



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**LA PROTEÍNA ATG16L1 MODULA LA RESPUESTA
INMUNE DURANTE EL PROCESO DE INFLAMACIÓN
METABÓLICA INDUCIDO POR CONSUMO DE ALCOHOL**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN ENFERMERÍA**

PRESENTA:

ZAIRA DENISE ORTIZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2024



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente al Dr. José Luis Reyes Hernández y a la Biol. Marisol Ibet González González, primeramente, por su apoyo, paciencia y enseñanza durante mi instancia de servicio social en el laboratorio y también por su asesoramiento para la culminación de mi examen profesional.

De igual modo quiero agradecer a todos los que conforman el laboratorio 18, por su compañerismo, su apoyo, por lo que pude aprender de ustedes, y por aquellos momentos que pudimos compartir. Un agradecimiento especial a Areli, por ser parte de mi integración al laboratorio y por enseñarme algunas de las técnicas que utilice en este trabajo.

Agradezco también al Biol. Tomas Ernesto Villamar y a la MVZ María Leticia Flores, por la proporción, mantenimiento y cuidado de los animales experimentales que fueron indispensables para la realización de este proyecto.

Agradezco a mis padres Emma y Juan que fueron los responsables de que yo pudiera estar aquí. Gracias por su apoyo en todo este camino. Los amo.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-UNAM PAPIIT Proyecto IN224520

La tesista recibió el apoyo del programa “Becas para titulación egresados de alto rendimiento”

Los avances de este proyecto se presentaron en el Coloquio de Investigación de la FES Iztacala agosto 2023

DEDICATORIA

Concluir este proyecto fue toda una travesía, donde la constante fue mi familia por ello le dedico, principalmente, el resultado de este trabajo a ellos. A ti mamá porque fuiste y eres mi principal sustento desde el inicio de mi trayectoria escolar y la culminación de esta. Por ser parte de mis mejores momentos y contenerme en los malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades y aceptar las derrotas, que no todo es blanco y negro y que los grises también son parte del aprendizaje. A ti papá por tu esfuerzo para que yo pudiera llegar hasta aquí, fuiste el papá estricto, pero también el amoroso, mi cómplice, mi conejillo de indias, mi todólogo cuando lo necesitaba. La distancia no fue nada porque me brindaste todo para ser la persona que soy ahora. A ti, mi pequeña Elaine, no esperaba convertirme en hermana mayor, pero ha sido una grata sorpresa. Tus risas, tus travesuras, tus besos y abrazos han sido un pequeño abrazo al alma. Eres un torbellino que quiero ver crecer. ¡Los amos!

Para mis tíos Flor, Chenchó y Alberto que me han motivado para alcanzar todas mis metas. Siempre estaré agradecida por su apoyo incondicional.

Para mi primo Manuel, que ha sido mi mayor inspiración y mi mejor maestro. Te quiero.

También le dedico esto a mis amigas:

A las que me acompañaron durante la carrera Gabi, Itzel y Aylin tomamos caminos distintos, pero siempre tendré un bello recuerdo de ustedes.

A las que conocí, por un acto de casualidad Yana, Karla y Moni, gracias por hacerme su amiga y hacer de mi servicio social un momento divertido.

A mi mejor amiga, que acepto mis malos gustos en música, (según sus palabras) y me enseñó las cosas difíciles de ser un adulto. Jemina gracias por sostenerme durante este trayecto.

“Los sueños se hacen realidad para quienes realmente los desean”

— SKZ

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Alcohol.....	8
2.1.1 Metabolismo del Alcohol	9
2.2 Cambios en el Sistema Inmune Causados por la ingesta de Alcohol.....	10
2.3 Respuesta Inflamatoria y Alcohol	12
2.4 Papel de la Proteína ATG16L1.....	13
2.4.1 Autofagia	13
2.4.2 ATG16L1	14
2.4.3 Respuesta Inflamatoria y ATG16L1	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPOTÉISIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo General.....	17
5.2 Objetivos Particulares.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Ratones.....	18
6.2 Modelo del Consumo de Alcohol	18
6.3 Obtención de Suero Sanguíneo.....	19
6.4 Hematocrito	19
6.5 Histología	19
6.6 Cultivo de Órganos Linfoides Secundarios	20
6.7 Ensayo Inmuno-Absorbente por Anticuerpos (ELISA)	21
6.8 Citometría de Flujo	22

7.	RESULTADOS	23
7.1	Genotipo	23
7.2	Peso	24
7.3	Glucosa	25
7.4	Hematocrito.....	26
7.5	Análisis Macroscópico del Colón.....	26
7.6	Análisis del Hígado.....	28
7.7	Análisis Histológico del Hígado.....	30
7.8	Análisis histológico de Tejido Adiposo	32
7.9	Nivel de Interleucinas en Suero	33
7.9.1	Interleucina 6 (IL-6)	33
7.9.2	Factor de Necrosis Tumoral (TNF α).....	34
7.9.3	Interleucina 1 beta (IL-1 β)	35
7.10	Niveles de Interleucinas en Bazo y Ganglio Mesentérico	36
7.10.1	Interleucina 6 (IL-6)	36
7.10.2	Factor de Necrosis Tumoral (TNF α).....	37
7.10.3	Interleucina 1 beta (IL-1 β)	38
7.11	Citometría de Flujo.....	38
8.	DISCUSIÓN	41
9.	CONCLUSIONES	45
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
11.	BIBLIOGRAFÍA	48

1. RESUMEN

Las enfermedades metabólicas más comunes se subdividen en aquellas asociadas con el consumo de alcohol y las que surgen en individuos con síndrome metabólico. El consumo crónico de alcohol genera alteraciones en el sistema inmune de manera global, así como en órganos de los cuales destaca el hígado. Por lo tanto, es importante entender cómo se regula la respuesta inflamatoria en respuesta a la ingesta de alcohol e identificar los posibles candidatos que desempeñan un papel relevante como modulador de dicha respuesta. Las proteínas asociadas a autofagia (ATGs) han sido recientemente identificadas como importantes participantes en la respuesta inmune. Estudiamos el papel de la proteína ATG16L1 durante el proceso de inflamación resultante por el consumo de alcohol. Comparamos los cambios entre ratones silvestres (WT) y ratones hipomórficos para ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) de los siguientes parámetros: peso corporal, niveles de citocinas circulantes y en órganos linfoides secundarios, distribución de células en cavidad peritoneal, así como cambios histológicos en hígado y tejido adiposo. Los ratones de ambos grupos experimentales presentaron cambios en el peso corporal durante las 4 semanas de consumo de alcohol, mientras que durante la fase de recuperación la ganancia del peso se estabilizó en ambos grupos. En cuanto a los niveles de glucosa, los ratones ATG16L1^{HM} presentaron niveles más bajos durante las primeras dos semanas, comparado con los ratones WT. Interesantemente, los ratones ATG16L1^{HM} presentaron niveles más altos de hematocrito, aunque con una tendencia a disminuir conforme avanzó el tiempo del estudio. Observamos un mayor número de macrófagos inflamatorios en la cavidad peritoneal de los ratones ATG16L1^{HM} en comparación con los ratones WT. Finalmente, se observó un desarreglo en el parénquima de las muestras de hígado de los ratones ATG16L1^{HM}, así como adipocitos de mayor tamaño. En conclusión, estos datos sugieren que la proteína ATG16L1 colabora al atenuar el daño ocasionado por el consumo de alcohol

Palabras clave: ATG16L1, inflamación, enfermedad hepática alcohólica

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Alcohol

El alcohol, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es definido como “sustancia psicoactiva con propiedades causantes de dependencia” (OMS, 2018). Químicamente hablando, el alcohol es, todos los componentes orgánicos conformados por un grupo hidroxilo (OH⁻). De acuerdo con lo anterior se pueden diferenciar varios tipos de alcoholes: alcohol etílico, metanol, butanol, alcohol isopropílico y alcohol absoluto. Siendo todos estos tóxicos y el único que es apto para el consumo humano es el alcohol etílico (etanol), que es el empleado en las bebidas alcohólicas. (Maura, 2022). El alcohol etílico es un producto obtenido de la fermentación anaeróbica de los hidratos de carbono, se caracteriza por ser un líquido claro, incoloro, inflamable, de olor característico y muy hidrosoluble. Además, el etanol es un compuesto con un alto valor energético aportando 7.1 kcal por gramo. (Lieber, 2004). El consumo excesivo de alcohol puede provocar digestión deficiente, mala absorción de nutrientes, deficiencia de vitaminas y oligoelementos y, por lo tanto, pérdida de peso y desnutrición. (Maccioni, y otros, 2020).

Existen dos tipos de desnutrición por consumo de alcohol. En primer lugar, la desnutrición primaria, que es el resultado de que el etanol reemplace a otros nutrientes en la dieta, provocando una reducción de ingesta de otros alimentos. Como el alcohol no posee nutrientes esenciales o indispensables se considera una fuente de energía de “calorías vacías”. Por otro lado, la desnutrición secundaria se produce cuando la dieta presenta los nutrientes adecuados pero una malabsorción derivada de complicaciones intestinales, alterando así el metabolismo de los nutrientes. (Lieber, 2004).

El daño que provoque el consumo de alcohol va a depender del llamado “patrón de consumo”, es decir, de la cantidad (a mayor cantidad, mayor daño) y de la intensidad (la misma cantidad concentrada en menos tiempo es más dañina) y esto se debe principalmente por la naturaleza de la metabolización del alcohol.

2.1.1 Metabolismo del Alcohol

Como se explicó con anterioridad, el alcohol es una molécula simple de dos carbonos que cruza las membranas biológicas con facilidad. Tras su consumo el alcohol se absorbe rápidamente en pequeñas cantidades en la boca y el esófago, en cantidades moderadas en el estómago y el intestino grueso. Se produce su paso desde el estómago e intestino hacia el torrente sanguíneo mediante un proceso de difusión simple, y a la circulación portal para llegar al hígado, donde se llevará a cabo la mayor parte del metabolismo mediante los hepatocitos, así como en la parte proximal del intestino delgado, alcanzando la concentración sanguínea máxima alrededor de 1 hora; solo si el consumo es excesivo se activa la vía microsómica, lo que puede generar especies reactivas de oxígeno (ERO). (Martinez-Castillo, y otros, 2023).

Es en el hígado en donde el alcohol se transforma en acetaldehído (AA). La enzima alcohol deshidrogenasa citosólica emplea nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como cofactor para producir AA, que luego se convierte en acetato por el aldehído deshidrogenasa. La toxicidad del alcohol está dada principalmente por el producto metabólico del alcohol, el acetaldehído, que además puede ser producido por varias bacterias del colon, lo que conduce al daño de las células de la mucosa colónica. El AA al nivel del colón puede provocar alteración de las proteínas de las uniones estrechas, promoviendo disfunción de la barrera intestinal. Además, el consumo de alcohol puede afectar la motilidad intestinal, el pH de la luz intestinal y el flujo de los ácidos biliares. (Dunn & Shah, 2016).

La eliminación del alcohol ocurre por diversas rutas metabólicas menores (esterificación de ácidos grasos, glucoronoconjugación, etc.) o por otras vías no oxidativas como la orina, mediante la respiración, el sudor, que es generalmente inferior al 6-10%, aún en condiciones de sudoración, poliuria o aceleración del ritmo respiratorio.

En la Fig.1 se exponen las rutas principales de la oxidación del etanol. Como se observa en la misma, tanto la Alcohol Deshidrogenasa (ADH) como la Aldehído

Deshidrogenasa (ALDH) transfieren el hidrógeno a un aceptor Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD), que se convierte en la forma reducida (NADH).

