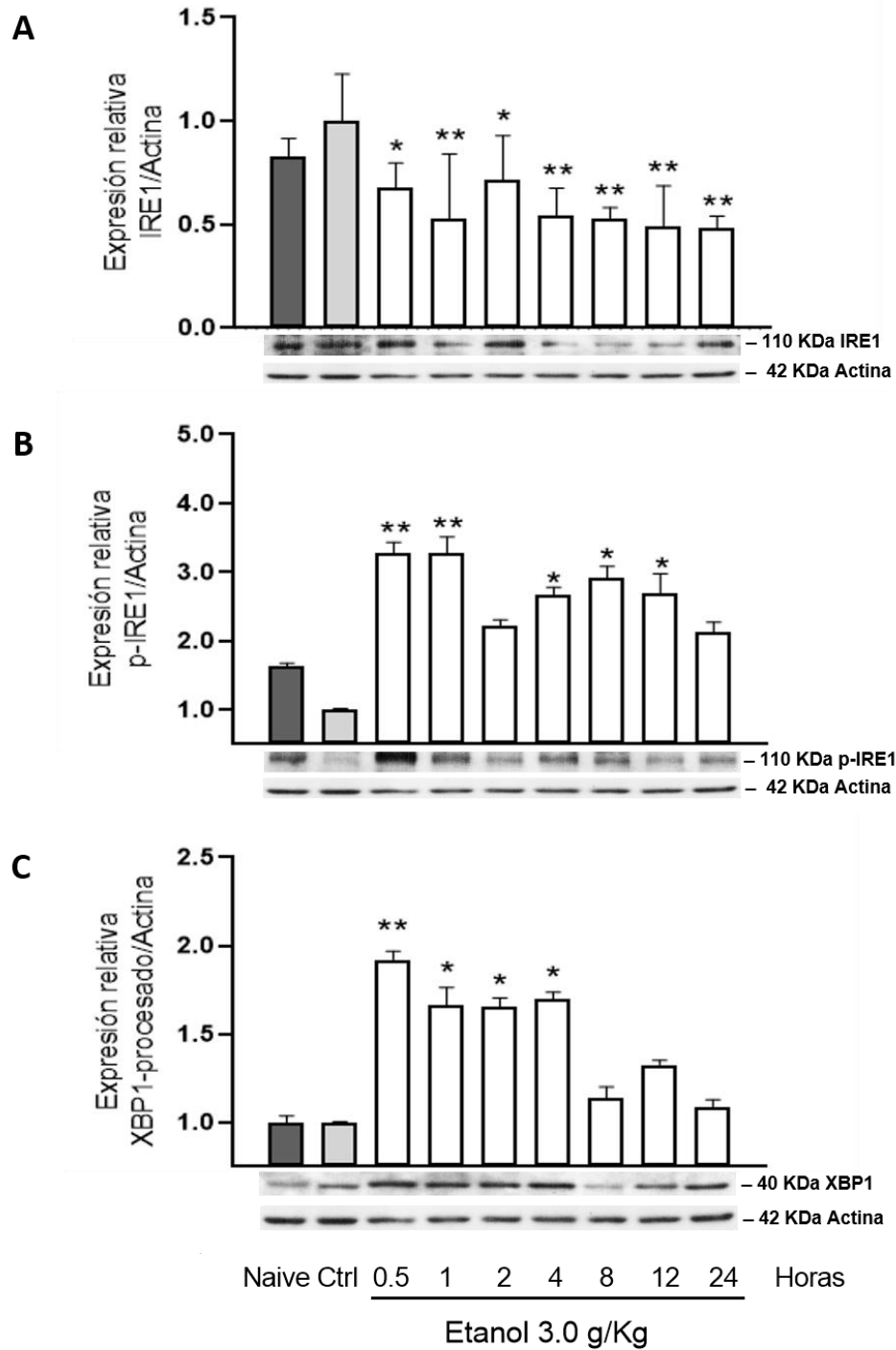


Fig. 6 Efecto del etanol en la expresión de la vía de señalización asociada a IRE1 por estrés del RE. Curso temporal de la expresión de IRE1 (A), de su forma fosforilada (B) y del procesamiento de XBP1(C) en hipocampo de ratas tratadas agudamente con una dosis de 3.0 g/Kg de etanol (25% v/v, i.p). Los valores se expresan como veces con respecto al control normalizado a 1. Se muestra un blot representativo de cada grupo experimental en la parte inferior de cada histograma. Los asteriscos representan la significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$ vs control.

En la vía del sensor PERK, se observó una sobre-expresión de 1.6 y 1.8 veces a la 1 y 2 horas después de la administración de la droga, respectivamente (Fig. 7A). PERK fosforila al factor eIF2 α corriente abajo, el cual transcribe selectivamente a ATF-4. En el caso de la proteína eIF2 α , se observó un incremento significativo de 2.3 veces en su expresión a partir de los 30 min y se mantuvo elevado en 2.1 veces hasta las 2 h y nuevamente a las 12 horas (Fig. 7B). La expresión de la proteína eIF2 α activada (fosforilada) incrementó significativamente 8 veces a partir de los 30 min y se mantuvo elevada 4.8 veces hasta las 4 h, disminuyendo a las 8 h y volviendo a incrementar 6.5 veces a las 12 y 24 h (Fig. 7C). La proteína final, corriente abajo de la vía de PERK, ATF-4, mostró un aumento significativo en su expresión de 1.6 veces con respecto al control a las 2 horas y un segundo incremento significativo de 1.5 veces a las 12 y 24 h (Fig. 8). Los resultados muestran que la administración de una alta dosis de etanol induce la activación de la vía de PERK.

En el caso del sensor ATF6, no se detectó la banda correspondiente al peso molecular de esta proteína, el anticuerpo primario utilizado, no dio una marca específica. Esto puede ser consecuencia de que el anticuerpo primario es policlonal y no se puede asegurar que la banda que se observó sea la de ATF6.

