



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FISIOLOGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ETANOL EN EL ESTRÉS DE
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DEBIDA A LA SOBRECARGA DE LÍPIDOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANAYELLY LÓPEZ ISLAS

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COTUTORA: DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 01 de septiembre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna, ANAYELLY LÓPEZ ISLAS con número de cuenta 513015078 con la tesis "PAPEL DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ETANOL EN EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DEBIDA A LA SOBRECARGA DE LÍPIDOS", realizada bajo la dirección de la DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ:

Presidente: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DRA. MARINA MACÍAS SILVA
Secretario: DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ
Suplente: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Suplente: DRA. VERÓNICA SOUZA ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de septiembre de 2014.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme seleccionado como una de sus estudiantes de maestría y permitirme continuar con mi formación académica, por enriquecer no solo mi trayectoria profesional sino por el aporte a mi vida personal, sin duda ha sido una de las mejores experiencias en mi vida.

Al CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto a través de los convenios 166042 y 20594 de Apoyos Complementarios para la Adquisición de Equipo Científico y por la beca (número de CVU/Becario 480530/280546) proporcionada durante la realización de mis estudios de posgrado.

A mi Comité Tutor, conformado por la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz, la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz; por haberme acompañado y guiado durante la realización del proyecto, por sus consejos y comprensión.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A los miembros del jurado: el Dr. Diego Gonzáles Halphen, la Dra. Marina Macías Silva, el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, la Dra. Verónica Souza Arroyo y el Dr. Emilio Rojas del Castillo por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y sus comentarios para mejorar la redacción y presentación de la misma.

Al Laboratorio de Microscopía de la División de Ciencias de la Salud de la UAM-Iztapalapa por el apoyo técnico, particularmente a Jorge y José Sepúlveda por su ayuda en el área de microscopía electrónica de transmisión, los resultados obtenidos fueron pieza clave para complementar mi tesis. A Roberto Lazzarini por su disposición y sus sugerencias en el área de microscopía confocal, sus comentarios siempre fueron de gran ayuda.

A mis compañeros de laboratorio y a mis amigos, porque gracias a ellos las jornadas en el laboratorio fueron más llevaderas, por su consejo, por las palabras de aliento, por su paciencia, por la empatía, por sus enseñanzas, por su franqueza o simplemente por el tiempo que compartimos...

Alejandro García

Eli Reyes

Arturo Simoni

Elsy Salas

Aurelio Nieto

Marcela Domínguez

Benjamín Pérez

Oscar Bello

Denisse Clavijo

Paty Rosales

Dra. Verónica Souza

DEDICATORIA

A mi familia,

Quienes en todo momento estuvieron presentes en mi pensamiento, porque gracias a su ejemplo de perseverancia, honestidad y paciencia he podido alcanzar cada objetivo planteado, porque sus enseñanzas me han hecho mejor persona.

Abuela, Mamá, gracias por acompañarme a cada instante, por heredarme parte de su esencia y fortaleza.

Toño, Clau y Benjamín, mis pequeños hermanos, gracias por iluminar mis días con sus sonrisas, sus travesuras y su cariño.

Tio Meño, Carlos, Marcos, Juan y Abuelo gracias por cuidarme y consentirme como lo hicieron.

Para ustedes mi gratitud y mi cariño incondicional, siempre.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Las enfermedades hepáticas como principal causa de muerte a nivel mundial.....	1
1.2	El incremento en el consumo de colesterol y su relación con las enfermedades hepáticas.....	2
1.2.1	El colesterol y la dinámica de las membranas celulares.....	3
1.2.2	Acumulación de lípidos y estrés oxidante.....	4
1.3	Biotransformación del etanol.....	5
1.3.1	Citocromo p450 2E1	6
1.3.2	Toxicidad del acetaldehído	6
1.4.1	Estrés de retículo endoplásmico	7
1.4.2	UPR	7
1.4.2.1	IRE 1 α	8
1.4.2.2	PERK.....	8
1.4.2.3	ATF6.....	8
2	Hipótesis y Objetivos	9
2.1	Hipótesis.....	9
2.2	Objetivo general.....	9
2.2.1	Objetivos particulares	9
3	Antecedentes.....	10
4	Material y métodos.....	12
4.1	Modelo experimental y tratamientos.....	12
4.2	Cultivo primario	12
4.3	Determinación de lípidos por la técnica de aceite rojo O	14
4.4	Tinción con Filipina.....	14
4.5	Viabilidad celular	15
4.6	Western blot.....	15
4.6.1	Extracción de proteína.....	15
4.6.2	Electroforesis.....	15
4.6.2.1	Preparación de las muestras.....	15
4.6.2.2	Transferencia.....	16
4.6.3	Detección de CYP2E1, PERK y p-eIF2	16

4.7 Detección de proteínas oxidadas	17
4.8 Traslocación de ATF6	17
4.9 Actividad CYP2E1	18
4.9.1 Obtención de fracciones microsomales	18
4.9.2 Reacción enzimática	19
4.10 Determinación de colesterol en fracciones microsomales	20
4.11 Microscopía Electrónica de Transmisión	20
4.12 Análisis estadístico	21
5 Resultados	22
5.1 Modelo de esteatosis	22
5.2 El etanol y el acetaldehído potencian el daño celular generado por el colesterol.....	23
5.3 La dieta HC induce cambios en el contenido y la actividad de CYP2E1	25
5.4 La sobrecarga de colesterol y la biotransformación del etanol generan estrés oxidante.....	27
5.5 La dieta HC induce cambios morfológicos en RE	28
5.6 La respuesta de los sensores de ERE bajo nuestras condiciones experimentales..	30
5.6.1 PERK y p-eIF2 α	30
5.6.2 Traslocación de ATF6.....	31
5.7 La dieta HC incrementa el contenido de colesterol en fracciones microsomales	33
6 Discusión	34
6.1 Teoría de las dos agresiones “two-hits”	34
6.2 El CYP2E1 y estrés oxidante	35
6.3 ¿El estrés oxidante induce estrés de retículo endoplásmico?	37
6.4 La sobrecarga de colesterol y su efecto sobre los sensores de estrés de retículo endoplásmico	39
7 Conclusiones	41
Bibliografía.....	42

Lista de figuras, tablas, paneles y abreviaturas

Figura	Contenido	Página
1	Sistemas de oxidación del etanol	5
2	Micrografías representativas del contenido de lípidos neutros y colesterol por tinción con rojo O y filipina, respectivamente	22
3A	Gráfica de porcentajes de viabilidad celular en cultivo primario de hepatocitos por cristal violeta	23
3B	Micrografías en campo claro cambios en la morfología del cultivo primario de hepatocitos sometido a las distintas condiciones experimentales	24
4	Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de CYP2E1 por western blot	25
5	Actividad enzimática de CYP2E1 por cuantificación de nitrocatecol	26
6	Análisis densitométrico e imagen representativa de grupos carboxilo oxidados por Oxyblot	27
7	Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de PERK por western blot	30
8	Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de p-eIF2 α por western blot	31
9	Determinación de colesterol en fracciones microsomales de tejido hepático por OPA	33

Panel	Contenido	Página
1	Cambios morfológicos de RE analizados por microscopía electrónica de transmisión	28-29
2	Localización nuclear de ATF6 por Inmunofluorescencia	32

Tabla	Contenido	Página
1	Lista de anticuerpos primarios, secundarios y las concentraciones en que fueron usados	16
2	Grupo de tablas donde se explica el análisis estadístico de los datos	21

Abreviaturas

ADH alcohol deshidrogenasa

ALDH: aldehído deshidrogenasa

ATF4: factor activador de la transcripción 4

ATF6: factor activador de la transcripción 6

BiP: proteína de unión a inmunoglobulina

CCl₄: tetracloruro de carbono

CYP2E1: citocromo P450 2E1

CYP4A: citocromo P450 4A

eIF2 α : factor de iniciación de la transcripción 2 alfa

ERE: estrés de retículo endoplásmico

EROS: especies reactivas de oxígeno

GRP94: proteína regulada por glucosa 94

IRE 1: proteína que requiere de inositol 1

NADFL: enfermedad hepática grasa no alcohólica

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NASH: esteatohepatitis no alcohólica