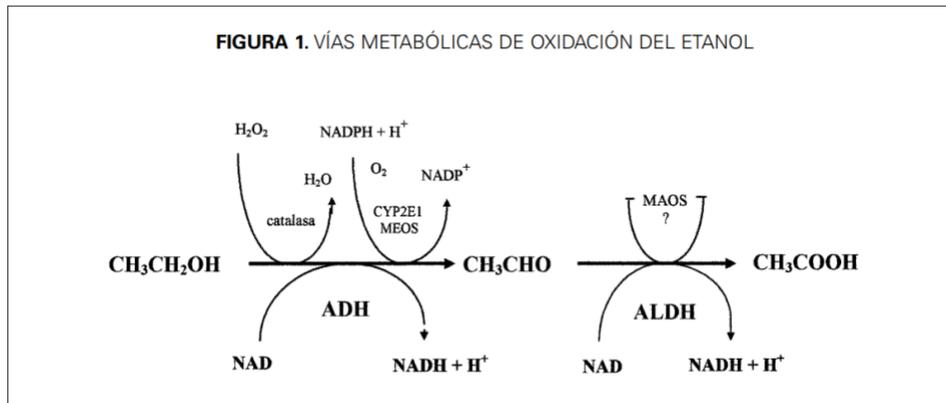


Fig. 1 Imagen tomada de Fortea, S; Cuevas, J & Sanchis M^a A. *Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo.* 1999

2.2 Cambios en el Sistema Inmune Causados por la ingesta de Alcohol.

El sistema inmune es crucial para la protección y defensa del cuerpo humano contra agentes patógenos. Su función principal es reconocer y combatir microorganismos invasores, manteniendo así el equilibrio en el organismo (homeostasis). (García & Sibila, 2013). El consumo de alcohol puede tener un impacto negativo en la inmunidad, comprometiendo su funcionamiento, por ejemplo, puede afectar la producción de células inmunes, en la médula ósea alterando su maduración y función. Además, altera la permeabilidad de la barrera intestinal, aumentando la permeabilidad, permitiendo la translocación de productos tóxicos y bacterias, desencadenando una respuesta inflamatoria. (NIAAA, 2024).

Otro punto es que, si bien la eficiente metabolización asegura que los metabolitos tóxicos del alcohol, principalmente AA (una hepatotoxina y una neurotoxina), y algunos otros derivados inestables de los metabolitos, se vuelvan inactivos o se eliminen del sistema mucho antes de que causen daño celular el alcohol puede trabajar como un depresor del sistema nervioso central (SNC) ya que aumenta la

inhibición de la transmisión nerviosa cerebral y disminuye su excitación. En un cerebro normal, existe un balance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria, pero el uso de alcohol interrumpe este equilibrio. Incluso un consumo agudo de alcohol es capaz de afectar dicho estado de equilibrio al promover la neurotransmisión inhibitoria y atenuar la excitatoria. Se ha sugerido que el cerebro compensa de este modo los efectos depresores del alcohol después de un consumo crónico de alcohol para mantener la homeostasis.

Por otro lado, como ya se ha mencionado el consumo de alcohol se asocia con una respuesta inmune anormal. Hasta ahora, el hallazgo más importante ha sido un estado de inmunodepresión, lo que conlleva un mayor riesgo de infecciones graves. No obstante, recientemente se ha constatado que el consumo de etanol se acompaña de cambios en la síntesis y en las concentraciones circulantes de determinadas citocinas y de una activación de subpoblaciones linfocitarias citotóxicas que podrían contribuir a la aparición de la enfermedad hepática por alcohol. En el desarrollo de la lesión hepatocelular es relevante el papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) como inductor de apoptosis y necrosis; esta citocina, junto con la interleucina (IL)- 1, IL-6 y las quimiocinas que promueven la infiltración de diversas células inmunes, propicia la inflamación del parénquima hepático. Algunos trabajos clínicos y experimentales han demostrado que el etanol altera el sistema inmunológico. Aunque los mecanismos moleculares se desconocen, se ha demostrado que sus acciones sobre el sistema inmunológico son complejas y dependen de la dosis, el tiempo de exposición (agudo o crónico), tipo celular y presencia o ausencia de estímulos adicionales, como patógenos.

2.3 Respuesta Inflamatoria y Alcohol

La defensa natural del organismo se basa en tres elementos: la presencia de barreras externas, sistemas inespecíficos (inmunidad innata), y respuestas antígeno-específicas (inmunidad adaptativa). La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida, compuesta por elementos humorales (complemento, citocinas, proteínas de fase aguda, así como proteínas involucradas en el proceso de coagulación y cascada fibrinolítica) y componentes celulares (células de origen mieloide y linfocitos sin receptores clonales). Esta respuesta se inicia por la activación conjunta de fagocitos (neutrófilos y macrófagos) y células epiteliales. Durante la respuesta inflamatoria (RI) se producen tres eventos importantes:

1. Aumenta el suministro de sangre a la zona afectada.
2. Se incrementa la permeabilidad capilar.
3. Diferentes células del sistema inmune ingresan desde los vasos sanguíneos al sitio de la infección/ de la lesión (transmigración).

Por tanto, el proceso inflamatorio es una pieza clave en la respuesta inmune, promoviendo la movilización de las células inmunitarias al sitio de la infección o del daño con el fin de eliminar el factor desencadenante, restablece el equilibrio (homeostasis) del organismo y repara el tejido dañado por esta razón se afirma que la inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, y de no existir este proceso, las infecciones se propagarían de manera incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente. Sin embargo, en ciertas situaciones, como en reacciones alérgicas y enfermedades crónicas, el proceso inflamatorio constituye el mecanismo patogénico básico.

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve; sus características fundamentales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos). La inflamación crónica tiene una duración

mayor y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular. (León M., y otros, 2015).

Ahora bien, el consumo excesivo de alcohol puede provocar inflamación en los distintos sitios en los que es absorbido, por ejemplo, el alcohol irrita directamente el revestimiento del estómago y aumenta la liberación de ácido generando inflamación en la pared que recubre al estómago (gastritis), así mismo produce úlceras estomacales y esofágicas. Otro órgano afectado es el páncreas, el alcohol hace que produzca sustancias tóxicas que eventualmente pueden conducir a la pancreatitis, (inflamación de los vasos sanguíneos en el páncreas que impide la digestión adecuada) tanto aguda como crónica. El incremento exacerbado en la producción de AA en el hígado ocasiona una inflamación a la que se le conoce como hepatitis alcohólica y si a este ambiente se le suma el aumento de grasa en las células del hígado se establece una esteatosis hepática. Además, con el tiempo, ocasiona la producción excesiva de colágena (fibrosis) y la destrucción irreversible del tejido hepático (falla hepática).

2.4 Papel de la Proteína ATG16L1

2.4.1 Autofagia

La autofagia es un proceso celular catabólico en todas las células eucariotas que es responsable de la degradación masiva de proteínas y orgánulos, particularmente cuando las células se encuentran en condiciones de privación de nutrientes. Uno de los varios tipos de autofagia, la macro autofagia (a la que simplemente se hace referencia como autofagia), es el tipo principal que se utiliza para muchos aspectos de los eventos celulares, incluida la defensa contra la intrusión bacteriana, la presentación de antígenos y la muerte celular programada, y la disfunción de la autofagia está asociada con una variedad de enfermedades humanas. (Ishibashi K., y otros, 2011).

Los estudios genéticos de la levadura han revelado un conjunto de genes (llamados autophagy related genes ATG) que están involucrados en la autofagia, y se ha demostrado que al menos 17 genes ATG están involucrados en la formación del autofagosoma. (Ishibashi K., y otros, 2011). Tres de ellos ATG5, ATG12 y ATG16L1, forman un complejo esencial para que se produzca la elongación de los fagosomas, porque se ha descubierto que la eliminación de ATG5 o ATG16L1 en ratones elimina por completo la formación de autofagosoma. (Ishibashi K., y otros, 2011). Esto ha dado pie al estudio, de la relevancia, de la proteína ATG16L1 en procesos inflamatorios, ya que se ha identificado a ATG16L1 como un gen candidato responsable de la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn humana, que es una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal. (Hampe J, 2007).

2.4.2 ATG16L1

Todas las especies eucariotas albergan un gen para ATG16 y la proteína codificada muestra una gran similitud estructural y de secuencia entre especies, atg16 fue identificado por primera vez en levadura en 1999 por el grupo de Ohsumi. (Qihong X y otros, 2018). Mientras que la proteína ATG16 de ratón fue identificada en 2003 por el mismo grupo. La proteína ATG16 de ratón y humano muestra homología con la proteína atg16 de levadura en su región N-terminal, pero se diferencia en su dominio C-terminal. Por lo tanto, denominaron a la proteína ATG16 de mamíferos (proteína similar a atg16) o ATG16-like 1(ATG16L1). Tanto la proteína de ratón como la de humano está altamente conservada y comparten un 94% de identidad de secuencia.

En general ATG16 se compone de tres regiones distintas: el extremo N-terminal que contiene el AFIM (motivo de interacción con ATG5), seguida por el CCD y siete repeticiones WD40 en la mitad del extremo C-terminal. (Figura 2). Cada dominio tiene distintas proteínas que se unen y regulan funciones específicas. En particular,

el dominio WD40, que se pliega en una estructura de hélice β , se conoce como un centro para las interacciones proteína-proteína. (Qihong X y otros, 2018)

Figura 2. Estructura de la proteína ATG16L1 de ratón

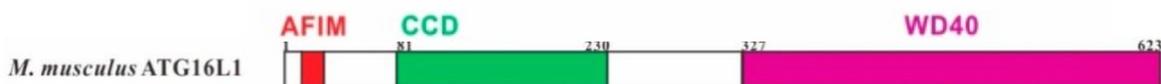


Fig. 2 Imagen tomada de Qihongxiong; Wenjin Li & otros. El papel de ATG16 en la autofagia y el sistema del proteosoma ubiquitina. 2018

2.4.3 Respuesta Inflamatoria y ATG16L1

El papel de la proteína ATG16L1 en la modulación de la respuesta inmune durante el proceso de inflamación metabólica inducido por el consumo de alcohol aún no está completamente claro y es objeto de investigación en curso.

El consumo crónico de alcohol puede provocar inflamación hepática, que puede conducir a la enfermedad hepática alcohólica (EHA) y otros trastornos relacionados con el alcohol. Se sabe que la inflamación hepática inducida por el alcohol está mediada por la activación del sistema inmune y la producción de citocinas proinflamatorias. La autofagia es un proceso que puede ayudar a reducir la inflamación y prevenir el daño celular al eliminar los componentes celulares dañados o no deseados, considerándose de este modo, una respuesta celular importante para mantener la homeostasis y prevenir la inflamación, sin embargo, algunos estudios sugieren que la disfunción de la autofagia o la regulación defectuosa de la autofagia pueden desencadenar o contribuir a la inflamación.

Por ejemplo, se ha sugerido que la disminución de la actividad de la autofagia puede aumentar la producción de citocinas inflamatorias y la activación de células

inflamatorias. Además, la acumulación de proteínas agregadas o dañadas en el interior de las células debido a una disfunción de la autofagia puede desencadenar una respuesta inflamatoria debido a la activación de las vías de señalización de estrés celular y la liberación de moléculas inflamatorias.

Así mismo, algunos estudios han sugerido que ciertos tipos de células inmunitarias, como los macrófagos, pueden utilizar la autofagia como un mecanismo para producir y secretar citocinas inflamatorias en respuesta a estímulos externos.

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo crónico de alcohol genera alteraciones en el sistema inmune de manera global, así como en órganos de los cuales destaca el hígado. Por lo tanto, es importante entender cómo se regula la respuesta inflamatoria ante a la ingesta de alcohol e identificar los posibles candidatos que desempeñan un papel relevante como modulador de dicha respuesta.

4. HIPOTÉISIS

Los ratones ATG16L1^{HM} presentarán un curso más severo en el desarrollo de la inmunopatología asociada al consumo de alcohol, comparado con ratones WT, ya que esta proteína regula negativamente la respuesta inflamatoria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Determinar que la proteína ATG16L1 modula la respuesta inmune durante el proceso de inflamación metabólica inducido por consumo de alcohol.