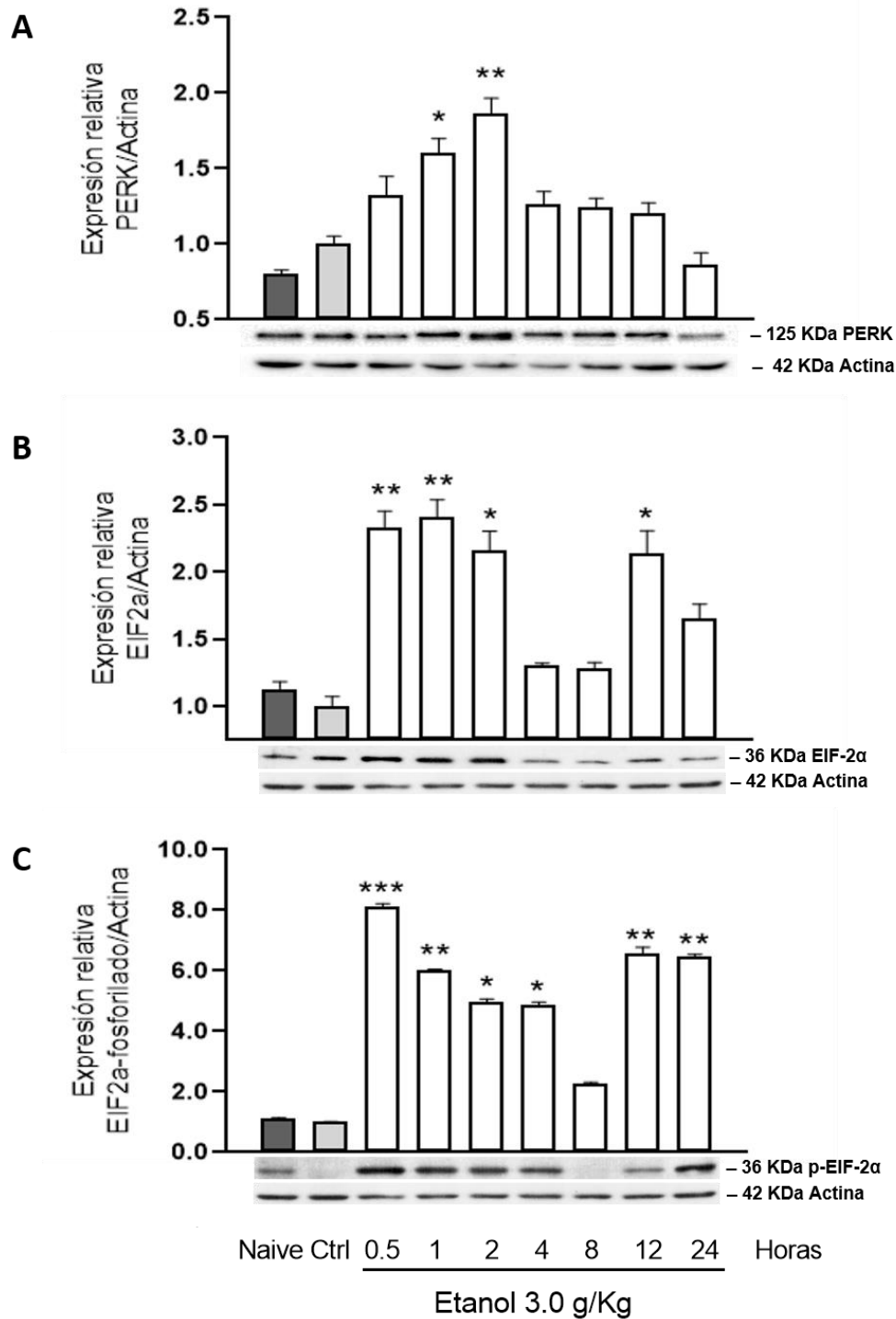


Fig. 7 Efecto de la administración aguda de 3.0 g/Kg de etanol (25% v/v, i.p) en la expresión de la vía de señalización de PERK (A) y sus proteínas corriente abajo eIF2α (B) y su forma activa-fosforilada (C) en hipocampo de rata. Los valores se expresan como veces con respecto al control normalizado a 1. Se muestra un blot representativo de cada grupo experimental en la parte inferior de cada histograma. Los asteriscos representan la significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$ vs control.

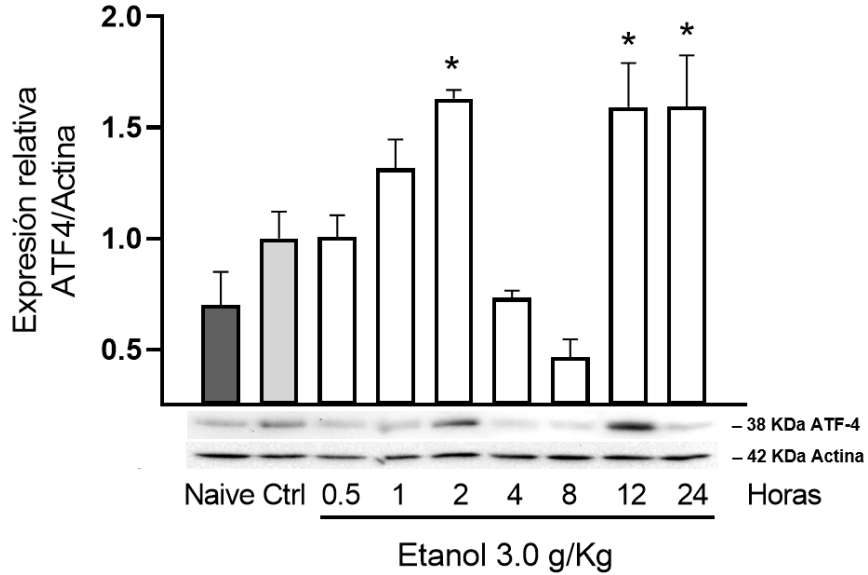


Fig. 8 Efecto de la administración aguda de 3.0 g/Kg de etanol (25% v/v, i.p) en la expresión de ATF4. Los valores son expresados en veces con respecto al control normalizado a 1. Se muestra un blot representativo de cada grupo experimental en la parte inferior de cada histograma. Los asteriscos representan la significancia $*p < 0.05$ vs control.