PDI: isomerasa que favorecen la formación de enlaces disulfuro

PERK: cinasa parecida a la ARN cinasa de retículo endoplásmico

RE: retículo endoplásmico

UPR: proteínas que responden al mal plegamiento

XBP1: proteína 1 que se une a la caja X

Resumen

Los hepatocitos juegan un papel crítico en la modulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas, la síntesis de lípidos como el colesterol y la detoxificación de una gran variedad de agentes tóxicos como el alcohol. Estas funciones están compartimentalizadas en el retículo endoplásmico (RE) por lo tanto mantener su homeostasis representa un reto dada la cantidad de tareas que realiza. Cambios en la homeostasis del calcio, el estrés oxidante y la sobrecarga de lípidos, se han asociado con el estrés de retículo endoplásmico (ERE). Para restaurar el correcto funcionamiento del RE, se activan las proteínas que responden al mal plegamiento conocidas en conjunto como UPR (proteínas que responden al mal plegamiento por sus siglas en inglés). UPR son una colección de vías de señalización conformadas por tres proteínas IRE 1 α , PERK y ATF6, que tienen la función de detener transitoriamente la síntesis de proteínas y promover la expresión de proteínas chaperonas y de degradación. **Objetivo.** Nos propusimos evaluar el efecto que tiene una dieta rica en colesterol y la oxidación del etanol mediada por CYP2E1 en el retículo endoplásmico. **Metodología.** Se alimentaron ratones de la cepa C56BL/6 con dieta HC (que contenía 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio) por 48 h, posteriormente se aislaron hepatocitos que fueron incubados por 4 h en medio de adhesión, pasado este tiempo se cambió el medio por uno que contenía 100 mM de etanol o 200 μ M de acetaldehído, permanecieron incubadas de esta manera por 24 h. **Resultados.** La dieta HC incrementó el contenido de lípidos neutros y colesterol en los hepatocitos sometidos a la dieta HC por 48 h. Se presentó disminución significativa de la viabilidad celular en hepatocitos de animales tratados con dieta HC, acetaldehído y su combinación. La dieta HC, el etanol y su combinación, indujo la actividad de CYP2E1. Todos los tratamientos generaron estrés oxidante sin embargo, la mayor contribución se observó en hepatocitos tratados con dieta HC. El etanol y la dieta HC incrementaron el contenido de PERK, sin embargo, la fosforilación de eIF2 α se vio disminuida en presencia de la dieta HC. ATF6 no presentó cambios en la localización nuclear bajo ningún tratamiento. Se observó proliferación del retículo endoplásmico en hepatocitos tratados con dieta HC y la

asociación de lisosomas al retículo endoplásmico en aquellos hepatocitos que recibieron la de dieta HC y etanol. El acetaldehído indujo cambios en la morfología de las mitocondrias. El tratamiento con dieta HC incrementó el contenido de colesterol en fracciones microsomales. **Conclusión.** La sobrecarga de colesterol induce estrés de retículo endoplásmico que se ve incrementado por la exposición a etanol, mientras que el acetaldehído genera daño hepático a través de mitocondria.

Abstract

Hepatocytes perform a variety of metabolic functions, including those related to protein, carbohydrates, cholesterol and xenobiotics metabolism or biotransformation, like ethanol. These metabolic functions and their compartmentalization in the endoplasmic reticulum (ER) have been long recognized. Alterations in calcium homeostasis, oxidative stress and lipids overload have been associated with endoplasmic reticulum stress (ERS). These disturbances trigger a conserved response termed as the unfolded protein response (UPR). UPR seeks to restore the normal functioning of the ER through of expression chaperone proteins to prevent protein aggregation and reduced temporary of protein translation. There are three branches of UPR that have been described: PERK, IRE1 α , and activating transcription factor (ATF6). **Aim:** To evaluate the effect of cholesterol overload and alcohol metabolism mediated by CYP2E1 in ERS. **Methods:** Mice C56BL/6 were fed diet HC (containing 2% cholesterol and 0.5% sodium cholate) for 48 h, their hepatocytes were isolated by a two-step collagenase perfusion technique. Hepatocytes were incubated for 4 h in attachment médium. After, the medium was replaced to one containing 100 mM ethanol or acetaldehyde 200 μ M, for 24 h. **Results:** The HC diet increased the content of neutral lipids and cholesterol in hepatocytes. There was a significant decrease in cell viability in hepatocytes treated with HC diet, acetaldehyde and their combination. The HC diet, ethanol and their combination induced CYP2E1 activity. All treatments oxidative stress generated however, the largest contribution is observed in hepatocytes treated with the HC diet. Both ethanol and HC diet increase the content of PERK. The phosphorylation of eIF2 α decreased with HC diet. ATF6 remained without change in its nuclear localization under any conditions. ER proliferation was observed in hepatocytes treated with HC diet and association with lysosomes-ER were observed in hepatocytes treated with HC diet and ethanol. Acetaldehyde induce changes in the morphology of mitochondria. HC diet increased the content of cholesterol in microsomal fractions. **Conclusion.** Cholesterol overload induces ERS that is increased by exposure to ethanol. Acetaldehyde promotes liver damage through mitochondria

1 Introducción

1.1 Las enfermedades hepáticas como principal causa de muerte a nivel mundial

Las enfermedades hepáticas tanto agudas como crónicas, representan actualmente una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En nuestro país la cirrosis ocupa la tercera causa de defunción, según encuestas realizadas por el INEGI en 2011.

La alta tasa de mortalidad por enfermedades hepáticas está asociada principalmente a infecciones virales, particularmente al virus de la hepatitis C, así como a la ingesta de alcohol y a problemas nutricionales.

En 2011 la Encuesta Nacional de Adicciones reportó que 4.5 millones de personas presentan problemas para controlar el consumo de alcohol, mientras que la encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó que 52.2 millones de personas en nuestra población padecen obesidad y sobrepeso debido a un marcado incremento en el consumo de alimentos con alto contenido calórico como carbohidratos y lípidos. Debido a estos malos hábitos, se ha incrementado la prevalencia de esteatosis, es decir, de hígado graso.

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD por sus siglas en inglés) es la causa más frecuente a nivel global de alteraciones crónicas en las pruebas de función hepática en individuos asintomáticos. Esta enfermedad hepática comprende desde el punto de vista histopatológico un espectro que varía entre el simple depósito de grasa en el hígado, considerada como una “patología benigna” que eventualmente puede progresar a esteatohepatitis (NASH por sus siglas en inglés), fibrosis y cirrosis, e incluso hepatocarcinoma. La NAFLD se define como la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol y la presencia de esteatosis macrovesicular. La esteatosis macrovesicular se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en hígado debido generalmente a un desbalance entre su síntesis y exportación. En NASH, además de la esteatosis se presenta daño debido al infiltrado de células inflamatorias. Generalmente NASH puede conducir a estadios más severos de daño hepático como la fibrosis.

1.2 El incremento en el consumo de colesterol y su relación con las enfermedades hepáticas

Según datos de la encuesta Urbana de Nutrición (Enurbal) 2007, se considera que hay un incremento en el consumo de alimentos ricos en colesterol en la población de la Ciudad de México. La ingesta recomendada es 240 a 260 mg/día, sin embargo el consumo que se reporta actualmente oscila entre 374.1 y 452.4 mg/día. Recientes investigaciones han demostrado que pacientes infectados con el virus de la hepatitis C, que además tienen una dieta rica en colesterol, presentan mayor riesgo de progresión a fibrosis y cirrosis (Yu et al., 2013).