5.2 Objetivos Particulares

- Registrar los cambios en peso corporal en ratones WT y ratones ATG16L1^{HM} durante 4 semanas de consumo de bajos niveles de alcohol y en la fase de recuperación (2 semanas adicionales de agua sin alcohol).
- Observar cambios macroscópicos en órganos como hígado, tejido adiposo y bazo, de los animales en las diferentes fases del modelo experimental.
- Obtener muestras de hígado y de tejido adiposo retroperitoneal para realizar cortes histológicos y comparar cambios histopatológicos entre ratones WT y ratones ATG16L1^{HM}.

- Comparar los niveles de glucosa, hematocrito y citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) en muestras sanguíneas de ratones WT con ratones ATG16L1^{HM}.
- Realizar cultivos primarios de células obtenidas de órganos linfoides secundarios (bazo y nódulos mesentéricos) y cuantificar citocinas en los sobrenadantes de dichos cultivos.
- Llevar a cabo análisis de citometría de flujo de células obtenidas por lavado peritoneal de los grupos experimentales y determinar los porcentajes de macrófagos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Se utilizaron ratones macho de 7 a 8 semanas de edad, con fondo genético C57BL/6J, 6 ratones silvestres (WT) y 6 ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) para cada tiempo indicado. Estas colonias de animales de experimentación se reproducen y mantienen en el bioterio de la FES Iztacala y se utilizan en los protocolos de investigación bajo el cumplimiento de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se mantuvieron en cajas grupales, donde se les abasteció de alimento para roedores sin restricciones, así como agua, de acuerdo con el modelo experimental.

6.2 Modelo del Consumo de Alcohol

Se diluyó alcohol absoluto en agua al 2% y se aforaron los bebederos a 200 ml y estos bebederos se colocaron en las cajas de los dos grupos de experimentación (WT y ATG16L1^{HM}) el lunes. Se registró el consumo de esta preparación el viernes de cada semana y nuevamente el lunes se colocaban bebederos con la solución recién preparada. Se realizó esta estrategia por 4 semanas y posteriormente, se les dio acceso a los ratones a agua sin alcohol por 2 semanas adicionales. Por esta razón, se

llevó a cabo el sacrificio de los animales a las 4 y 6 semanas posteriores al inicio del protocolo de experimentación.

6.3 Obtención de Suero Sanguíneo

Previo al inicio del protocolo de consumo de alcohol, así como a las 4 y 6 semanas los ratones experimentales se mantuvieron por 3 minutos en una cámara de calor, para aumentar la frecuencia cardiaca e inducir vasodilatación. Después, se utilizó un bisturí para hacer una incisión en la vena caudal y recolectar sangre venosa. Estas muestras sanguíneas fueron centrifugadas inmediatamente a 5000 rpm por 10 minutos y el suero sanguíneo se transfirió a tubos eppendorf nuevos rotulados. Estas muestras se congelaron a -80C hasta su uso en las pruebas de ELISA.

6.4 Hematocrito

Se obtuvieron muestras de suero, como se describió previamente, de la cola de cada uno de los ratones, cada muestra se le agregó 40 µl del anticoagulante EDTA (0.5 mM). La sangre se colocó en un capilar hasta aproximadamente un 80% de la capacidad de este. Se sellaron ambas esquinas del capilar y la muestra se dejó sedimentar por 24hrs. Se obtuvo el porcentaje del contenido del paquete celular al dividir este entre el total de la muestra y multiplicarlo por 100.

6.5 Histología

Las muestras de hígado y tejido adiposo se fijaron por 24 hrs en formaldehído al 4%, posterior a ese tiempo se realizó el proceso de deshidratación. Primero se lavaron las muestras por 30 min con agua corriente. Posteriormente las muestras se mantuvieron en concentraciones crecientes de alcoholes de la siguiente manera: alcohol 50% por 30 min, alcohol 60% por 20 min, alcohol 70% por 20 min, alcohol 75% por 20 min, alcohol 80% por 20 min, alcohol 85% por 20 min, alcohol 90% por 20 min, Alcohol

100% I por 20 min, alcohol 100% II por 20 min, alcohol amílico I por 20 min y alcohol amílico II por 20 min. Posteriormente las muestras se colocaron en parafina I por 24hrs a 54°C, posterior a ese tiempo se pasaron a parafina II.

Se realizó la inclusión de las muestras en cubos de parafina. Se realizaron cortes transversales de las muestras, con un grosor de 5 µm en microtomo. Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) con el siguiente protocolo: xilol I por 15 min, xilol II por 10min, alcohol 100% 10 lavadas, alcohol 90% 10 lavadas, alcohol 80% 10 lavadas, alcohol 70% 10 lavadas, agua 10 lavadas, hematoxilina 15 por min, agua 10 lavadas, alcohol acido 1 lavada, agua 10 lavadas, carbonato de litio 1 lavada, agua 1 lavada, alcohol 100% 10 lavadas, eosina por 7 min, alcohol 70% 10 lavadas, alcohol 80% 10 lavadas, alcohol 90% 10 lavadas, alcohol 100% 10 lavadas, xilol III 10 lavadas y xilol IV. Las muestras fueron montadas con entellan y se les colocó el cubreobjetos.

6.6 Cultivo de Órganos Linfoides Secundarios

En los tiempos indicados, se obtuvieron los nódulos mesentéricos y bazos de cada grupo de ratones. Se maceraron dichos órganos en un separador celular de nylon de 70 µm en 5ml de medio RPMI1640 (Gibco, USA) suplementado con SFB (10%) y antibiótico (streptomicina). La suspensión celular obtenida se transfirió a tubos cónicos de 15 ml. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio nuevo, 1 ml para las células de los nódulos y en 5 ml para las células de bazo. Se tomó una muestra de 10 µl de cada muestra para conteo celular en hemocitometro y se contaron únicamente las células vivas por medio de exclusión con azul tripano.

Se realizaron operaciones para obtener el número de células y la cantidad de medio necesario para el cultivo celular y se sembraron 3 x10⁶/ml (ganglio) y 5x10⁶/ml (bazo), donde se tenían grupos sin estímulo y grupos a los que se les agrego el mitógeno concavalina A (conA, Sigma-Aldrich). Se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 48 horas. Después de ese tiempo, los sobrenadantes se pasaron a tubos eppendorf, se

centrifugaron para obtener 900 μ l de sobrenadante, congelar a -80°C posteriormente utilizados para ELISA.

6.7 Ensayo Inmuno-Absorbente por Anticuerpos (ELISA)

Se diluyo el anticuerpo de captura en PBS (1x estéril) a una concentración 1 $\mu\text{g/ml}$, se agregó 100 μ l a cada pozo de la placa, se cubrió la placa y dejo a 4°C toda la noche. Se decantó y la placa se lavó 3 veces con una solución detergente de PBS-Tween (0.05%) y se secó.

Para bloquear el pegado inespecífico, se colocaron 300 μ l en cada pozo de solución de bloqueo (PBS-BSA 1%) y se incubo 1 hora a 37°C . Después de decantar y lavar la placa 3 veces, se colocaron 50 μ l de sobrenadante correspondientes a las muestras de ganglio y bazo y 25 μ l de suero sanguíneo más 25 μ l de PBS-BSA en los pozos correspondientes.

Para la curva se agregó 200 μ l de la respectiva citocina recombinante (pozo 1A) del pozo 2A- 12A se agregó 100 μ l PBS-BSA y se diluyó 1:2 para obtener la curva. Se taparon las placas y dejaron toda la noche a 4°C .

La placa se lavó 3 veces, se secó y se agregó a cada pozo 100 μ l de una solución que contenía PBS-BSA y el anticuerpo de detección (a una concentración 0.5 $\mu\text{g/ml}$). Se dejó 1 hora a 37°C , se volvieron a lavar 3 veces y secar. Se agregó a cada pozo 100 μ l de PBS/BSA y enzima HRP, se tapó la placa y se dejó a temperatura ambiente por 45 minutos. Se colocaron en cada pozo 100 μ l de dilución de peróxido de hidrogeno y ABTS. Para finalizar se leyó la placa en espectrofotómetro a 450 nm y los valores se presentan como pg/ml.

6.8 Citometría de Flujo

Se analizaron las células reclutadas en la cavidad peritoneal. Se llevo a cabo un lavado peritoneal a las 4 y 6 semanas de iniciado el protocolo de investigación. Se inyectaron 8 ml de solución salina estéril y se recuperaron las células totales del peritoneo. Una vez ajustado el número de células a 1×10^6 , se colocó 300 μ l de Buffer de FACS (PBS 1x con 5% SFB y 0.05% de azida de sodio) y se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 RPM. Se decantó el sobrenadante y se lavan las células nuevamente con 200 μ l de Buffer de FACS y se agregó 10 μ l de solución de bloqueo (PBS 1x con 10% FBS) durante 10 minutos y poder agregar los anticuerpos conjugados. Las células se incubaron con los anticuerpos por 30 min a 4°C y posteriormente se lavaron con buffer de FACS. Las muestras se adquirieron en un citómetro ATTUNE (Life sciences) y el análisis se llevó a cabo con el software Flow Jo V10.2.

7. RESULTADOS

7.1 Genotipo

El genotipo es la composición genética de un organismo. Por lo tanto, su obtención es un procedimiento protocolario que garantiza que los ratones utilizados en el modelo experimental sean silvestres (WT) e hipomórficos para la proteína ATG16L1.

La Figura 3 muestra un gel de agarosa donde se observa los resultados del genotipo para los dos grupos de ratones. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, que se lee con una unidad de pares de bases (pb) que van de 100x100 por cada línea marcada de manera ascendente. En los carriles 2 a 4 se encuentra la amplificación con 555pb, para el grupo de ratones silvestres (WT) y en los carriles 5 a 7 la amplificación con 300pb para el grupo de ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1.

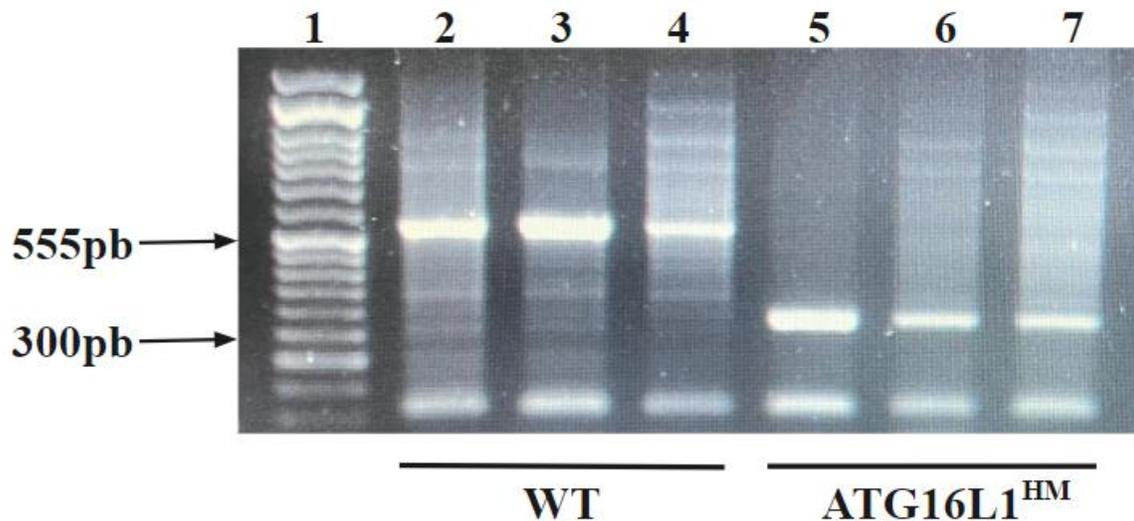
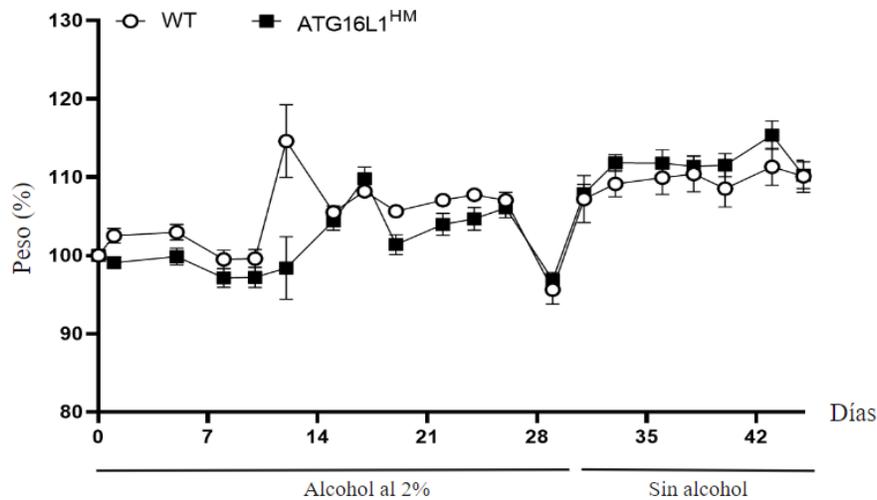