La figura 9 resume el comportamiento de las vías de señalización activadas por la UPR en el tratamiento agudo por etanol 3.0 g/Kg, mostrando dos fases de activación en el curso temporal.

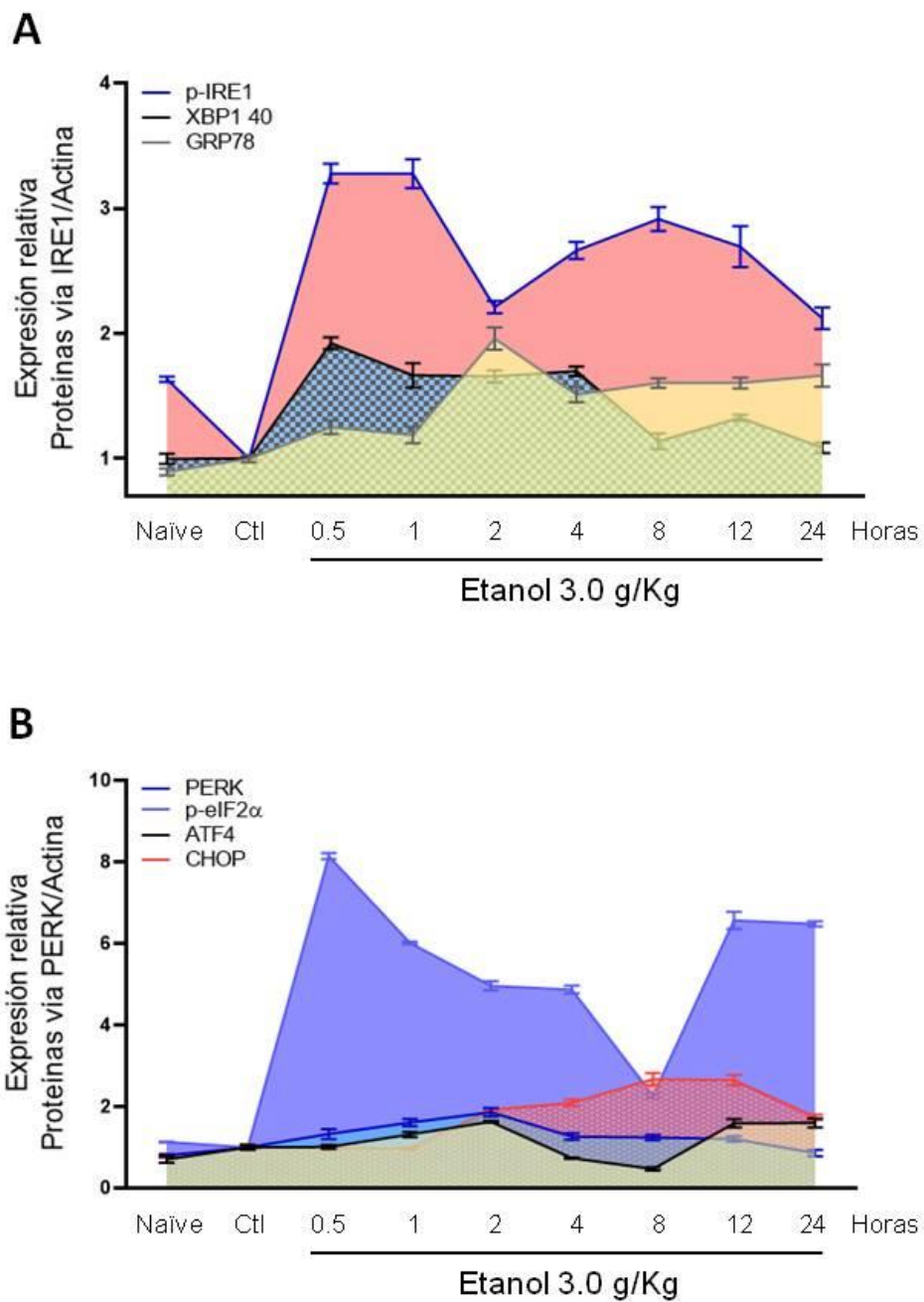


Fig. 9 Efecto del tratamiento agudo de una dosis alta de etanol (3.0 g/Kg) en la expresión de las vías de señalización asociadas por estrés reticular IRE1 (A) y PERK (B).

7. Discusión

La ingestión de una gran cantidad de alcohol da lugar a la intoxicación alcohólica aguda, una condición clínicamente grave. La presencia del alcohol a altas concentraciones puede afectar potencialmente a cualquier tejido y órgano, alterando su función, de forma tanto aguda como crónica, con efectos conductuales, cardíacos, gastrointestinales, pulmonares, neurológicos y metabólicos (Vogonia, et al. 2008; Valencia, 2020). México no se caracteriza por el consumo de grandes cantidades de alcohol, el consumo per cápita es de 4.4 litros por año. Sin embargo, actualmente el patrón de consumo se caracteriza por ser excesivo, es decir, se consumen grandes cantidades de alcohol en periodos cortos de tiempo (binge drinking), principalmente los fines de semana (CONADIC, 2018). Además, el consumo de bebidas alcohólicas es uno de los principales factores de riesgo a la salud en nuestro país. El estudio de Carga Global de Enfermedad estima que durante 2017 el consumo de alcohol fue el sexto factor de riesgo asociado a muerte prematura en población general.