Otros estudios señalan que una dieta enriquecida con colesterol, juega un papel importante en la patogénesis de NASH. En 2013, Savard y colaboradores reportaron que la adición de colesterol a una dieta alta en grasas indujo la progresión de esteatosis a esteatohepatitis en ratones de la cepa C56BL/6J. Consistente con estos resultados, se reportó que la adición de colesterol a una dieta diabetogénica (con alto contenido de grasas y carbohidratos) dio lugar al aumento en la esteatosis hepática, inflamación y fibrosis en ratones deficientes de receptores LDL (Subramanian et al., 2011).

La adición de colesterol a la dieta de ratones *foz/foz* (mutados en el gen *A/mst1*) que desarrollan obesidad y resistencia a la insulina, ocasionó la acumulación de colesterol libre en el hígado, además de producir apoptosis, reclutamiento de macrófagos y fibrosis (Van Rooyen et al., 2011).

Los cambios en la dinámica de las membranas celulares (Musso et al., 2013) y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Baffy et al., 2012) son algunos de los principales mecanismos de daño hepático asociados a la sobrecarga de colesterol.

1.2.1 El colesterol y la dinámica de las membranas celulares

El colesterol es un componente fundamental de las membranas celulares, debido a su estructura molecular desempeña un papel importante en mantener la estructura y dinámica de dichas membranas.

Se ha observado que niveles bajos de colesterol incrementen la fluidez de las membranas y por el contrario, aumentarlos las vuelve demasiado rígidas. Estos eventos tienen repercusiones directas sobre los microambientes lipídicos y las proteínas que se encuentran en ellos. Muchas de estas proteínas requieren de cambios conformacionales como parte de su actividad y dichos cambios conformacionales pueden ser impedidos por cambios en la cantidad de colesterol (Musso et al., 2013).

Mientras que la membrana plasmática posee los niveles más altos de colesterol, la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) poseen alrededor del 5% del colesterol total celular, por lo tanto, son organelos altamente sensibles a las variaciones en los niveles de este esterol (Montero et al., 2010).

Estudios recientes señalan que el incremento de colesterol en la membrana del RE de hepatocitos indujo estrés de retículo endoplásmico (ERE) (Hager et al., 2012), mientras que, en mitocondria, se observaron efectos en el transportador 2-oxoglutarato que es particularmente sensible a los cambios en contenido de colesterol. La acumulación de colesterol libre en la membrana mitocondrial perjudica el transporte de glutatión, agotando las reservas de glutatión mitocondrial y promoviendo la generación de EROS y la peroxidación lipídica (Musso et al., 2013, Marí et al., 2006).

1.2.2 Acumulación de lípidos y estrés oxidante

Tanto el grupo del Dr. Fernández Checa como el nuestro, ha reportado que el incremento de colesterol hepático genera esteatosis, que como se ha señalado anteriormente está acompañada de la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. Los hepatocitos no son células diseñadas para el almacenaje de lípidos, por lo tanto la acumulación de éstos genera daño citotóxico por inducción de estrés oxidante. Investigaciones recientes señalan que los radicales libres y el estrés oxidante son mediadores clave en el daño hepatocelular y han sido implicados en la progresión de NAFLD a NASH (Sumida et al., 2013).

Dado que la oxidación es la mejor forma de evitar la acumulación de lípidos, esta emerge como un mecanismo de adaptación ante la sobrecarga de lípidos.

Los lípidos son oxidados por diferentes sistemas enzimáticos como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa y la familia de enzimas P450. Sin embargo, algunos de estos sistemas generan EROS, particularmente el sistema de oxidación microsomal constituido por la familia de enzimas P450.

Se ha reportado que las isoformas del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y P450 4A (CYP4A) son la principales vías involucradas en la hidroxilación de ácidos grasos. Además de ser altamente inducible por etanol, CYP2E1 está regulada positivamente en diabetes, obesidad, así como por una dieta alta en grasas (Robertson et al., 2001).

La creación de líneas de células hepáticas que sobreexpresan CYP2E1 confirmaron la relación directa entre la generación de especies prooxidantes por vías microsomales y la lesión celular (Robertson et al., 2001). Algunos trabajos han explorado aspectos de estrés oxidativo de relevancia para la NAFLD. Se reportó que la adición de ácido araquidónico provocó toxicidad y muerte celular por apoptosis en la línea celular HepG2 que sobreexpresa CYP2E1 (Chen et al., 1997).

1.3 Biotransformación del etanol

Aunque la relación entre las enfermedades hepáticas y el consumo del etanol están bien establecidas, los mecanismos por los cuales se genera daño hepático aún no están totalmente caracterizados. Se sabe que el principal mecanismo de daño hepático producido por la exposición a etanol es mediado por estrés oxidante. (Yang et al., 2014).

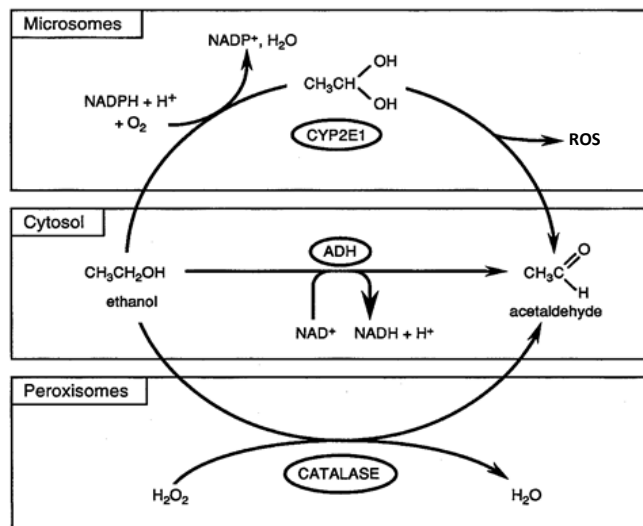


Fig. 1. Sistemas de oxidación del etanol. El hepatocito dispone de tres sistemas enzimáticos capaces de oxidar el etanol a acetaldehído: alcohol deshidrogenasa (ADH), sistema microsomal de oxidación constituido por la superfamilia de enzimas P450 y catalasa. El incremento en la actividad del sistema microsomal está acompañada de la producción de especies reactivas lo que eventualmente conduce a daño hepático.

El 90% del alcohol que consumimos se biotransforma en el hígado. Los hepatocitos cuentan con tres sistemas enzimáticos que oxidan el etanol a acetaldehído; la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal de oxidación y en menor medida la catalasa (Fig.1).

1.3.1 Citocromo p450 2E1

El sistema microsomal de oxidación está constituido por la superfamilia de enzimas P450. Está bien documentado que la isoforma CYP2E1 es inducible por el etanol (Yongke et al., 2009), tiene una Km relativamente alta para el etanol de 8-10 mM, lo cual explica que sea la ADH la principal enzima en oxidar el alcohol. Sin embargo, tanto en la ingesta crónica como aguda de alcohol, el sistema microsomal de oxidación juega un papel importante en su oxidación, gracias a su capacidad de adaptación (Lluis, 2004 Tesis de Doctorado).

El CYP2E1 utiliza NADPH y oxígeno molecular para oxidar el etanol, generando EROS como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Feierman y Cederbaum 1989), es aquí donde radica el principal mecanismo de daño hepático asociado al incremento en su actividad.

1.3.2 Toxicidad del acetaldehído

Como se menciona anteriormente, el acetaldehído es el primer producto de la oxidación del etanol, eventualmente es biotransformado a acetato (por el pH celular) por dos tipos de enzimas, conocidas como aldehído deshidrogenasas (ALDH) una mitocondrial y la otra citosólica, la isoforma que presenta mayor actividad es la mitocondrial.

El acetaldehído se ha considerado aún más tóxico que el etanol, gracias a la alta reactividad de su grupo carbonilo que le confiere la habilidad para formar aductos con en el ADN y una gran variedad de proteínas (hemoglobina, CYP2E1, colágeno y tubulina) alterando la funcionalidad de estas biomoléculas (Lluis 2004 Tesis de Doctorado).