Figura 3. Imagen representativa del genotipo de ratones WT y ATG16L1^{HM}. Resultado adquirido al inicio de la experimentación con una n=6

7.2 Peso

Los ratones WT y ATG16L1^{HM}, tuvieron un monitoreo del peso corporal, durante 6 semanas. El registro comenzó el día 0 (antes de iniciado el experimento) y continuo cada tercer día a la misma hora (10 am), para obtener datos suficientes que nos permitieran hacer una comparativa de la ganancia o pérdida de peso. La figura 2, representa los porcentajes graficados de los pesos obtenidos, donde se encontró que, para la primera semana, tanto los ratones WT como los ratones ATG16L1^{HM} mantuvieron una constante, sin embargo, los ratones WT tenían un porcentaje de peso mayor, que se mantuvo hasta la segunda semana, donde se hizo notar la diferencia, ya que, los ratones WT alcanzaron su porcentaje más alto de las 6 semanas.

Es importante resaltar que los ratones ATG16L1^{HM} tuvieron tres caídas, durante la segunda a la cuarta semana, tiempo en el que sus bebederos contenía un centrado de alcohol al 2%. La gráfica muestra que la recuperación de peso corporal se dio después de colocarles agua destilada, para su consumo. Siendo estas últimas dos semanas el periodo de recuperación.

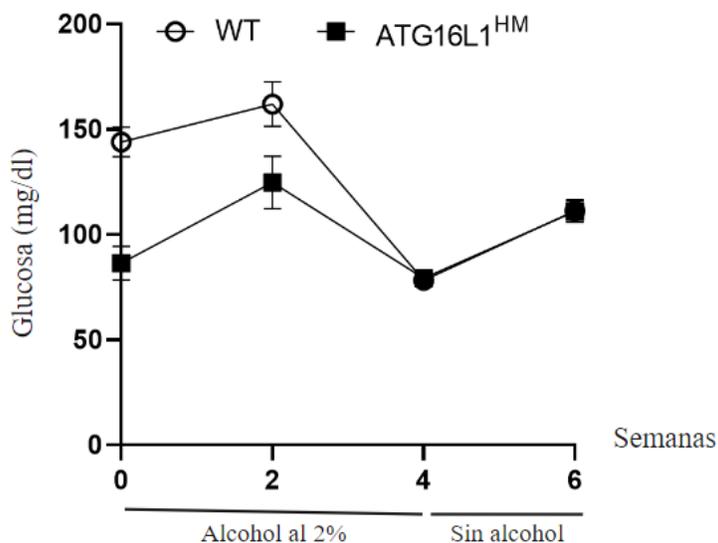


Gráfica 1. Porcentaje de peso corporal de ratones WT y ATG16L1^{HM} registrado cada tercer día durante 6 semanas (4 semanas con consumo de alcohol y 2 semanas de recuperación) Resultado obtenido con una n=12 y 2 repeticiones experimentales.

7.3 Glucosa

La relación de glucosa y alcohol se da primordialmente por el hígado, ya que es en este órgano donde es metabolizado la mayor cantidad de alcohol, y por tanto se produce una considerable cantidad de toxinas. Con respecto a la glucosa, es en el hígado donde se reserva en forma de glucagón. Considerando lo anterior, se hizo un registro de los niveles de glucosa en ambos grupos de ratones para evaluar, de forma gráfica, el comportamiento de los procesos propios del hígado en relación de dos actividades que pueden afectarse directamente.

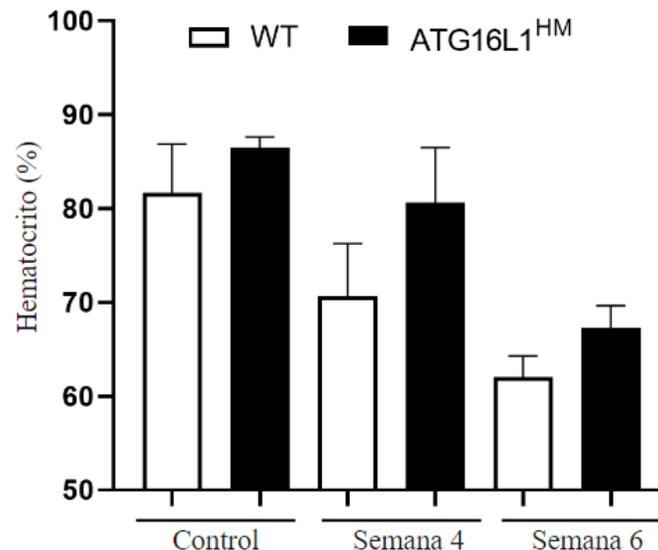
En la gráfica 2 encontramos la comparativa de los ratones WT y ratones ATG16L1^{HM} en sus niveles de glucosa. Los registros se dieron de la siguiente manera. Se tomo un análisis un día antes de comenzar con el consumo de alcohol para tener un control y posteriormente se obtuvo cada dos semanas. Si bien el comportamiento de los datos fue similar para ambos grupos de estudio, teniendo un aumento y una disminución; los niveles de glucosa, de los ratones ATG16L1^{HM} presentaron niveles más bajos durante las primeras dos semanas, comparado con los ratones WT.



Gráfica 2. Niveles de glucosa de ratones WT y ATG16L1^{HM} registrado cada dos semanas durante un mes y medio, teniendo como referente el día 0 (4 semanas con consumo de alcohol y 2 semanas de recuperación) Resultado obtenido con una n=12 y 2 repeticiones experimentales.

7.4 Hematocrito

El hematocrito es el valor que se define por la cantidad de volumen de la sangre ocupado por eritrocitos, respecto al ocupado por la fase líquida de la sangre total. Con la finalidad de medir la cantidad de eritrocitos presentes en sangre, ante el consumo de alcohol, se realizó la medición al día de iniciado el experimento, a las 2 y a las 4 semanas. El porcentaje de eritrocitos tuvo una tendencia a disminuir tanto para WT como para los ratones ATG16L1^{HM}, siendo este último grupo el que mantuvo siempre un porcentaje por encima del primero.



Gráfica 2. Porcentaje de hematocrito de ratones WT y ATG16L1^{HM} registrado al día 0 a las 4 semanas y a las 6 semanas. Resultado obtenido con una n=12 y 2 repeticiones experimentales.

7.5 Análisis Macroscópico del Colón

El consumo excesivo de alcohol puede generar cambios macroscópicos, así como de funcionamiento del colón. Debido a su toxicidad. Para analizar dichos cambios se obtuvieron las muestras de colón de los dos grupos de ratones a las 4 y 6 semanas del

experimento. Con el fin de conocer lo que sucedía en el punto máximo de consumo de alcohol y al final de la segunda semana de recuperación.

En la figura 4 tenemos las muestras de colón de la semana 4 donde se observa que los ratones WT, imagen A), aún mantienen la formación de pellets, no existiendo un cambio en la composición del contenido fecal. En cambio, las muestras de colón de los ratones ATG16L1^{HM}, imagen B), ya comienzan a presentar un desarreglo de los pellets. Esto es más notorio en las muestras de colón marcados con el numero 5 y 6, donde no se diferencia un pellet de otro. Incluso el contenido fecal es más acuoso que sólido.



Figura 4. Imagen representativa de colón de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas. A) ratones WT; B) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

De igual maneras se encontraron cambios a la semana 6 del experimento. (Figura 5). Aquí contemplamos que, para esta semana, tanto los ratones WT, imagen C), como los ATG16L1^{HM}, imagen D), contienen pellets con formas irregulares, además la consistencia se puede observar más blanda que sólida. Otro cambio relevante, es el tamaño aumentado del ciego con el numero 4 y la pérdida de su forma (así como en la muestra de colón marcado con el número 5) que pertenecen al grupo de ratones ATG16L1^{HM}.

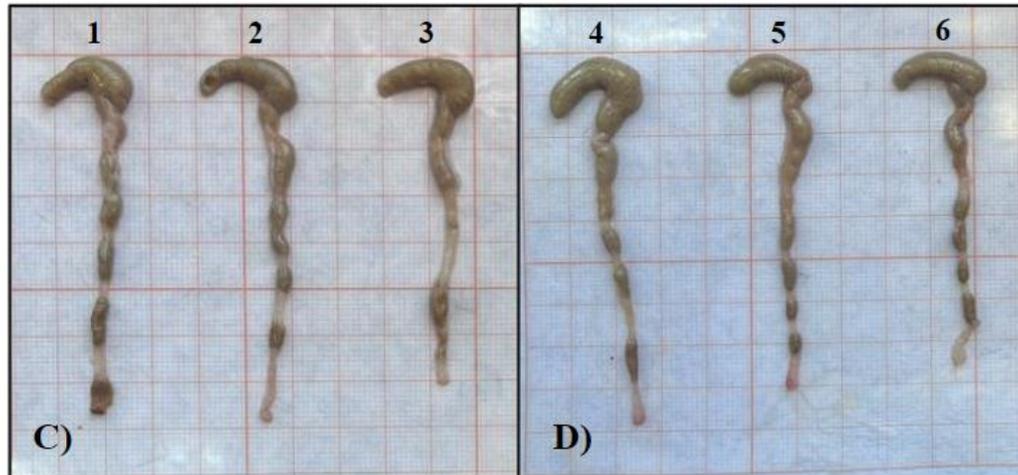


Figura 5. Imagen representativa de colón de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas y 2 semanas de recuperación (sin consumo de alcohol). C) ratones WT; D) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

7.6 Análisis del Hígado

Uno de los órganos principales, en ser afectado por el consumo excesivo de alcohol, es el hígado, ya que como se mencionó anteriormente, es aquí donde ocurre la metabolización. Para el análisis macroscópico, se recuperaron los hígados de ratón a la semana 4 y 6. En la figura 6 se muestran los órganos de la semana 4. A simple vista se nota el tamaño ligeramente mayor de los hígados, de los ratones ATG16L1^{HM}, imagen A), sobre el de los ratones WT, imagen B). Entre tanto que para la semana 6 (Figura 7), no se pueden observar diferencias, no obstante, con el apoyo de la graficación del peso del hígado (Gráfica 3), podemos saber que si existe una distinción de tamaño.

Otro aspecto que podemos observar en este modelo experimental es que no surge acumulación de grasa en el hígado, por lo tanto, no se ha llegado a un grado de esteatosis (que resulta de una complicación crónica) solo a una inflamación aguda.