En condiciones normales, el RE participa en la síntesis y plegamiento de proteínas, este proceso es altamente dependiente de Ca^{2+} , de allí que perturbaciones en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, inhibición de la glicosilación, reducción de puentes di-sulfuro, daño en el transporte de proteínas al aparato de Golgi, alteración en el sistema de degradación ERAD y el estrés oxidativo induzcan acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, alterando su funcionamiento y desencadenando un mecanismo de estrés del retículo endoplásmico o estrés reticular (Malhotra y Kaufman, 2007; Kadowaki y Nishitoh, 2013). Ante esta condición, la célula activa una respuesta inicial mediada por proteínas chaperonas como GRP78, que tienen como finalidad inducir el correcto plegamiento y funcionamiento de las proteínas. Si la sobrecarga de proteínas mal plegadas no es contenida y el estrés persiste, estas son exportadas del RE al citosol, donde son degradadas por los proteosomas (ERAD) o por autofagia. Finalmente, si la maquinaria de replegamiento y degradación está deteriorada o es insuficiente para hacer frente a la carga de proteínas mal plegadas, se activa la UPR, lo que implica la regulación positiva de los factores de replegamiento y degradación. Si el estrés del retículo endoplásmico es severo, o no se contiene a tiempo, se activará un programa de muerte celular (Scheper & Hoozemans, 2009; Hetz, 2012).

Los resultados muestran un aumento importante en la activación de la UPR en el hipocampo de ratas tratadas con una sola administración de etanol a una dosis de 3.0 g/Kg. La administración aguda de una dosis alta de etanol activa dos de los tres sensores de estrés del RE transmembranales, por un lado, IRE1 regula el procesamiento de XBP1 para producir un cese del estrés, incrementando la expresión de la chaperona GRP78 que induciría una mayor capacidad de plegamiento, y, por otro lado, se observa al sensor PERK fosforilar a eIF2- α que induce la transcripción selectiva de ATF4 y este a su vez promueve la expresión del factor pro-apoptótico CHOP. Este mecanismo de daño no es privativo del consumo o exposición al alcohol, se ha observado que juega un papel importante en otras patologías como en las enfermedades neurodegenerativas (Scheper y Hoozemans, 2009), la obesidad y la diabetes (Zhang et al., 2013; Kogn et al., 2018).

Si se analiza el curso temporal de la expresión de todas las proteínas estudiadas, se observan dos fases de activación de la UPR: 1) una inicial que comprende de los 30 min a las 4 horas después a la administración de la droga, que se correlaciona con el periodo de incremento en la concentración de alcohol en sangre; y 2) una fase de estrés prolongado, que se presenta entre las 8 y 24 h en donde se observa un incremento en la expresión de algunas proteínas reguladoras de la UPR, aún después de la eliminación del etanol (Fig. 4). La primera fase puede considerarse como adaptativa, ya que es en este periodo donde se incrementa la expresión de todos los marcadores, indicándonos que se activó la UPR para contener el estrés. Por otro lado, el incremento en la expresión de ATF4 y CHOP que tienen un pico máximo a las 12 y 24 h, indica que finalmente en el curso temporal de la administración de la droga se puede estar induciendo un mecanismo de estrés reticular severo que puede conducir a un proceso de muerte celular por apoptosis mediada por CHOP (Fig. 9A y B). Se sabe que CHOP promueve la apoptosis por varios mecanismos: 1) regulando a la baja la expresión de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*, por sus siglas en inglés), un proto-oncogén que promueve la supervivencia, 2) elevando la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 con residuo BH3-only como Bad (*Bcl-2-associated death protein*, por sus siglas en inglés), Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*, por sus siglas en inglés) y el modulador de apoptosis regulado por la proteína supresora de tumores

53 (p53) coordinando la señalización del Ca^{2+} intracelular (Oyadomari y Mori, 2004; Sprenkle, et al. 2017).

La inducción del estrés reticular por el etanol puede ser un efecto directo del propio compuesto o puede ser resultado de compuestos generados en su degradación. Existen varios mecanismos potenciales responsables del estrés del RE inducido por etanol en las neuronas, que incluyen la producción de aductos de acetaldehído, el estrés oxidativo y la alteración de la homeostasis del calcio intracelular (Ji, 2012; Yang & Luo, 2015)

Aductos de acetaldehído

El alcohol es oxidado a través de tres vías enzimáticas produciendo acetaldehído. El acetaldehído es altamente reactivo y reacciona con las proteínas para formar bases de Schiff y así formar aductos proteína-acetaldehído (Nakamura, et al. 2003). Cuando existe una alta concentración de acetaldehído en estado estacionario debido a un consumo excesivo de alcohol, estos aductos se producen por el ataque nucleofílico principalmente del grupo ϵ -amino de los residuos de lisina al grupo carbonilo del acetaldehído (Upadhyay y Ravindranath, 2002; Zakhari, 2006; Ji, 2012). Los aductos de acetaldehído inician reacciones inmunogénicas, que provocan cambios conformacionales e inactivación de los blancos aducidos o desencadenan una degradación aberrante de proteínas, que pueden producir citotoxicidad o inflamación (Ji, 2012; Yang y Luo, 2015). Después de la activación inflamatoria, la UPR causa una inflamación excesiva e induce apoptosis (Garg, 2012; Sprenkle, 2017, So, 2018)

Se ha reportado que ratones (8 semanas de edad) alimentados por 7 días con una dieta líquida en presencia de alcohol (5% v/v) mostraron formación de aductos de acetaldehído en la corteza cerebral, sugiriendo un posible mecanismo de neurodegeneración. Por otro lado, Phillips (1989) reportó que ratas administradas intraperitonealmente con acetaldehído mostraron degeneración neuronal en el hipocampo y la corteza cerebral. Un estudio post-mortem de un paciente alcohólico que bebió por 24 años, constató la formación de aductos estables de acetaldehído en la corteza frontal y en el mesencéfalo (Nakamura, et al. 2003). Estos trabajos comprueban la relevancia de la formación de los aductos de acetaldehído en los mecanismos de daño o degeneración neuronal.