Nuestro grupo de investigación reportó daño oxidante (Gutiérrez-Ruiz et al., 2001) y producción de citocinas proinflamatorias (Gómez-Quiroz et al., 2003; Gómez-Quiroz et al., 2005) como eventos que contribuyen en el proceso de daño hepático. Sin embargo, diversos estudios han probado que el acetaldehído ejerce su efecto tóxico particularmente sobre la mitocondria, induciendo estrés oxidante (Farfán et al., 2009) por disminución en los niveles de glutatión (García-Ruiz et al., 1994)

1.4 Retículo endoplásmico

El RE cumple con una variada gama de funciones celulares como la síntesis, el plegamiento y las modificaciones post-traduccionales de proteínas, la homeostasis de calcio, la síntesis de lípidos, además de mantener una estrecha dinámica con otros organelos como la mitocondria y el aparato de Golgi. Todo estos procesos se llevan a cabo en el lumen del RE, en un ambiente oxidante, indispensable para la formación de enlaces disulfuro y en presencia de altas concentraciones de calcio, esto asegura el correcto funcionamiento de las chaperonas y consecuentemente el plegamiento de las proteínas.

1.4.1 Estrés de retículo endoplásmico

Eventos que alteraran la función del RE como cambios en el estado redox o en las concentraciones de calcio, generan ERE que se caracteriza por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen (Farrukh et al., 2014) y la proliferación del RE.

Como respuesta adaptativa se activa una colección de vías de señalización altamente conservadas, se les conoce como proteínas que responden al mal plegamiento (UPR por sus siglas en inglés). Las UPR tienen como misión restablecer la función del RE a través de la inhibición transitoria de la síntesis de proteínas y el incremento de chaperonas y proteínas de degradación. Si el daño producido en el retículo es irreversible, las UPR activan rutas de muerte celular como autofagia y apoptosis.

1.4.2 UPR

Las UPR son tres vías de señalización mediadas por la activación de la endoribonucleasa IRE 1 α , la cinasa PERK y el factor de transcripción ATF6, todas estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana del RE y poseen un dominio citosólico y otro luminal. Bajo condiciones normales, su dominio luminal se encuentra unido a la chaperona BiP (proteína de unión a inmunoglobulina), sin embargo, cuando se presenta ERE, BiP se disocia de IRE 1 α , PERK y ATF6 para que estos sensores puedan activarse.

1.4.2.1 IRE 1 α

Cuando el dominio luminal de IRE 1 α se encuentra libre se produce su dimerización y autofosforilación. Su dominio citosólico se activa y es capaz de activar el ARN mensajero del factor de transcripción XBP1, por escisión y eliminación de un intrón de 25 pares de bases. XBP1 es un potente activador de genes que regulan la síntesis, plegamiento, glicosilación y degradación de proteínas, el estado redox, la autofagia, la síntesis de lípidos y el tráfico vesicular.

1.4.2.2 PERK

Una vez que PERK censa estrés, su dominio citosólico con actividad de cinasa, fosforila la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción de eucariotes (eIF2 α) en residuos de serina. Esto induce la reducción de proteínas nacientes que requieren de plegamiento, paradójicamente la fosforilación de eIF2 α favorece la traducción selectiva de algunos mensajeros, el mejor ejemplo es el mRNA del factor de transcripción 4 (ATF4). ATF4 regula la expresión de genes apoptóticos y antiapoptóticos, su expresión dependerá de la intensidad y la duración del ERE (Vannuvel et al., 2013).

1.4.2.3 ATF6

Durante condiciones de ERE, ATF6 es transportado en vesículas al aparato de Golgi, donde es escindido secuencialmente por las proteasas S1P y S2P. El fragmento de ATF6 que se trasloca al núcleo posee un motivo básico constituido por leucinas, que favorecen su unión al ADN.

ATF6 regula la expresión de genes que codifican para proteínas como BiP, GRP94 (proteína regulada por glucosa 94) y PDIs (una familia de isomerasas que favorecen la formación de enlaces disulfuro).

Recientes investigaciones señalan que tanto la exposición a etanol (Petrasek et al., 2013) como la acumulación de colesterol en RE inducen ERE (Tabas 2010). Estos hallazgos proporcionan nuevas alternativas de estudio para la caracterización del daño hepático provocado por la exposición a etanol y la sobrecarga de colesterol.

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La esteatosis generada por una sobrecarga de colesterol en cultivo primario de hepatocitos generará ERE, el cual será incrementado por la biotransformación del etanol por el CYP2E1.

2.2 Objetivo general

Caracterizar el ERE producido por una sobrecarga de colesterol y la biotransformación del etanol en cultivo primario de hepatocitos.

2.2.1 Objetivos particulares

- Estudiar por microscopia electrónica de transmisión el estado que guarda los hepatocitos con una sobrecarga de colesterol
- Determinar la participación del CYP2E1 en el ERE.
- Determinar el estado que guardan diferentes marcadores de ERE: PERK, p-eIF2 α y ATF6.

3 Antecedentes

Datos internos de nuestro grupo de investigación mostraron que los hepatocitos de ratones alimentados con dieta HC por 48 h presentan un mayor daño oxidante, pues se observó un incremento en la producción de EROS y de proteínas oxidadas, asimismo, cultivos celulares de la línea VL17A, (las cuales son células HepG2 transfectadas con los genes de la alcohol deshidrogenasa y el CYP2E1 que tienen la capacidad de biotransformar el etanol), que fueron tratados con 100 mM de etanol por 48 h presentaron disminución en la viabilidad celular que estuvo acompañada por un incremento en la producción de EROS, lipoperoxidación y oxidación de proteínas (Valdés-Arzate et al., 2009). Otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación reportó que el pretratamiento con ácidos grasos (palmítico y oleico 1 mM 2:1) y etanol (100 mM) en las mismas células presentó una marcada disminución en el porcentaje de viabilidad.

En la última década se han realizado importantes avances que nos han permitido una mejor comprensión de la patogénesis en algunas enfermedades hepáticas, en donde se ha asociado al daño por radicales libres como una de las principales causas de daño hepatocelular. Datos recientes han relacionado al estrés oxidante como un factor clave en el desarrollo de ERE. Actualmente tanto la sobrecarga de lípidos como la exposición a etanol generan ERE (Farrukh et al, 2014).

Se ha observado en modelos murinos tratados con etanol que una de las principales respuestas celulares que induce el daño hepático por exposición a etanol, es el incremento en la expresión de ARN mensajero de chaperonas de RE como Bip y GRP94 (Ji et al, 2003). Mientras que los datos obtenidos en modelos de NAFLD han revelado la activación de las UPR (Ozcan et al, 2004). Otras investigaciones, donde se analizaron muestras de hígado de pacientes con NASH y NAFLD, han revelado incremento en la fosforilación de eIF2 α y Bip (Gregor et al, 2009).

Aunque ya se cuenta con alguna información sobre los posibles mecanismos por los cuales la sobrecarga de lípidos y la exposición a etanol generan daño hepático, aún no están totalmente descritos estos procesos, es por ello que proponemos

evaluar el efecto de estos dos agentes sobre el estrés de retículo endoplásmico en cultivo primario de hepatocitos.

4 Material y métodos

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich México, salvo cuando se indique lo contrario.

4.1 Modelo experimental y tratamientos

Para desarrollar el presente estudio, se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 9 semanas de edad, los animales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Para caracterizar el ERE producido por una dieta alta en colesterol y una segunda agresión con etanol o acetaldehído se procedió de la siguiente manera, se formaron dos grupos (con 6 ratones como mínimo para cada grupo):

- Grupo 1. Animales alimentados con dieta balanceada (CHOW).
- Grupo 2. Animales alimentados con dieta hipercolesterolémica (HC) que contiene 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio (Dyets Inc.).

Los animales fueron alimentados por dos días con sus respectivas dietas y los hepatocitos fueron aislados por perfusión doble con colagenasa.

4.2 Cultivo primario

Para la obtención de hepatocitos de ratón se usó la técnica de perfusión con colagenasa en dos pasos como ha sido reportada previamente por Gómez-Quiroz y colaboradores (2008).