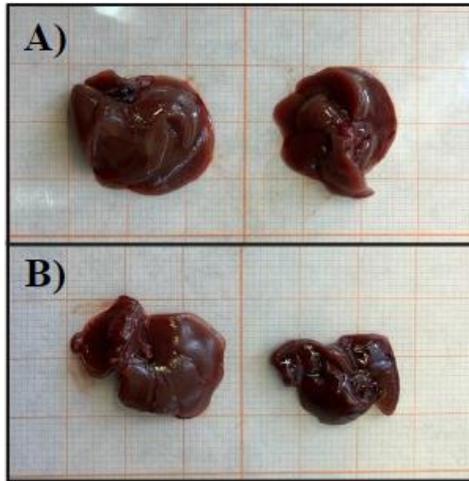


Figura 6. Imagen representativa de hígado de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas A) ratones WT; B) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

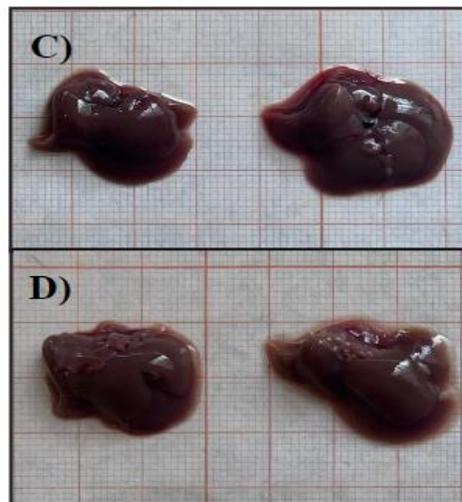
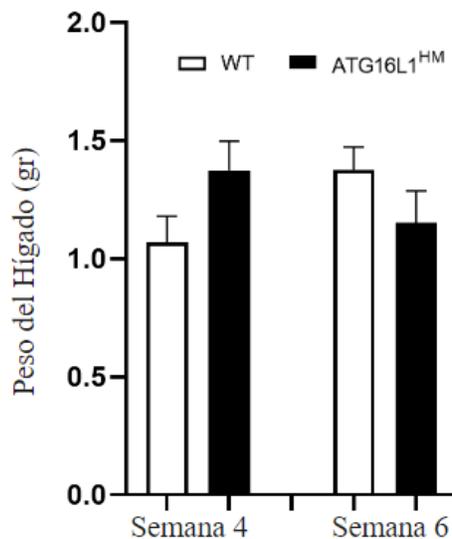


Figura 7. Imagen representativa de hígado de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas y tener 2 semanas de recuperación (sin consumo de alcohol) C) ratones WT; D) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

Para complementar los datos que nos da la observación macroscópica, se registró el peso de los hígados en la gráfica 3, donde se muestra que para al término de la semana 4, los ratones ATG16L1^{HM} tienen un peso del hígado mayor al de los WT, esto suscitado durante el consumo de alcohol. Mientras que el aumento de peso de los hígados de los ratones WT, se da, en la finalización de la semana 6, después de las dos semanas de recuperación sin consumo de alcohol. Teniendo una correlación con lo observado en las figuras 6 y 7.



Gráfica 3. Peso del hígado de ratones WT y ATG16L1^{HM} de las semanas 4 y 6. Datos obtenidos con una n=12 y 2 repeticiones experimentales.

7.7 Análisis Histológico del Hígado

En la figura 8, encontramos dos cortes histológicos representativos de cada uno de los grupos experimentales, después de 4 semanas de consumo de alcohol. Si tomamos en cuenta que los hepatocitos (células propias del hígado) suelen observarse de manera organizada en forma de cordones, separados por sinusoides, podemos decir que, en un primer vistazo, ambos cortes, muestran una anomalía, ya que no existe una distribución organizada, como es de esperarse en un hígado sano. Ahora bien, en las

flechas blancas de la imagen A) (ratones WT), se observan agrupamientos de hepatocitos, y en general una distribución muy estrecha. En tanto que las flechas blancas de la imagen B) (ratones ATG16L1^{HM}), indican espacios grandes entre un hepatocito y otro. Aquí su distribución es más dispersa. Todo esto es un indicio de que para la semana 4 ya existe un daño al hígado.

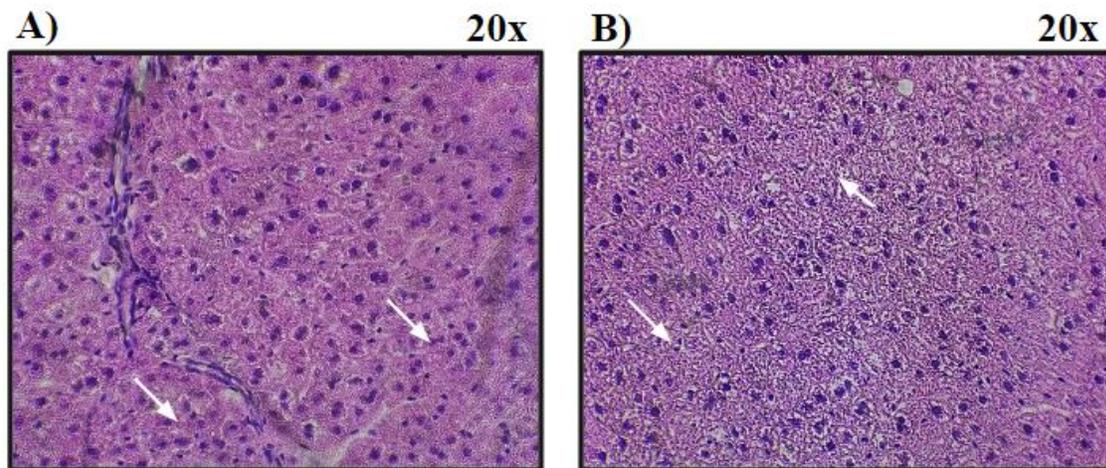


Figura 8. Imagen representativa de cortes histológicos de hígado de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas A) ratones WT; B) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

Para la semana 6 de experimentación se encontró una misma distribución desorganizada de hepatocitos (figura 9), sin embargo, hay un cambio importante, para el grupo de ATG16L1^{HM}. La flecha blanca en la imagen D), muestra una agrupación de células que no habían estado presente para la semana 4. En cuanto al grupo de WT, se muestra una distribución más espaciada entre cada hepatocito.

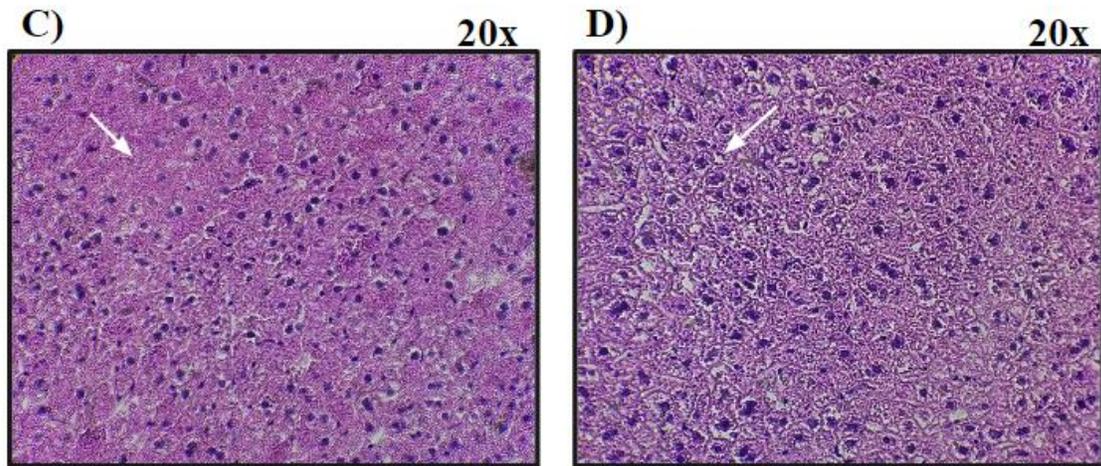


Figura 9. Imagen representativa de cortes histológicos de hígado de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas y tener 2 semanas de recuperación (sin consumo de alcohol) C) ratones WT; D) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

7.8 Análisis histológico de Tejido Adiposo

Lo que se observó en la figura 10 es que los adipocitos de los ratones ATG16L1^{HM}, imagen B), tienen un mayor tamaño en comparación con los adipocitos de los ratones WT, imagen A). Lo nos sugiere una mayor inflamación en el primer grupo.

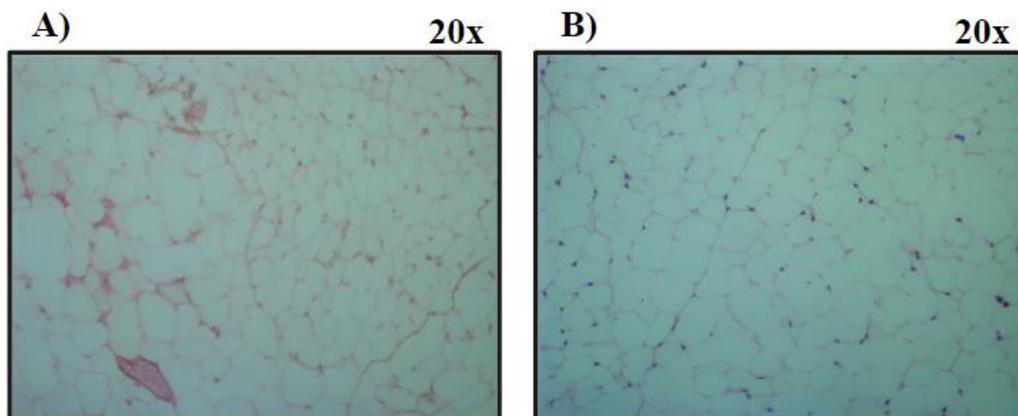


Figura 10. Imagen representativa de cortes histológicos de tejido adiposo de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas A) ratones WT; B) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

En cuanto a la semana 6 (figura 11) se observó que el tamaño de los adipocitos era menor en comparación con los adipocitos de la semana 4, esto solo en el grupo de ratones ATG16L1^{HM}, imagen D) y B), mientras que los adipocitos de los ratones WT, imagen C), mantuvieron un tamaño similar al observado en la semana 4 (imagen A)

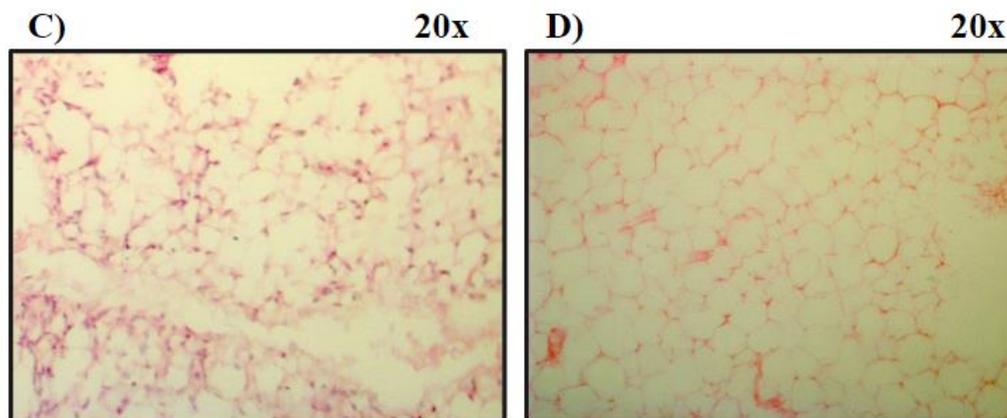
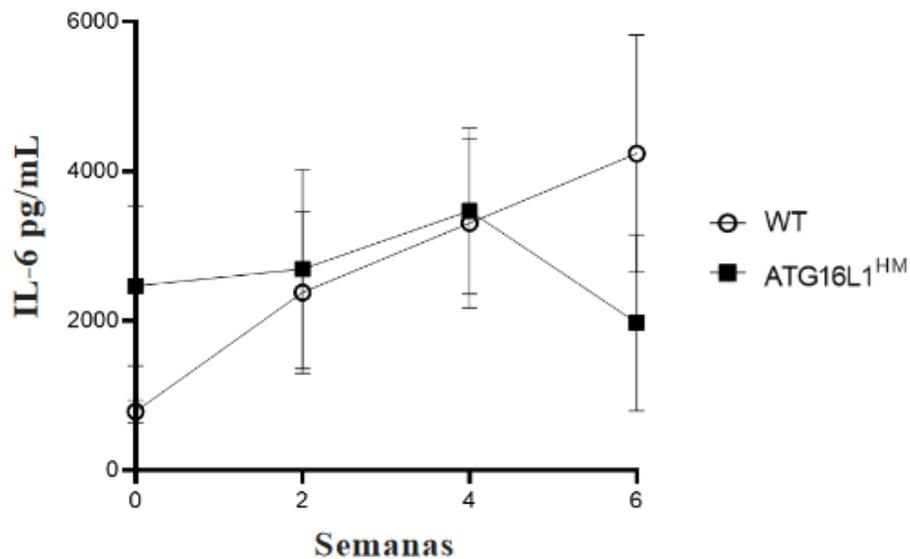


Figura 11. Imagen representativa de cortes histológicos de tejido adiposo de ratones después de consumir alcohol por 4 semanas y tener 2 semanas de recuperación (sin consumo de alcohol) C) ratones WT; D) ratones ATG16L1^{HM}. Experimento con una n=6 y 2 repeticiones experimentales.