Estrés oxidativo

Es ampliamente conocido que el consumo de etanol aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*, por sus siglas en inglés), como: superóxido, H₂O₂ (peróxido de hidrogeno), peróxidos de lípidos y peroxinitrito (Zakhari, 2006; Comporti, et al. 2010). En el RE, las proteínas se someten a un plegamiento proteico oxidativo. La proteína disulfuro isomerasa (PDI, *Protein Disulfide Isomerase*, por sus siglas en inglés) cataliza la formación y ruptura de enlaces disulfuro durante el plegamiento oxidativo de las proteínas, generando ROS. Las ROS normalmente están bajo control debido al glutatión celular que mantiene la capacidad de la PDI para regenerarse y formar puentes disulfuro repetidamente. Sin embargo, las ROS producidas por el metabolismo del alcohol, reducen el nivel de glutatión y aumentan el glutatión oxidado, lo que rompe el estado redox del RE. Esta pérdida de homeostasis redox perturba el plegamiento oxidativo y hace que la PDI sea ineficaz, creando un ambiente oxidante que conduce a una mayor utilización del glutatión reducido (Ji, 2012) desencadenando estrés oxidativo, que está definido por un exceso de radicales libres y la disminución de antioxidantes para contrarrestarlos. El estrés oxidativo inducido por etanol juega un papel fundamental en las posibles interacciones entre el estrés del RE y el estrés mitocondrial, que puede estar mediado por Ca²⁺ o hierro intracelular. En un trabajo relevante, el etanol provocó rápidamente estrés oxidativo en células neuronales cultivadas y los antioxidantes bloquearon la potenciación alcohólica del estrés del RE y la muerte celular (Ke, et al. 2011). Se asume que la oxidación de proteínas tiende a aumentar el plegamiento incorrecto, la hidrofobicidad y alterar la tasa de degradación de las proteínas (Keller, et al. 2004), desencadenando así estrés en el RE.

Alteración en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular

El RE también tiene funciones importantes en el almacenamiento de Ca²⁺ intracelular, la señalización y la regulación de la homeostasis de Ca²⁺. La integridad de la homeostasis del Ca²⁺ en el lumen del RE es vital para el plegamiento correcto de las proteínas, una desregulación de Ca²⁺ podría resultar en un aumento de proteínas desplegadas o mal plegadas y por consiguiente estrés en el RE (Higo, et al. 2010; George, et al. 2017). El

etanol induce alteraciones en la composición de lípidos en el RE y afecta la proporción de fosfatidilcolina (PC) a fosfatidiletanolamina (PE), la alteración de la relación PC/PE altera la homeostasis del Ca^{2+} en el RE y provoca estrés (Ji,2012). Bajo condiciones de estrés, el RE libera anormalmente Ca^{2+} intracelular a través de los canales del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R), la pérdida de la función $\text{IP}_3\text{R1}$ reduce el potencial de la membrana mitocondrial para promover la apoptosis a través de las mitocondrias (Higo, et al. 2010).

La intoxicación aguda con etanol puede producir cambios marcados en la función cognitiva, incluidos estados en los que se interrumpe por completo la capacidad de aprender y recordar nueva información. Los *blackouts* se asocian con intoxicaciones graves y/o intoxicaciones en el contexto del uso de otras drogas depresoras (opiáceos, benzodiazepinas, anticolinérgicos), pueden tener efectos personales y sociales devastadores, particularmente entre adolescentes y adultos jóvenes, y pueden predecir más dificultades cognitivas con el consumo continuo de alcohol. También hay evidencia de que los efectos cerebrales adversos del consumo excesivo de alcohol, incluidos los defectos en la memoria a corto plazo, pueden persistir en el período de resaca de alcohol cuando los niveles de BAC han bajado a cero (Izumi & Zorumski, 2020). Aunque aún no se ha establecido el vínculo entre el estrés del RE y la neurodegeneración, esto proporciona una visión novedosa de los mecanismos potenciales del daño inducido por el etanol en las neuronas maduras.

8. Conclusión

A partir de estos resultados podemos concluir que la administración intraperitoneal de una dosis aguda de etanol de 3.0 g/Kg induce estrés del retículo endoplásmico en el hipocampo de la rata adulta, y una subsecuente activación de la UPR a través de las vías de señalización IRE1 y PERK. Estos cambios se presentan en dos fases en el transcurso del tratamiento, ya que observamos una respuesta inicial a partir de los 30 min y hasta las 4 horas, que podría explicarse como una respuesta de adaptación, para tratar de contener y reparar el incremento de las proteínas mal plegadas. Por otro lado, una segunda fase a la que llamamos de estrés prolongado se presenta entre las 8 y 24 horas después de la

administración de etanol, que podría estar relacionada con el aumento en los niveles de acetaldehído, producto de la degradación del etanol, el estrés oxidativo o la perturbación en la homeostasis del calcio intracelular, que inducen alteraciones en las proteínas en el lumen del RE. Esta segunda fase está asociada al pico máximo de expresión de la proteína CHOP, un factor pro-apoptótico que podría desencadenar vías de señalización que inducen apoptosis si el estrés permanece.