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con 0.6 mL de tribromoetanol (Avertina). La superficie abdominal se limpió con etanol al 70% y se realizó una incisión en abdomen y tórax para dejar expuesto hígado y corazón. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones.

Se introdujo un catéter Abbocath 22G en el atrium, el catéter estaba acoplado a un equipo de perfusión y se procedió a cortar la vena porta para abrir la circulación.

Como primer paso, el hígado se perfundió con 40 mL de amortiguador HBSS (solución salina balanceada de Hanks) que contenía HEPES 10 mM, EGTA 75 mM

y se encontraba libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Posteriormente se hizo pasar solución de colagenasa que contenía 35 mg de colagenasa diluida en 50mL de medio Williams suplementado con 100 mg de albumina.

El hígado fue removido y colocado en una caja Petri de 10 cm de diámetro que contenía 10 mL de medio Williams suplementado con suero fetal de bovino al 10%, antibiótico y antimicótico (medio de adhesión).

El hígado se disgregó con dos pipetas de 1 mL bajo condiciones de esterilidad. Se obtuvo una suspensión de células hepáticas que se hicieron pasar por un filtro con poros de 100 μm . La suspensión fue centrifugada a 45 xg por 5 min a 4°C, el sobrenadante obtenido fue desechado y el botón celular se resuspendió en 25 mL de medio de adhesión. Una vez resuspendido, el botón celular fue mezclado suavemente con una solución de Percoll y Hanks 10X, posteriormente fue centrifugado a 170 xg por 10min a 4°C. El botón celular resultante estaba constituido prácticamente por hepatocitos.

Los hepatocitos fueron resuspendidos en 20 mL de medio de adhesión y se determinó la viabilidad de los mismos con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Los hepatocitos utilizados siempre presentaron una viabilidad celular superior a 95%.

Las células viables se sembraron a una densidad de 72,000 células/cm² y se mantuvieron en incubación con medio de adhesión por 4 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad a saturación. Posteriormente se cambió el medio de adhesión por medio de tratamiento, el cual era el mismo medio pero libre de suero y complementado con etanol o acetaldehído.

Finalmente nuestro grupo de análisis quedó constituido por 6 diferentes grupos:

1. Hepatocitos aislados de animales alimentados con dieta CHOW (CW)
2. Hepatocitos aislados de animales alimentados con dieta CHOW y expuestos por 24 h a 100 mM de etanol. (CWE)
3. Hepatocitos aislados de animales alimentados con dieta CHOW y expuestos por 24 h a 200 μM de acetaldehído. (CWA)

4. Hepatocitos aislados de animales alimentados con dieta HC. (HC)
5. Hepatocitos aislados de animales alimentados con dieta HC y expuestos por 24 h a 100 mM de etanol. (HCE)
6. Hepatocitos aislados de animales tratados con dieta HC y expuestos por 24 h a 200 μ M de acetaldehído. (HCA)

4.3 Determinación de lípidos por la técnica de aceite rojo O

Para determinar el contenido de lípidos neutros en los hepatocitos en cultivo, se realizaron tinciones con rojo O. Las células fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y fijadas con paraformaldehído 4% por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente fueron tratadas con 400 μ L de aceite rojo oleoso 0.2% por 1 h. El exceso del colorante se retiró con una solución de isopropanol al 60%, finalmente las células fueron teñidas con hematoxilina de Harris por 30 seg.

Las muestras fueron observadas en un microscopio invertido Carl Zeiss Axiovert 25.

4.4 Tinción con Filipina

El colesterol libre fue determinado por un ensayo de inmunofluorescencia mediante tinción con filipina. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 3.7% por 10 min posteriormente fueron permeabilizadas con saponina 0.1% durante 5 min.

Las células fueron incubadas con filipina (50 μ g/ml) por 2 h. Una vez terminado el período de incubación, las células fueron lavadas con una solución de saponina 0.0025% y colocadas sobre medio de montaje para su observación en un microscopio confocal multifotónico Carl Zeiss LSM 780 NLO.

4.5 Viabilidad celular

Para evaluar si el colesterol, el etanol y el acetaldehído ejercían un efecto tóxico sobre los hepatocitos, se determinó la viabilidad celular por la técnica de cristal violeta. Los hepatocitos fueron lavados con PBS y fijados con metanol por 10 min a temperatura ambiente.

El metanol fue retirado y se adicionó una solución de cristal violeta al 0.5% por 10 min. Las células fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente se extrajo el colorante de las células con 200 μ L de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% (Bio-Rad) el cual se colocó en una placa de 96 pozos para leer a una absorbancia de 620 nm el cristal violeta presente en las células. La cantidad de hepatocitos viables fueron calculados en porcentaje, teniendo como referencia a las células control (CW).

4.6 Western blot

Para determinar el contenido de CYP2E1, PERK y la activación de eIF2 α en las diferentes condiciones experimentales se usó la técnica de Western blot. A continuación se describe paso a paso la técnica.

4.6.1 Extracción de proteína

Los hepatocitos fueron lavados con PBS y colectados con 200 μ L de buffer de lisis, que contenía M-PER (Pierce Chemical) y, un coctel de inhibidores de fosfatasa y proteasas (Roche). Se incubaron por un período de 15 min en hielo. El lisado obtenido fue centrifugado a 1700 xg por 10 min.

El sobrenadante, conteniendo las proteínas fue recuperado y cuantificado colorimétricamente utilizando el estuche comercial BCA (Pierce Chemical).

4.6.2 Electroforesis

4.6.2.1 Preparación de la muestra

Se utilizaron 100 μ g de proteína que fueron complementados con amortiguador de muestra que contenía Tris-HCl 0.1 M a pH 6.8, glicerol (J. T. Baker, México), SDS

al 20% (BioRad, EUA), 2 β -mercaptoetanol al 10% (BioRad, EUA) y azul de bromofenol al 1.0% (BioRad, EUA).

La muestra fue desnaturalizada a 95°C por 5 min y separada en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS 0.1 % en una cámara de electroforesis mini-Protean II (BioRad, EUA) a 120 V durante 90 min.

4.6.2.2 Transferencia

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Science) durante 120 min a 120 V en un sistema transblot (Biorad, USA), posteriormente la membrana fue bloqueada con 5% de leche descremada disuelta en TBS-Tween durante 1 h en agitación suave.

4.6.3 Detección de CYP2E1, PERK y p-eIF2

La membrana fue incubada con anticuerpos específicos (Tabla 1) durante toda la noche en agitación suave a 4°C, posteriormente fue lavada con TBS-Tween por 10 min (2 veces) y se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 1) correspondiente por 1 h finalmente se realizaron 2 lavados con TBS-Tween y un último solo con TBS por 5 min. Se usó actina para normalizar la carga.

La membrana fue revelada usando un agente quimioluminiscente comercial (Roche). Posteriormente se hizo un análisis densitométrico de las bandas observadas utilizando el software del fotodocumentador 28 Gel logic 1500 (Kodak, USA).

Tabla 1

Anticuerpo Primario	Marca y no. de catálogo	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
anti- CYP2E1	abcam (ab28146)	1:5,000	anti-conejo	1:8,000
anti-pelF2	Cell signaling (pelF2 α)	1:1,000	anti-conejo	1:8,000
anti-PERK	abcam (ab115617)	1:1,000	anti-conejo	1:8,000
Actina	Sigma (A3854)	1:10,000	-	-

4.7 Detección de proteínas oxidadas

Para determinar estrés oxidante, se utilizó el kit de detección de proteínas oxidadas Oxyblot de Millipore, y se siguió el protocolo del fabricante.

Se aisló y cuantificó la proteína como se describe en el punto 4.6.1

Se utilizaron 20 µg de proteína por cada muestra. Las muestras fueron derivatizadas a 2,4-dinitrofenilhidrazona por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10% por 1 h y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PVDF como se describió anteriormente.

La membrana PVDF fue incubada durante 1 h con el anticuerpo primario (1:150) que reconoce grupos carboxilos oxidados, terminado el tiempo de incubación se hizo un lavado con TBS-T por 10 min. Posteriormente se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario (1:300). La membrana PVDF fue lavada 2 veces con TBS-T por 10 min.