7.9 Nivel de Interleucinas en Suero

7.9.1 Interleucina 6 (IL-6)

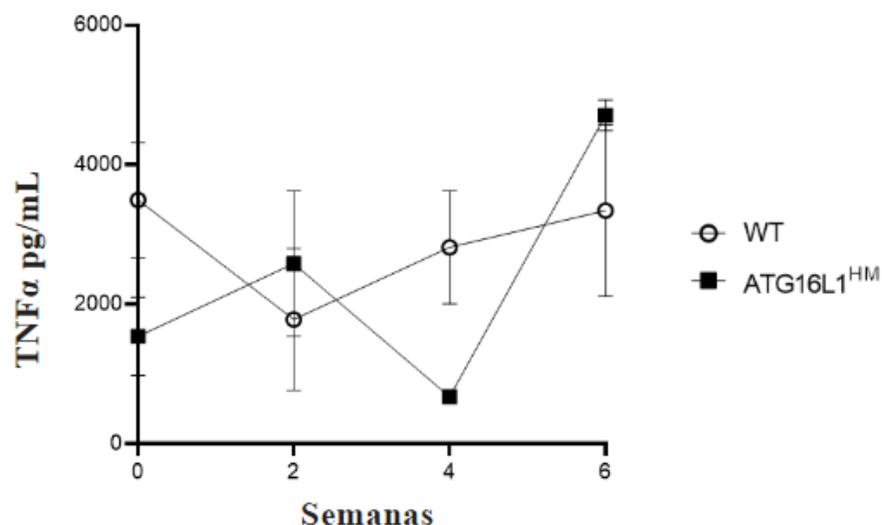
Puesto que se asocia, el aumento de los niveles de IL-6 en sangre con un proceso de inflamación, está se cuantifico en suero por medio de ELISA tipo sándwich (gráfica 4). Se observó que desde el día cero, los ratones ATG16L1^{HM}, tienen niveles altos de IL-6 en comparación de los ratones WT. El mayor pico de concentración de IL-6, para los ATG16L1^{HM}, sucedió al termino de las 4 semanas de consumo de alcohol, mientras que su nivel más bajo sucede al final de las 2 semanas sin consumo de alcohol. En cuanto al grupo WT, su mayor nivel de IL-6 ocurrió al termino de las 6 semanas de experimentación.



Gráfica 4. Niveles de interleucina 6 (IL-6) en suero, en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.9.2 Factor de Necrosis Tumoral (TNF α)

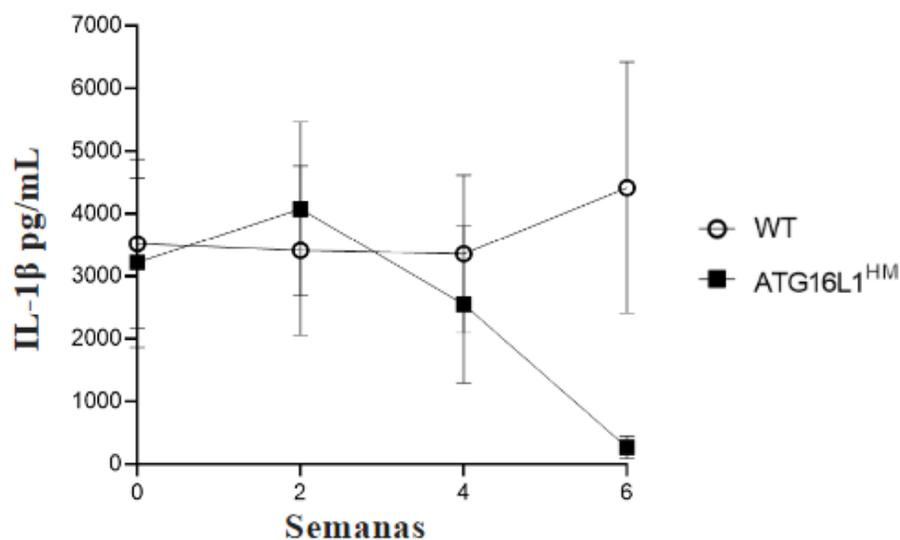
En vista de que TNF α , se relaciona con una acción proinflamatoria se cuantificó la concentración presente en suero, en ratones WT y ATG16L1^{HM} (gráfica 5). Se identificó que los niveles de interleucina tuvieron dos picos de aumento para ATG16L1^{HM}, uno durante las semanas en las que hubo consumo de alcohol y el segundo al final del experimento. En cuanto al grupo WT, no tuvo niveles altos de TNF α en comparación con los pg/mL, que tuvo de iniciado el experimento (control).



Gráfica 5. Concentración de factor de necrosis tumoral (TNF α) en suero, en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.9.3 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

Debido a que IL-1 β tiene relación con procesos inflamatorios, se optó por cuantificar su concentración en suero, para ambos grupos experimentales (gráfica 6). Se encontró que para los ratones WT, los niveles de IL-1 β se mantuvieron constantes durante las primeras 4 semanas y ocurrió un aumento de esta citocina para el final de la semana 6. Por otro lado, la concentración de IL-1 β , en los ratones ATG16L1^{HM}, tuvo un aumento en la semana 2 para posteriormente mantener una descendencia hasta la semana 6.

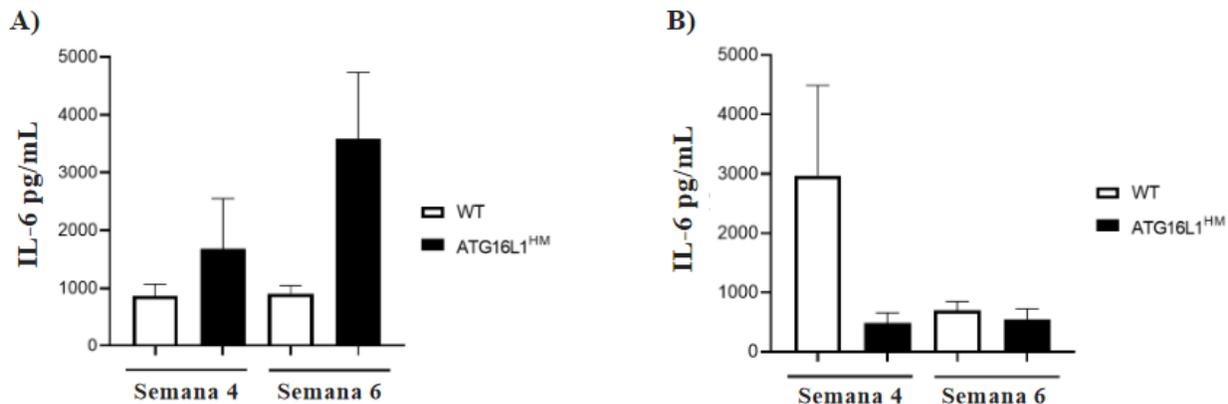


Gráfica 6. Concentración de interleucina 1 beta (*IL-1 β*) en suero, en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.10 Niveles de Interleucinas en Bazo y Ganglio Mesentérico

7.10.1 Interleucina 6 (IL-6)

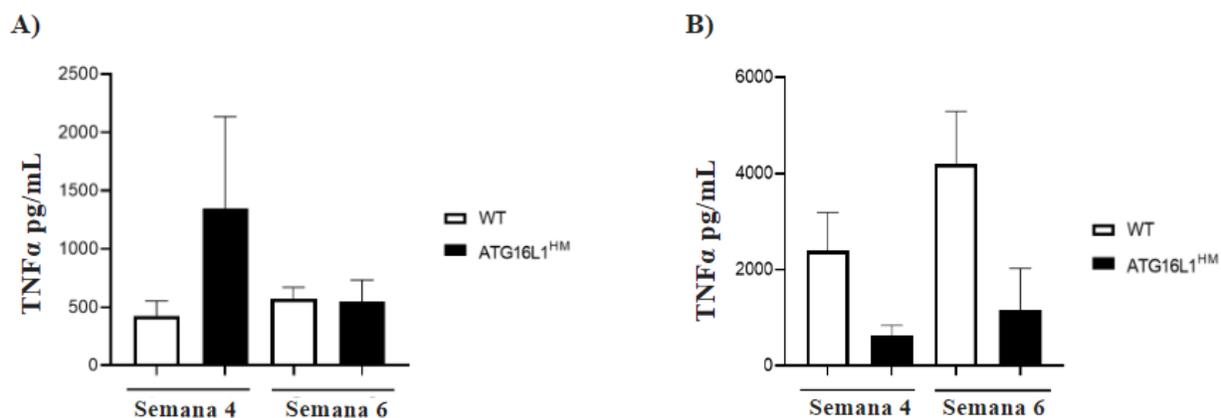
Se observó que, en el cultivo de células totales de ganglio mesentérico (gráfica 7-A), hay un aumento de concentración de IL-6, para el grupo ATG16L1^{HM}, mientras que para el grupo WT los niveles se mantienen igual. En cuanto al cultivo de células totales de bazo (gráfica 7-B), los ATG16L1^{HM}, mantuvieron la misma concentración de IL-6, en comparación de los WT, que de tener niveles altos descendieron para la semana 6.