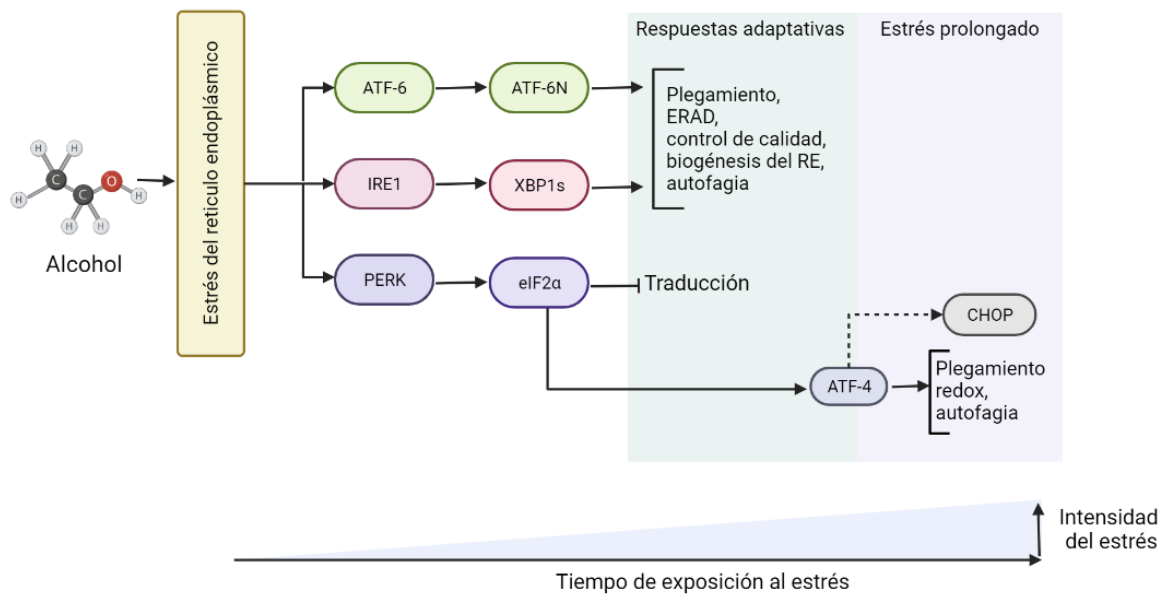


Fig. 10 Activación de proteínas relacionadas con la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) a lo largo del tiempo en células sometidas a estrés del retículo endoplásmico inducido por el alcohol. Las respuestas UPR iniciales atenúan la síntesis de proteínas en el RE al inhibir la traducción (que depende de la fosforilación de eIF2 α mediada por PERK), En una segunda ola de eventos, los factores de transcripción UPR que activan el fragmento citosólico del factor de transcripción 6 (ATF6N), XBP1s y ATF4 promueven muchas respuestas adaptativas que trabajan para restaurar la función del RE y mantener la supervivencia celular. El estrés del RE no mitigado induce la apoptosis para eliminar las células dañadas de forma irreversible (Modificado de Hetz, 2012).

9. Perspectivas

El etanol induce estrés en el RE, alterando el plegamiento las proteínas el lumen del RE, en futuros estudios sería de importancia evaluar la participación de los sistemas de degradación de proteínas, así como implementar terapias farmacológicas con medicamentos que se sabe ayudan a: 1) incrementar la capacidad del plegamiento como el valproato, BIX-01294 o arimoclomol, 2) estimular la degradación como la rapamicina y 3) inhibir la vía de señalización de la UPR como el salubrinal.

10. Referencias

- Allen-Worthington, K. H., Brice, A. K., Marx, J. O., & Hankenson, F. C. (2015). *Intraperitoneal Injection of Ethanol for the Euthanasia of Laboratory Mice (Mus musculus) and Rats (Rattus norvegicus)*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, 54(6), 769–778.
- Aragón, C., Miquel, M., Correa, M., & Sanchís-Segura, C. (2002). *Alcohol y metabolismo humano*. Adicciones, 14(5).
- Chen, G., Ma, C., Bower, K.A., Shi, X., Ke, Z. and Luo, J. (2008), *Ethanol promotes endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death: Involvement of oxidative stress*. J. Neurosci. Res., 86: 937-946. <https://doi.org/10.1002/jnr.21540>
- Chopra, K., & Tiwari, V. (2012). *Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities*. British journal of clinical pharmacology, 73(3), 348–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04111.x>
- Comisión Nacional contra las Adicciones, 2018. *15 de noviembre, Día Nacional contra el Uso Nocivo de Alcohol*. CONADIC. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/conadic/acciones-y-programas/15-de-noviembre-dia-nacional-contra-el-uso-nocivo-del-alcohol>
- Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., Vecchio, D., & Arezzini, B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. Genes & nutrition, 5(2), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0159-9>
- De Gortari, P., Mendez, M., Rodríguez-Keller, I., Pérez-Martínez, L., & Joseph-Bravo, P. (2000). *Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain*. Neurochemistry international, 37(5-6), 483-496.
- De Sahagún, B. (1981). *El México antiguo: selección y reordenación de la Historia general de las cosas de Nueva España de fray Bernardino de Sahagún y de los informantes indígenas*. Fundacion Biblioteca Ayacuch.
- Enesco M, Leblond P. *Increase in cell number as factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat*. J Embryol Exp Morph 1962; 10 (4): 530-62.
- Estruch, R. (2002). *Efectos del alcohol en la fisiología humana*. Adicciones, 14(5).

- Forn-Frías, C., & Sanchis-Segura, C. (2003). *Posible papel del acetaldehído en el daño cerebral derivado del consumo crónico de alcohol* [The possible role of acetaldehyde in the brain damage caused by the chronic consumption of alcohol]. *Revista de neurología*, 37(5), 485–493.
- Garg AD, Kaczmarek A, Krysko DV, et al, (2012) *ER Stress and Inflammation*. Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease. Ed. Patrizia Agostinis & Afshin Samali. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2012. 257–279.
- Gerlach, J., Sharma, S., Leister, K., Joshi, L. (2012). A Tight-Knit Group: Protein Glycosylation, Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. In: Agostinis, P., Afshin, S. (eds) *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*. Springer, Dordrecht. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-007-4351-9_2
- George, A. K., Behera, J., Kelly, K. E., Zhai, Y., & Tyagi, N. (2017). *Hydrogen sulfide, endoplasmic reticulum stress and alcohol mediated neurotoxicity*. *Brain research bulletin*, 130, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.002>
- Healy S.J., Verfaillie T., Jäger R., Agostinis P., Samali A. (2012) *Biology of the Endoplasmic Reticulum*. In: Agostinis P., Afshin S. (eds) *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*. Springer, Dordrecht
- Heaton MB, Paiva M and Marsiglio KS. 2011. *Ethanol influences on Bax translocation, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation are modulated by vitamin E and brain-derived neurotrophic factor*. *Alcohol Clin Exp Res*. 6:1-12.
- Hernández-Vázquez, F., Reyes-Guzmán, C., & Méndez, M. (2018). *Impact of a novel environment on alcohol-induced locomotor activity in Wistar rats*. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 71, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.02.001>
- Hetz C. (2012). *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T., & Mikoshiba, K. (2010). Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron*, 68(5), 865–878. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.010>