La membrana fue revelada usando un agente quimioluminiscente comercial (Roche). Posteriormente se hizo un análisis densitométrico de las bandas observadas utilizando el software del fotodocumentador 28 Gel logic 1500 (Kodak, USA).

4.8 Traslocación de ATF6

Para determinar si ATF6 se trasloca al núcleo bajo nuestras condiciones experimentales, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% por 10 min., posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1%.

Una vez permeabilizadas, las células fueron bloqueadas con albúmina 3% por 30 min. a temperatura ambiente.

Las células fueron incubadas toda la noche con anticuerpo primario anti-ATF6 (abcam 37149) diluido 1:200, y colocadas en una cámara húmeda a 4°C.

Terminado el período de incubación, las células fueron lavadas con PBS-Tween 0.05% por 5 min y bloqueadas nuevamente.

Las células fueron incubadas con anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 anti-conejo diluido 1:500 por 1 h, a partir de este momento el resto del procedimiento se realizó en oscuridad.

Finalmente las muestras fueron colocadas en medio de montaje que contenía DAPI y fueron observadas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO.

4.9 Actividad CYP2E1

Para medir la actividad del CYP2E1 bajo nuestras condiciones experimentales, primero fueron aisladas fracciones microsomales.

4.9.1 Obtención de fracciones microsomales

El cultivo celular fue lavado con PBS 24 h después de haber sido tratado con etanol o acetaldehído. Las células fueron colectadas en tubos Eppendorf con 1 mL de PBS y centrifugadas a 200 xg por 2 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue desechado y el botón celular fue resuspendido en 600 µL de un buffer de lisis que contenía 20 mM HEPES, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 250 mM de sacarosa y un coctel de inhibidores de proteasas, pH 7.4. Las células fueron resuspendidas vigorosamente con una jeringa de insulina, 5 ciclos (4 veces por ciclo) y mantenidas en hielo durante el proceso.

La suspensión fue centrifugada a 1,000 xg por 5 min a 4°C, el sobrenadante obtenido fue recuperado, colocado en tubos Eppendorf nuevos y centrifugado a 8,000 xg por 10 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante resultante fue transferido a tubos de ultracentrifuga (Beckman Optima™ TLX) que fueron balanceados previamente y centrifugados a 100,000 xg por 1 h a 4°C.

El sobrenadante obtenido fue desechado y el botón resuspendido en 30 μL de buffer de almacenamiento (contiene lo mismo que el buffer de lisis para microsomas con excepción de la sacarosa), posteriormente la proteína fue cuantificada colorimétricamente utilizando el estuche comercial BCA (Pierce Chemical). La proteína microsomal obtenida se utilizó en el siguiente paso del procedimiento.

4.9.2 Reacción enzimática

Se prepararon tubos de incubación (tubos Eppendorf 1.5 mL) que contenían 440 μL de buffer de ensayo (50 mM de fosfato de potasio, pH 7.4), 10 μL de *p*-nitrofenol (5 mM) y 25 μL de NADPH (20 mM). Se pre-incubaron a 37°C por 15 min y después se adicionaron 100 μg de proteína microsomal. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura por 1 h.

Para detener la reacción se adicionaron 100 μL de ácido tricloroacético (20%) y los tubos se colocaron en hielo por 2 min. La muestra fue centrifugada a 10,000 $\times\text{g}$ por 5 min, 500 μL del sobrenadante obtenido fueron transferidos a tubos Eppendorf que contenían 250 μL de NaOH (2 M), la mezcla fue agitada con vórtex y leída a 535 nm en el espectrofotómetro Beckman DU640.

Como control positivo se aislaron fracciones microsomales de animales tratados por 24 h con 0.4 μg de tetracloruro de carbono (CCl_4) por kilogramo de peso del animal, ya que está bien reportado que el CYP2E1 tiene la habilidad de biotransformar y activar una amplia variedad de compuestos tóxicos, entre los que se encuentra el CCl_4 , el benceno, el acetaminofén y otros compuestos halogenados (Lu y Cederbaum 2009).

Para determinar la actividad se consideró el coeficiente de extinción molar del producto formado (nitrocatecol, $9.53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$), la absorbancia neta de cada muestra y el tiempo de reacción. Los resultados fueron expresados en nanomoles de producto por hora por miligramo de proteína microsomal.

4.10 Determinación de colesterol en fracciones microsomales

Las células fueron lavadas y colectadas en tubos Eppendorf con 1 mL de PBS y se aislaron fracciones microsomales como se describió en el punto 4.9.1.

Se tomaron 100 μ L de la suspensión microsomal y se depositaron en tubos de ensayo que contenían 60 μ L de KOH (33%) y 600 μ L de etanol (95%); los tubos fueron agitados en un vórtex y colocados en baño maría (60°C) por 15 min. Posteriormente se añadieron 2 mL de hexano y 600 μ L de agua grado HPLC, los tubos fueron agitados nuevamente en un vórtex.

Se tomó 1 mL de la fase orgánica (hexano) y se colocó en nuevos tubos Eppendorf para dejarse secar con Speedvac Savant sc210a por 1 h, después se adicionaron 800 μ L de oftaldehído y 1 mL de ácido sulfúrico, los tubos fueron agitados con vórtex.

Se midió la absorbancia de la mezcla anterior a 550 nm. Los cálculos para determinar la cantidad de colesterol fueron realizados utilizando una curva patrón de colesterol.

4.11 Microscopía Electrónica de Transmisión

Para identificar los cambios morfológicos en las células, particularmente en el RE por efecto de los tratamientos, se realizó un análisis por microscopía electrónica de transmisión.

Las células fueron fijadas por 24 h con glutaraldehído al 3% a 4°C. El fijador fue retirado y las células fueron colectadas con 1mL de PBS en tubos Eppendorf.

Las células fueron centrifugadas a 200 xg por 2 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue retirado y el botón celular obtenido fue lavado cuidadosamente con PBS (5 veces) para retirar el exceso de glutaraldehído. Una vez fijadas, las muestras fueron teñidas con tetraóxido de osmio al 1% por 2 h. Posteriormente fueron sometidas a un proceso de deshidratación donde se utilizaron concentraciones crecientes de etanol (30 a 100%). Las muestras permanecieron 15 min en cada concentración de alcohol.

Como control positivo los hepatocitos fueron tratados con 10 µg/mL de tunicamicina por 24 h. Se usó tunicamicina porque genera ERE mediante la inhibición de la N-glicosilación. Al inhibir la N-glicosilación se altera la síntesis normal de proteínas en el RE generando ERE y eventualmente muerte celular (Dey et al., 2006)

Finalmente, las muestras fueron incluidas en resina epóxica y se hicieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor que fueron tratados con acetato de uranilo 2% durante 40 min y citrato de plomo 0.5% por 10 min. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EXII.

4.12 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres eventos independientes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism 5, utilizando el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba post hoc de Bonferroni, el nivel de significancia considerado fue de $p < 0.05$.

Tabla 2 Grupos analizados estadísticamente con su respectivo símbolo.

Símbolo *	
Grupos control	Grupo experimental
CW	HC
CWE	HCE
CWA	HCA

Símbolo &	
Grupo control	Grupo experimental
CW	CWE
	CWA

Símbolo #	
Grupos control	Grupo experimental
HC	HCE
	HCA

5 Resultados

5.1 Modelo de esteatosis

Para determinar esteatosis en nuestro modelo de estudio, se hicieron tinciones con rojo O para detectar lípidos neutros y tinciones con filipina para detectar colesterol.

El contenido de lípidos neutros y colesterol, se incrementó notablemente en el cultivo primario aislado de ratones que recibieron la dieta HC por 48 h en comparación con el cultivo aislado de animales que fueron alimentados con dieta CW (Fig.2).