Gráfica 7. Niveles de interleucina 6 (IL-6) en ganglio mesentérico (A) y Bazo (B), en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.10.2 Factor de Necrosis Tumoral (TNF α)

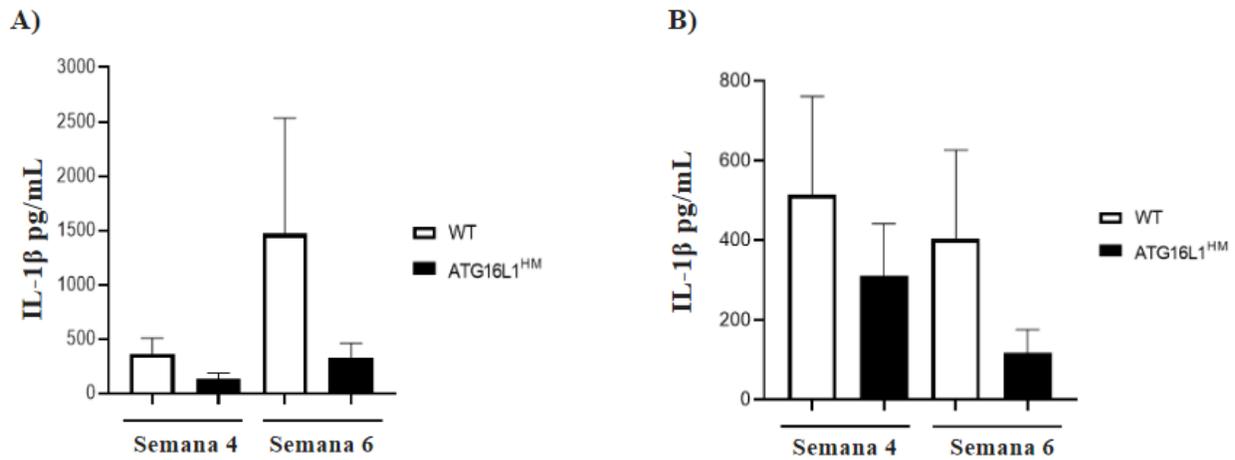
En conjunto se cuantifico la concentración de TNF α donde se encontró que, en el cultivo de células totales de ganglio mesentérico (gráfica 8-A), para los ratones WT, hubo un ligero aumento de los niveles de dicha citocina de la semana 4 para la semana 6. En tanto que los ATG16L1^{HM}, pasaron de un nivel alto en la semana 4 y un nivel bajo en la semana 6. Por otro lado, la concentración de TNF α en Bazo (gráfica B), para WT fue mayor en comparación de los ratones ATG16L1^{HM}.



Gráfica 8. Concentración de factor de necrosis tumoral (TNF α) en ganglio mesentérico (A) y Bazo (B), en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.10.3 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

Contiguo a lo anterior se cuantifico la concentración de IL-1 β , por medio de cultivo de células totales, de ganglio mesentérico (gráfica A) y bazo (gráfica B). Se observó que, los niveles más altos de IL-1 β , se presentó en el grupo WT, tanto en Bazo como en ganglio mesentérico. Mientras que el grupo ATG16L1^{HM}, tuvo su mayor concentración de IL-1 β en el Bazo durante la semana 4.

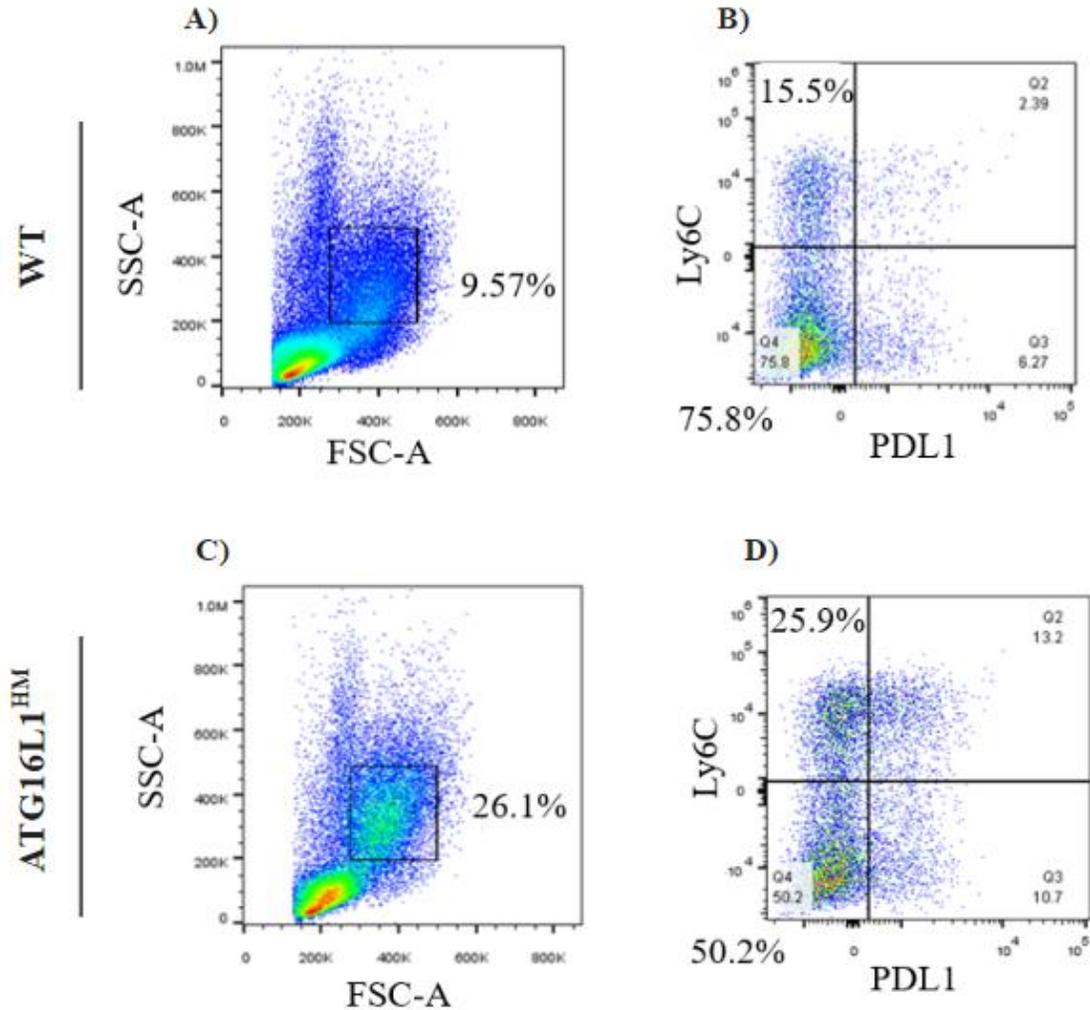


Gráfica 9. Concentración de interleucina 1 beta (IL-1 β) en ganglio mesentérico (A) y Bazo (B), en dos grupos de ratones. WT y ATG16L1^{HM} (obtención por medio de ELISA sándwich) Datos recabados de 2 repeticiones experimentales con una n= 12

7.11 Citometría de Flujo

Debido a que los macrófagos tienen un papel importante en la respuesta inmune contra un proceso de inflamación agudo, se cuantificó el porcentaje de estas células, en líquido peritoneal, por medio de citometría de flujo a la semana 4 del experimento. Se encontró que los ratones ATG16L1^{HM} (gráfica 10 C), presentaron una mayor cantidad de células a comparación de los ratones WT (gráfica 10 A). En la gráfica 10B y 10D se observa en el recuadro superior derecho, respectivamente, la cantidad de

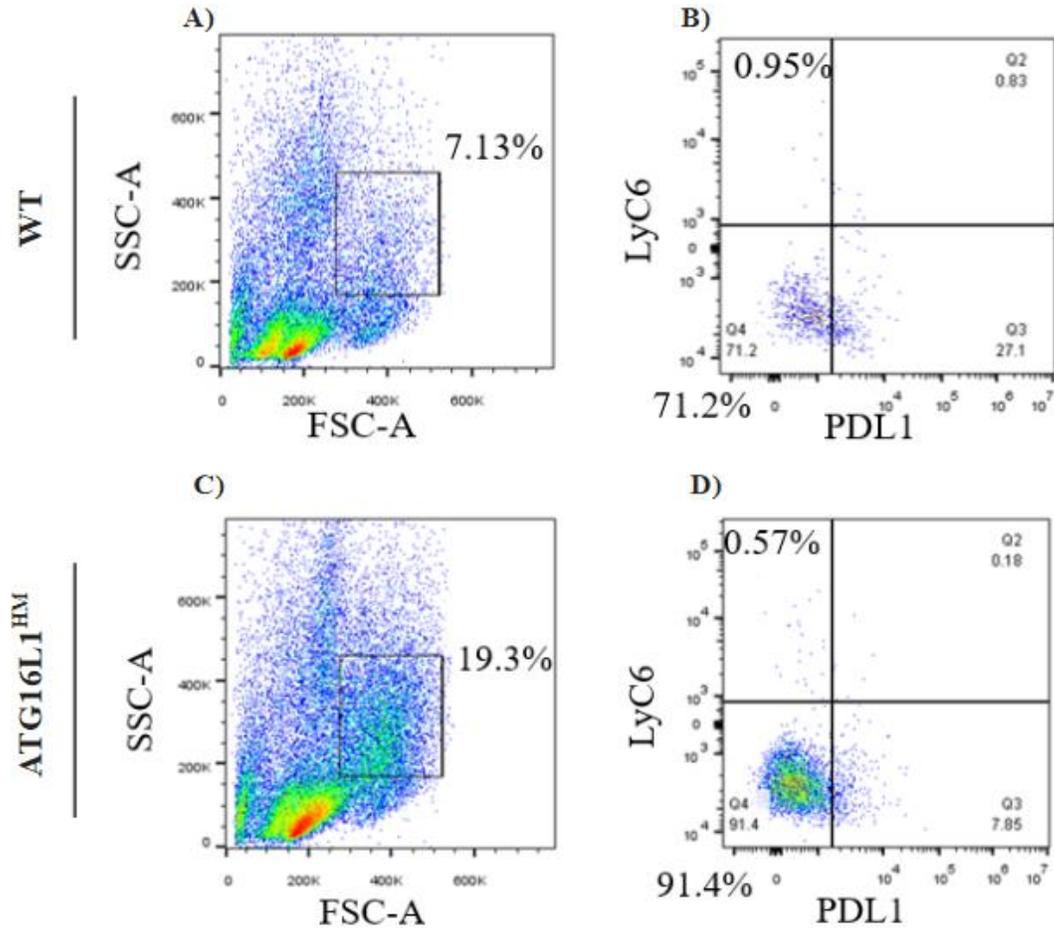
células proinflamatorias, donde ATG16L1^{HM} tiene mayor cantidad de células de este tipo.



Gráfica 10. Citometría de flujo en líquido peritoneal a la semana 4 A) Porcentaje de células del grupo WT; B) Ampliación de la región marcada en A; C) Porcentaje de células del grupo ATG16L1^{HM}; D) Ampliación de la región marcada en C. Marcadores utilizados para macrófagos.

Para la semana 6 se realizó un segundo análisis de citometría de flujo del líquido peritoneal, donde se encontró igualmente una mayor cantidad de células en el grupo ATG16L1^{HM}, los cambios sucedieron en la gráfica 11B y gráfica 11D. Se puede

observar que para la semana 6 el mayor porcentaje de células en ATG16L1^{HM} son residentes no inflamatorias.



Gráfica 11. Citometría de flujo en líquido peritoneal a la semana 6 A) Porcentaje de células del grupo WT; B) Ampliación de la región marcada en A; C) Porcentaje de células del grupo ATG16L1^{HM}; D) Ampliación de la región marcada en C. Marcadores utilizados para macrófagos.

8. DISCUSIÓN

Se ha reportado que las proteínas asociadas a autofagia (ATGs) controlan la intensidad de la respuesta inflamatoria en diversos contextos como infecciones y modelos de inflamación intestinal. Sin embargo, los procesos inflamatorios se desencadenan en respuesta a una gran variedad de estímulos, incluyendo los cambios asociados a alteraciones metabólicas. Alteraciones metabólicas como el desarrollo de obesidad y el consumo de alcohol generan la producción de mediadores inflamatorios de manera persistente y no se conoce bien como se regulan dichos procesos. En este trabajo se estudió la participación de la proteína ATG16L1 en la modulación del daño generado como consecuencia del consumo de alcohol y se observó que el consumo de alcohol ocasionó variaciones en la ganancia del peso corporal tanto en ratones silvestres como en los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1. Siendo de mayor relevancia los tres picos de caída en el porcentaje de peso para este grupo de ratones. Muchos de los datos referentes a la relación del peso con el consumo de alcohol arrojan que, tiende a existir un aumento en el peso corporal, pero se da principalmente por acompañar el consumo de alcohol con la ingesta de carbohidratos. Entonces, si consideramos que el alcohol utilizado no contiene carbohidratos, la tendencia al aumento de peso no es lo esperado y se asocian las pérdidas del porcentaje de peso a una posible deshidratación y por consecuente a una falta de apetito.