- Ikonomidou C, Kaindl AM. *Neuronal death and oxidative stress in the developing brain*. Antioxid Redox Signal. 2011 Apr 15;14(8):1535-50. doi: 10.1089/ars.2010.3581. Epub 2011 Feb 20. PMID: 20919934.
- Instituto Nacional de Salud Pública. 2020. *Alcoholismo: una relación tóxica*. [online] Available at: <<https://www.insp.mx/avisos/5128-dia-uso-nocivo-alcohol.html#sup5>> [Accessed 17 April 2020].
- Izquierdo, M. (2002). Intoxicación alcohólica aguda. DIRIGIR CORRESPONDENCIA A, 14(SUPL 1), 175.
- Izumi, Y., & Zorumski, C. F. (2020). *Inhibitors of cellular stress overcome acute effects of ethanol on hippocampal plasticity and learning*. Neurobiology of disease, 141, 104875.
- Ji C. (2012). *Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries*. Biochemistry research international, 2012, 216450. <https://doi.org/10.1155/2012/216450>
- Kahraman S, Zup LS, McCarthy MM, Fiskum G. (2008) *GABAergic mechanism of profol toxicity in immature neurons*. J Neurosurg Anesthesiol, 20:233-240.
- Ke, Z., Wang, X., Liu, Y., Fan, Z., Chen, G., Xu, M., Bower, K.A., Frank, J.A., Li, M., Fang, S., Shi, X. and Luo, J. (2011), *Ethanol Induces Endoplasmic Reticulum Stress in the Developing Brain*. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 35: 1574-1583. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01503.x>
- Keller, J. N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J., & Ding, Q. (2004). *Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain*. The international journal of biochemistry & cell biology, 36(12), 2376-2391.
- Kong, F. J., Ma, L. L., Guo, J. J., Xu, L. H., Li, Y., & Qu, S. (2018). *Endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in diabetes-induced neuronal apoptosis and cognitive decline in mice*. Clinical Science, 132(1), 111-125.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1988). *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins*. Nature, 332(6163), 462-464.
- Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Seminars in cell & developmental biology, 18(6), 716-731. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.09.003>

- Manzini, F. R., & Bender, C. L. (2007). *Daño cerebral provocado por alcohol: una revisión de estudios en humanos y en animales de experimentación*.
- Martínez, A., & Rábano, A. (2002). *Efectos del alcohol étílico sobre el sistema nervioso*. *Rev Esp Patol*, 35(1), 63-76.
- Máynez, P. (2014). *Fiestas y supersticiones de los antiguos mexicanos en la "Historia general" de Sahagún*. Fondo de Cultura Económica.
- Méndez, M., Barbosa-Luna, I. G., Pérez-Luna, J. M., Cupo, A., & Oikawa, J. (2010). *Effects of acute ethanol administration on methionine–enkephalin expression and release in regions of the rat brain*. *Neuropeptides*, 44(5), 413-420.
- Molina Piñeiro, V., Sánchez Medal, L., Román Celis, C., & Berruecos, L. (1983). *El alcoholismo en Mexico* (No. 362.292 A4).
- Muriá, J., Soberón Mora, A., Suárez y Farías, M., Lozano Armendares, T., Rueda, L., Vargas, L., Aguilar, P., Esquivel, G., Gispert, M., Gómez, A., Rodríguez, H., Suárez, C., Wachter, C., Medina Mora, M. and Tabo, P., 1998. *Beber de tierra generosa*. 1st ed. México, D.F: Fundación de Investigaciones Sociales.
- Myers, P. L., Isralowitz, R. E., & Watson, J. M. (2011). *Alcohol*. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- Nakamura, K., Iwahashi, K., Furukawa, A., Ameno, K., Kinoshita, H., Ijiri, I., Sekine, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Minabe, Y., & Mori, N. (2003). *Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics*. *Archives of toxicology*, 77(10), 591–593. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0465-8>
- Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S and Brinton RD. 2006. *Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function*. *BMC Neuroscience*, 7:1-14.
- Oyadomari, S., & Mori, M. (2004). *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. *Cell death and differentiation*, 11(4), 381–389. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.440137>
- Papanicolaou, J., & Fennessy, M. R. (1980). *The acute effect of ethanol on behaviour, body temperature, and brain histamine in mice*. *Psychopharmacology*, 72(1), 73-77.
- Paxinos, G. and Watson, C., 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1st ed. Sydney, Australia; New York, N.Y.: Academic Press.