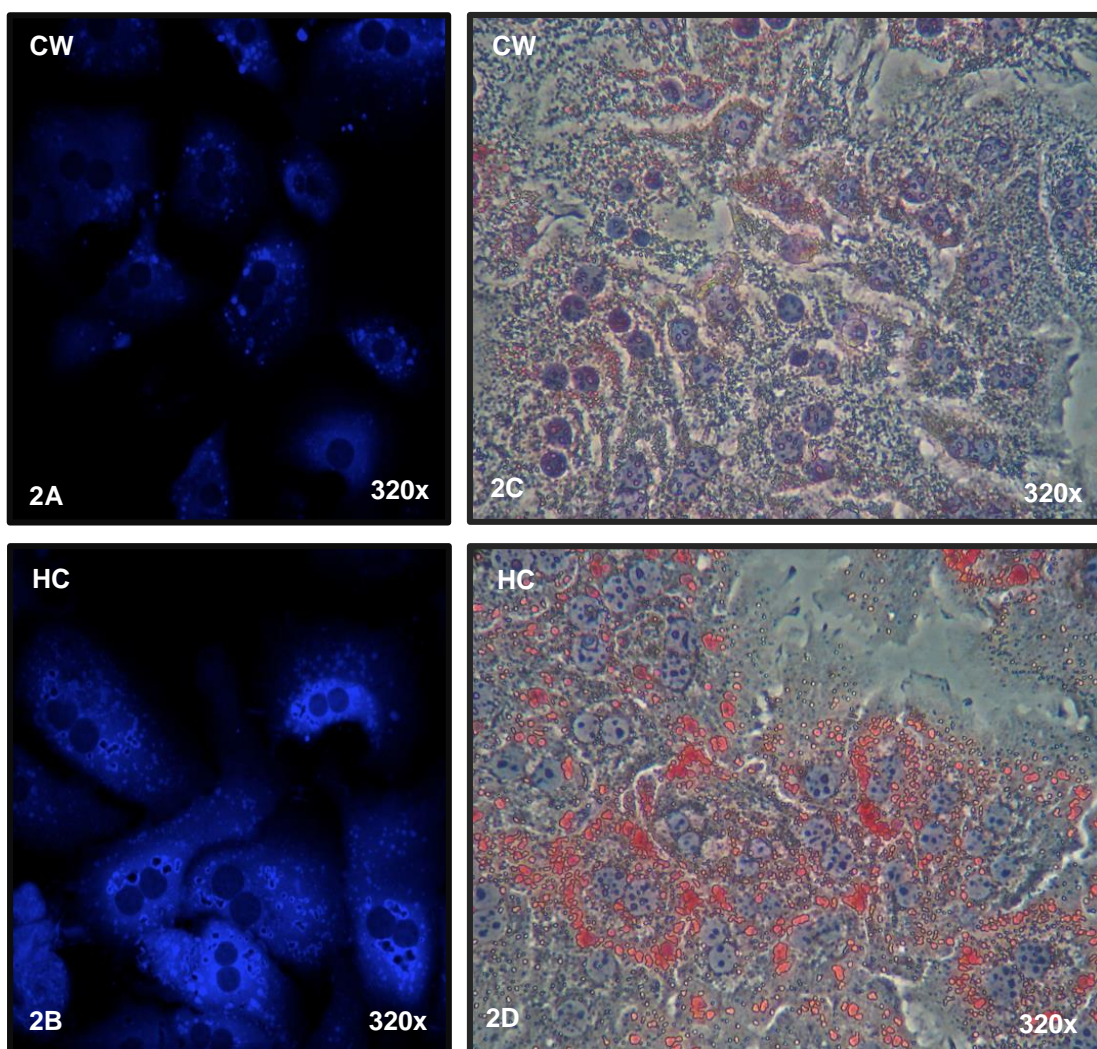


Fig. 2 Micrografías (32x) representativas del incremento de lípidos neutros y colesterol libre en cultivo primario por tratamiento con dieta HC por 48 h comparados con sus controles CW. A la izquierda determinación de colesterol libre por inmunofluorescencia (tinción con Filipina). A la derecha determinación de lípidos neutros por tinción con rojo O. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

5.2 El etanol y el acetaldehído potencian el daño celular generado por el colesterol.

Para determinar si el colesterol, el etanol y el acetaldehído ejercían un efecto tóxico sobre los hepatocitos, se realizaron pruebas de viabilidad con cristal violeta.

La viabilidad disminuyó significativamente, en un 26.3%, en hepatocitos aislados de ratones que recibieron la dieta HC por 48 h, con respecto a CW (Fig. 3A).

La exposición por 24 h a 100 mM de etanol (CWE) no modificó significativamente la viabilidad celular, sin embargo, su combinación con la dieta HC (HCE) sí, reduciéndola hasta un 69% (Fig. 3A).

El tratamiento por 24 h con 200 μ M de acetaldehído (CWA) disminuyó significativamente la viabilidad (hasta 78.7%) y su combinación con la dieta HC (HCA) la redujo al 65.9% (Fig. 3A).

Los cambios en la viabilidad celular estuvieron acompañados por alteraciones morfológicas. Los hepatocitos perdieron su estructura característica 24 h después de haber sido expuestos a etanol o acetaldehído, sin embargo los cambios más notorios se presentaron en aquellos que además recibieron la dieta HC previamente, pues se observaron hepatocitos redondeados y en su interior incrementó la cantidad de gotas de lípidos que al microscopio aparecen como puntos blancos brillantes (Fig. 3B).

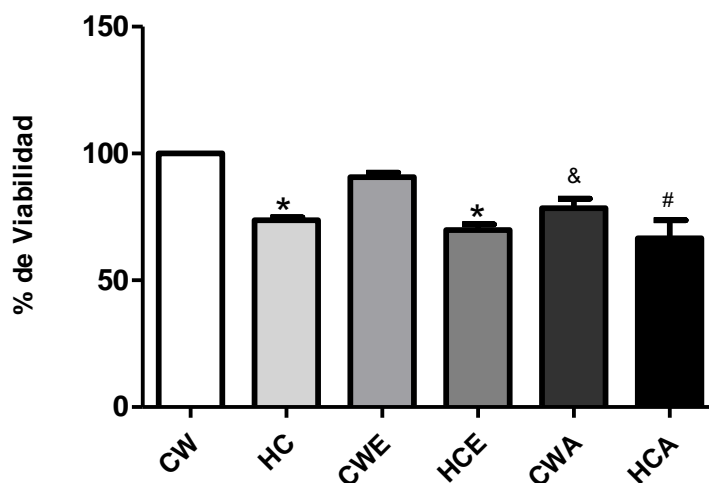


Fig. 3 A Gráfica con porcentajes de viabilidad celular en cultivo primario por cristal violeta. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a su control. &Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a CW. #Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a HC.