El siguiente elemento presentado en los resultados fue la glucosa, los registros se llevaron al día cero antes del consumo de alcohol y posteriormente cada dos semanas con un intervalo de ayuno de 8 horas. La glucosa es el sustrato energético de elección de las células. Al no ser necesaria como combustible celular, el hígado capta la glucosa circulante para almacenarla en forma de glucógeno para que cuando el organismo lo requiera el hígado libere glucosa. Si consideramos que al consumir alcohol el hígado le dará prioridad a metabolizar el alcohol para desintoxicar el cuerpo, el trabajo de nivelar los niveles de glucosa queda en segundo plano, provocando de esta manera una hipoglucemia. Mientras más tardío sea el consumo de alcohol, mayor será la baja

de glucosa. Algunos autores refieren que existen hiperglucemias retardadas, lo que quiere decir que sigue existiendo una disminución en el nivel de glucosa a pesar de eliminar el consumo de alcohol. Estos procesos explicarían la baja de los niveles de glucosa a la semana 4 y que a pesar del retiro de alcohol durante 2 semanas el aumento de los niveles de glucosa fue mínima. De este modo tendríamos un primer indicador del daño que está ocurriendo en el hígado.

Si revisamos los datos que nos ofrece la gráfica de hematocrito encontramos que los ratones ATG16L1^{HM} mantienen un mayor porcentaje de eritrocitos en comparación con los ratones WT y aun así ambos se mantuvieron en una línea de pérdida hacia el final de la sexta semana.

También se realizó una observación macroscópica del colon. Algunos estudios como el de la Universidad de Complutense (2018), mencionan que el consumo intensivo de alcohol altera la barrera intestinal, y otros como el de Cadwell y colaboradores (2008) sugieren que la deficiencia de ATG16L1, no supondría ningún cambio en la morfología del colon. Por lo tanto, las observaciones, dadas en este proyecto sugieren que el cambio en la morfología del ciego, como el ligero aumento de tamaño, y el cambio en la composición de contenido fecal, dado en el grupo ATG16L1^{HM}, nos sugiere que está relacionado con el daño causado por consumo de alcohol.

Como órgano, principal afectado, tuvimos una observación macroscópica del hígado, donde encontramos un aumento del tamaño de peso, pero no alteración, como acumulación de grasa, que estarían asociados a una hepatitis alcohólica, ni formación de cicatrices que se relaciona con cirrosis (Lazarte y otros, 2016). Lo que indica que el daño en dicho órgano solo se limita un proceso de inflamación que de acuerdo con lo encontrado en los hígados de la semana 6 (término del experimento), podríamos decir que es reversible si el consumo de alcohol es retirado. Debido a que el análisis microscópico del hígado nos permite evaluar un daño en el parénquima de este. También se realizó un análisis microscopico de estos. Aquí se sabe que una formación normal de los hepatocitos se encuentra de manera organizada y diferencia entre cada uno de ellos (Murli K, 2013). En los cortes se encontró un desarreglo de las células,

así como un cambio de tamaño en comparación de un grupo y otro. Estos datos los relacionamos con el proceso inflamatorio por el que cursa el hígado. Siendo más afecto el grupo de ATG16L1^{HM}.

Las citocinas son péptidos reguladores que intervienen en la comunicación intercelular con un amplio espectro de propiedades inflamatorias, hematopoyéticas, metabólicas e inmunomoduladores (Gorzka y otros, 2016). En tejidos clínicamente sanos, se ha observado la presencia en baja cantidad de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Sin embargo, en condiciones patológicas puede producirse un desequilibrio en la actividad de dichas citocinas (Carrillo y otros, 2016). En cuanto a las interleucinas, la primera que se evaluó es la IL-6, un aumento de sus niveles puede indicar una inflamación, además una de sus funciones es la liberación de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos. Se encontró un aumento de IL-6 en suero y bazo en el grupo WT, mientras que para el grupo ATG16L1, el aumento de los niveles de dio en suero y ganglio mesentérico.

En cuanto a IL-1 β , se sabe que es un mediador clave de la respuesta inflamatoria. Es esencial para la respuesta del huésped ante lesiones tisulares agudas. Además, es importante mencionar que cuando se inhibe la autofagia, esta IL-1 β se secreta; cuando se activa la autofagia, la IL-1 β secuestrada se degrada (Lopez & Brough, 2011).

Finalmente, TNF α , que es una citocina proinflamatoria, tiene una potente actividad citotóxica, capaz de actuar como un mediador letal en la respuesta inmune tanto aguda como crónica. Muchos de los mediadores inducidos por el TNF α actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como la IL-6 (Anaya, 2021) aunque en este trabajo no se encontró relación con esa actividad, ya que los datos de las gráficas de TNF α y IL-6 no tiene relación de un aumento y una disminución, de manera contraria.

Algo que llamo nuestra atención fue que los ratones ATG16L1^{HM} a pesar de mostrar cambios que sugieren más daño, como lo son adipocitos más grandes que los observados en ratones WT, tenían niveles más bajos de glucosa durante el tiempo que

consumieron alcohol. Otro hallazgo que resaltar fue la presencia de macrófagos compatibles con un fenotipo inflamatorio en la cavidad peritoneal de los ratones ATG16L1^{HM} mientras que los ratones WT presentaron un porcentaje más bajo de esta población. Los datos sugieren que la proteína ATG16L1 atenúa el daño que se genera por la ingesta de alcohol, muy probablemente inhibiendo la activación células del sistema inmune como macrófagos.

9. CONCLUSIONES

Los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 muestran signos de alteraciones histopatológicas, principalmente en el hígado, como un desarreglo celular, así mismo de una respuesta inflamatoria exacerbada, comparado con el grupo de ratones que expresan de manera normal a dicha proteína (ratones WT). Estos datos nos sugieren una mayor susceptibilidad de inflamación, por consumo de alcohol en los ratones ATG16L1^{HM}.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dunn, W., & Shah, V. (2016). Patogenia de la enfermedad hepática alcohólica. Obtenido de PubMed: 10.1016/j.cld.2016.02.004
- Francisco, J., Pastor, I., & Orfao, A. (2005). Sistema inmune y enfermedad hepática por alcohol. *Medicina Clínica*, 263-269.
- García L, & Sibila O. (2013). Mecanismo de defensa. En *Medicina Respiratoria* (págs. 15-24).
- Ilyas, G., Cingolan, F., Zhao, E., Tanaka, K., & Czaja, M. (2019). Decreased macrophage autophagy promotes liver injury and inflammation from alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1403-1413.
- Ishibashi K; Fujita N; Kanno E; Omori H; Yoshimori T; Itoh T & Fukuda M. (2011). Atg16L2, una nueva isoforma de Atg16L de mamíferos que no es esencial para la autofagia canónica a pesar de formar un complejo Atg12–5-16L2, 7 (12): 1500-1513
- Lazarte R, Pavez C & Poniachik J. (2016). Enfermedad hepática por alcohol, 27 (1): 18-30
- León, M., Alvarado, A., De Armas, J. O., Miranada, L., Varens, J. A., & Cuesta, J. Á. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 47-62.
- Lieber, C. S. (Agosto de 2004). Hígado graso alcohólico: su patogénesis y mecanismo de progresión hacia inflamación y fibrosis. Obtenido de ScienceDirect: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.008>
- Martínez-Castillo, M., Altamirano-Mendoza, I., Sánchez-Valle, S., García-Islas, L., Sánchez-Barragán, M., Hernández-Santillán, M., . . . Gutierrez-Reyes, G. (2023). Desregulación inmunológica y fisiopatología del consumo de alcohol y la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*, 136-154.

- Mizushima N; Kuma A; Kobayashi Y; Yamamoto A; Matsubae M; Takao T; Natsume T; Ohsumi Y & Yoshimori T. (2003). Apg16L de ratón, una nueva proteína de repetición WD, se dirige a la membrana de aislamiento autofágico con el conjugado Apg12-Apg5, 116 (9): 1679-1688
- Ochoa C. (2020). Sobre la Homeostasis de la Glucosa. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 59-65.
- Peña J & Bautista M. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. Investigación Clínica, 325-337.
- Xiong Q; Li W; Li P; Yang M; Wu C & Eichinger L. (2019). El papel de ATG16 en la autofagia y el sistema del proteosoma ubiquitina, 8 (1)
- Yun, Y., Baek, A., & Kim, D. (2021). Autophagy down-regulates NLRP3-dependent inflammatory. BMB Reports, 260-265.
- Zheng Y-L, Lian F, Shi Q, et al. (2015). Alcohol intake and associated risk of major cardiovascular outcomes in women compared with men: a systematic review and metaanalysis of prospective observational studies. BMC Public Health; 15: 773

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alcoholism, N. I. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Obtenido de Alcohol's Effects on Health: <https://acortar.link/5PnMCC>
- Cadwell K, Li J, Brown et al. (2008). Un papel clave para la autofagia y el gen de autofagia Atg16l1 en células de Paneth intestinales de ratones y humanos. 259-263.
- Hampe J; Franke A; Rosenstiel P; Till A; Teuber M; Huse K; Albrecht M; Mayr G; De La Vega F; Briggs J; Günther S; Prescott N; Onnie C; Häsler R; Sipos B; Fölsch U; Lengauer T; Platzer M; Mathew C; Krawczak M & Schreiber S. (2006). Un análisis de asociación de todo el genoma de SNP no sinónimos identifica una variante de susceptibilidad a la enfermedad de Crohn en ATG16L1, 39 (2): 207-2011
- Higuera-Sainz, JL, Pimentel-Jaimes, JA, Mendoza-Catalán, GS, Riecke-Campoy, U., Ponce y Ponce de León, G., & Camargo-Bravo, A. (2017). El consumo de alcohol como factor de riesgo para adquirir sobrepeso y obesidad, 13 (2), 53-62.
- Lopez G & Brough D. (2011). Comprender el mecanismo de secreción de IL-1 β , 22 (4): 189-195
- Maccioni, L, Leclercq S, Pirlot B., et al (2020). Permeabilidad intestinal, translocación microbiana, cambios en la microbiota duodenal y fecal y sus asociaciones con la progresión de la enfermedad hepática alcohólica en humanos. DOI:10.1080/19490976.2020.1782157
- Mostofsky E, Mukamal KJ, Giovannucci L, Stamofor MJ & Rimm EB. (2016). Key Findings on Alcohol Consumption and a Variety of Health Outcomes From the Nurses' Health Study. Am J Public Health; 106(9):1586-1591
- Murli K. (2013). Anatomía microscópica del hígado, 2 (5): 109-112
- Redondo N, Nova E, Díaz-Prieto LE, Marcos A. (2018). Effects of moderate beer consumption on health. Efectos del consumo moderado de cerveza en la salud. Nutr Hosp, 35(6): 41-44.

- Topiwala A, Allan CL, Valkanova V, Zsoldos E, Filippini N, Sexton C, Mahmood A, Fooks P, Singh-Manoux A, Mackay CE, Kivimäki M y Ebmeier KP. (2017). Moderate alcohol consumption as risk factor for adverse brain outcomes and cognitive decline: longitudinal cohort study. *BMJ*, 357
- Xiong Q; Li W; Li P; Yang M; Wu C & Eichinger L. (2019). El papel de ATG16 en la autofagia y el sistema del proteosoma ubiquitina, 8 (1)
- Yun, Y., Baek, A., & Kim, D. (2021). Autophagy down-regulates NLRP3-dependent inflammatory. *BMB Reports*, 260-265.
- Zheng Y-L, Lian F, Shi Q, et al. (2015). Alcohol intake and associated risk of major cardiovascular outcomes in women compared with men: a systematic review and metaanalysis of prospective observational studies. *BMC Public Health*; 15: 773