- Phillips SC (1989) *Cytoprotective value of lysine, penicillamine, and pyridoxal phosphate against the neurotoxicity of acetaldehyde*. *Toxicol Appl Pharmacol* 98:553-560
- Poklis, A., & Mackell, M. A. (1982). *Evaluation of a modified alcohol dehydrogenase assay for the determination of ethanol in blood*. *Clinical chemistry*, 28(10), 2125–2127.
- Quinn DVM. *Comparing rats to human's age: How old is my rat in people years*. *Nutrition* 2005; 21 (6): 775-7.
- Román Celis, C., Molina Piñeiro, V., Sánchez Medal, L., & Barruecos, L. (1983). *El Alcoholismo en México*. Memorias del seminario de análisis.
- Rose, M. E., & Grant, J. E. (2010). *Alcohol-induced blackout. Phenomenology, biological basis, and gender differences*. *Journal of addiction medicine*, 4(2), 61–73. <https://doi.org/10.1097/ADM.0b013e3181e1299d>
- Scheper, W., & Hoozemans, J. J. (2009). *Endoplasmic reticulum protein quality control in neurodegenerative disease: the good, the bad and the therapy*. *Current medicinal chemistry*, 16(5), 615-626.
- Schlesinger-Piedrahita, A., Pescador-Vargas, B., & Roa-Culma, L. (2017). *Neurotoxicidad Alcohólica*. *Revista Med*, 25 (1), 87-101. <https://dx.doi.org/10.18359/rmed.2924>
- Sengupta P. *The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's*. *International Journal of Preventive Medicine* 2013, 4(6):624-30
- So, J. S. (2018). *Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses*. *Molecules and cells*, 41(8), 705–716. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>
- Sovolyova, N., Healy, S., Samali, A. & Logue, S. (2014). *Stressed to death – mechanisms of ER stress-induced cell death*. *Biological Chemistry*, 395(1), 1-13. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0174>
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). *Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system*. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>
- Strubelt, O., Siegers, C. P., & Breining, H. (1974). *Comparative study of the absorption, elimination and acute hepatotoxic action of ethanol in guinea pigs and rats*. *Archives of toxicology*, 32(2), 83–95. <https://doi.org/10.1007/BF00316229>
- Tena, R. (2011). *Mitos e historias de los antiguos nahuas*. México, D.F.: CONACULTA.

- Topiwala, A., Ebmeier, K. P., Maullin-Sapey, T., & Nichols, T. E. (2021). *No safe level of alcohol consumption for brain health: observational cohort study of 25,378 UK Biobank participants*. medRxiv.
- Tunstall, B. J., Vendruscolo, L. F., & Allen–Worthington, K. (2020). *Rat models of alcohol use disorder*. In *The Laboratory Rat* (pp. 967-986). Academic Press.
- Ubach, M. M. (2013). *Participación de los sistemas endógenos de péptidos opioides en los mecanismos de reforzamiento y dependencia al alcohol*. *Salud mental* 36:211-218.
- Upadhyya, S. C., & Ravindranath, V. (2002). *Detection and localization of protein-acetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment*. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 26(6), 856–863.
- Valdez, J. (2005). *El consumo de alcohol en estudiantes del Distrito Federal y su relación con la autoestima y la percepción de riesgo*. Universidad Autonoma De Mexico.
- Valencia Martín, J. L., Galán, I., Segura García, L., Camarelles Guillem, F., Suárez Cardona, M., & Brime Beteta, B. (2020). *Episodios de consumo intensivo de alcohol “Binge drinking”: retos en su definición e impacto en salud*.
- Villalobos, J. (2005). *Mitos, leyendas e historia del tequila*. 2ª parte. Xipe Totek, 14(2).
- Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., Addolorato, G., & Alcoholism Treatment Study Group (2008). Acute alcohol intoxication. *European journal of internal medicine*, 19(8), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.06.033>
- World Health Organization. (2019). *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2656-2664.
- Yang, F., & Luo, J. (2015). *Endoplasmic Reticulum Stress and Ethanol Neurotoxicity*. *Biomolecules*, 5(4), 2538–2553. <https://doi.org/10.3390/biom5042538>
- Zakhari, S. (2006). *Overview: how is alcohol metabolized by the body?* *Alcohol Research*, 29(4), 245.
- Zhang, X., Xu, L., He, D., & Ling, S. (2013). *Endoplasmic reticulum stress-mediated hippocampal neuron apoptosis involved in diabetic cognitive impairment*. *BioMed research international*, 2013.

Zimatkin, SM. & Deitrich, RA. (1997). *Ethanol metabolism in the brain. Addiction Biology*, 2 (4), 387-400.

Anexo A

Anticuerpos. Todos los anticuerpos enlistados fueron obtenidos de Abcam

Anticuerpo primario	Incubación	Anticuerpo secundario	(kDa)
Anti- DDIT3 antibody [9C8] (ab11419)	1:1000	Goat Anti- Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719)	31
Anti- ATF-4 antibody - C-terminal (ab1371)	1:1000	Donkey Anti- Goat IgG H&L (HRP) (ab205723)	38-40
Anti- GRP78 BiP antibody [EPR4040(2)] (ab108613)	1:1000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	78
Anti- EIF2S1 antibody [EIF2a] (ab5369)	1:1500	Goat Anti- Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719)	36
Anti- IRE1 (phospho S724) antibody (ab48187)	1:1000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	110
Anti- ATF6 antibody (ab203119)	1:2000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	75
Anti- PERK antibody (ab229912)	1:2000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	125
Anti- XBP1 antibody (ab37152)	1:1000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	29 y 40
Anti- beta Actin antibody - Loading Control (ab8226)	1:5000	Goat Anti- Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719)	42
Recombinant Anti- EIF2S1 (phospho S51) antibody [E90] (ab32157)	1:1000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	36
Anti- IRE1 antibody (ab37073)	1:1000	Goat Anti- Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)	110

Anexo B

Abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATF4	Factor de activación de transcripción 4
ATF6	Factor de activación de transcripción 6
BAC	Concentración de alcohol en sangre
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
eIF2 α	Factor de iniciación eucariótico-2 α
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
GRP78	Proteína de unión a inmunoglobulina
i.p.	Intraperitoneal
IP3R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
IRE 1	Enzima 1 que requiere inositol
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
PC	fosfatidilcolina
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
p-eIF2 α	Fosforilación del factor de iniciación eucariótico-2 α
PERK	Proteína cinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) parecida a la cinasa del factor de iniciación eucariótico 2 α
p-IRE1	Fosforilación de la enzima 1 que requiere inositol
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplásmico
RIPA	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
UPR	Respuesta a Proteínas Desplegadas
XBP1s	Procesamiento de la proteína de unión a la caja X