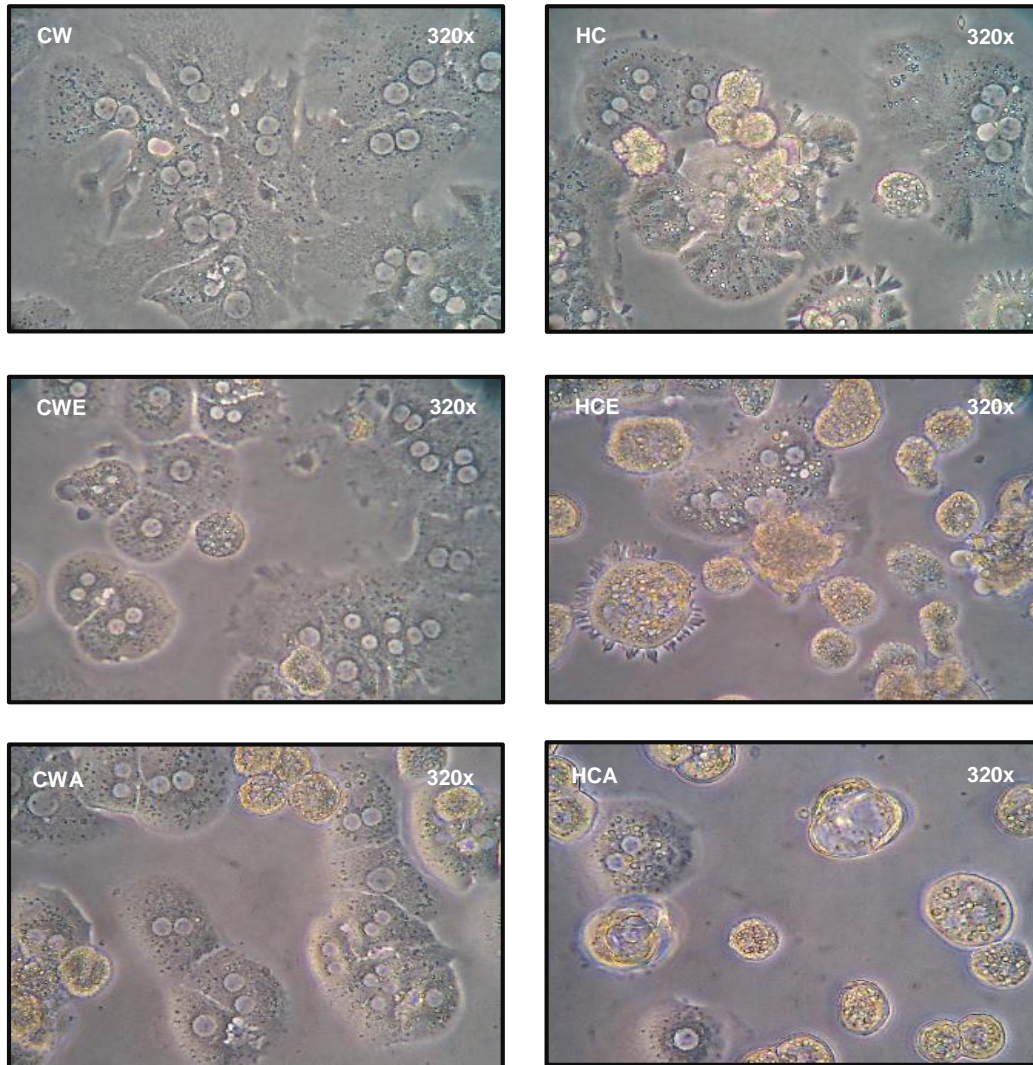


Fig. 3 B Micrografías (32x) en campo claro de cambios morfológicos en los hepatocitos 24 h después de ser expuestos a etanol o acetaldehído. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

CW: dieta CHOW por 48 h., **HC:** dieta HC por 48 h., **CWE:** dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE:** dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA:** dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído, **HCA:** dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído.

5.3 La dieta HC induce cambios en el contenido y la actividad de CYP2E1

Una característica clave del CYP2E1 es su alta capacidad de inducción (Aubert et al., 2011). Es bien conocido que la ingesta crónica de etanol induce su expresión (Song et al., 1996), de igual manera se ha reportado que las dietas altas en grasas tienen el mismo efecto, potenciando no solo su expresión sino también su actividad (Yun et al., 1992).

El contenido del CYP2E1 incrementó 0.60 veces con respecto al control (CW) en hepatocitos tratados con dieta HC por 48 h, mientras que la combinación con etanol reportó un incremento de 0.72 y la combinación con acetaldehído fue de 0.83 (HCE y HCA, respectivamente) (Fig. 4).

Los hepatocitos que fueron expuestos por 24 h a 100 mM de etanol o 200 μ M de acetaldehído no reportaron cambios significativos en el contenido de CYP2E1 (CWE y CWA respectivamente) (Fig. 4).

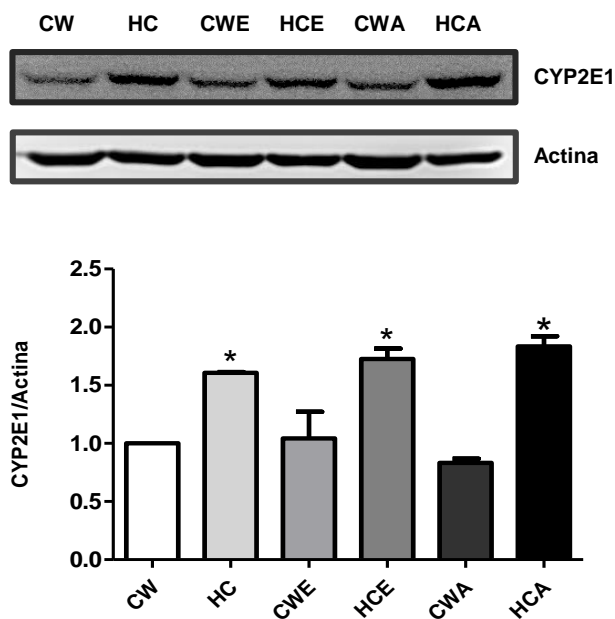


Fig. 4 Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de CYP2E1 por western blot. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a su control. **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído.

Para determinar la actividad de CYP2E1 se optó por cuantificar la formación de *p*-nitrocatecol a partir de *p*-nitrofenol. Es una de las técnicas mejor establecidas, ya que la producción de *p*-nitrocatecol es fácilmente medida por un ensayo espectrofotométrico (Phillips et al., 2006)

El tratamiento por 24 h con etanol (CWE) incrementó la actividad de CYP2E1, reflejándose en un aumento en la producción de nitrocatecol, de 1.23 nmol/hr/μg de proteína microsomal en ausencia de etanol (CW) a 4.8 nmol/hr/μg de proteína microsomal en presencia del tóxico (Fig. 5).

Un incremento similar (5 nmol/hr/μg de proteína microsomal de nitrocatecol) se observó en los hepatocitos con tratamiento HC, sin embargo no se presentó un efecto aditivo en combinación con etanol (HCE 5.3 nmol/hr/μg de proteína microsomal) (Fig. 5).

El tratamiento con acetaldehído o su combinación con la dieta HC no reportó cambios significativos en la producción de nitrocatecol (CWA y HCA respectivamente) (Fig. 5).

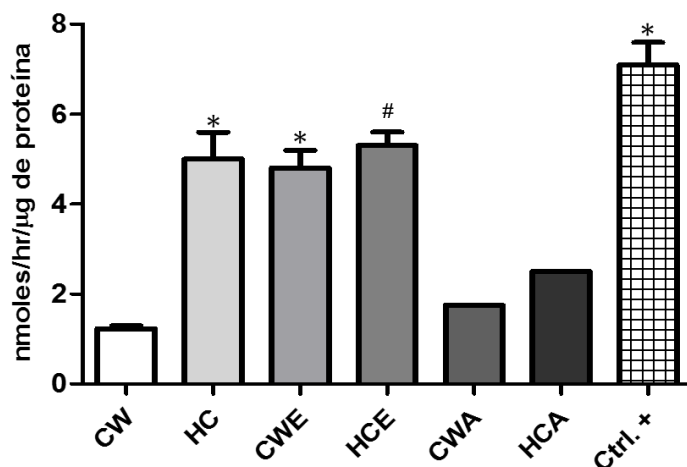


Fig. 5 Actividad enzimática de CYP2E1. Cuantificación de nitrocatecol por espectrofotometría. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a CW. #Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a HC.

CW: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído.

5.4 La sobrecarga de colesterol y la biotransformación del etanol generan estrés oxidante

Para determinar si hay estrés oxidante bajo nuestras condiciones experimentales se midió la cantidad de grupos carboxilo oxidados, a juzgar por la intensidad de las bandas en el Oxyblot de la Fig. 6, todos nuestros tratamientos reportaron incremento en la cantidad de grupos carboxilo oxidados (CWE: 4.26, CWA: 4.95, HCE: 5.38 y HCA: 5.4 veces con respecto al control) siendo los hepatocitos aislados de ratones que recibieron la dieta HC por 48h los que reportaron el mayor contenido de grupos carbonilo (6 veces con respecto a CW) (Fig. 6)

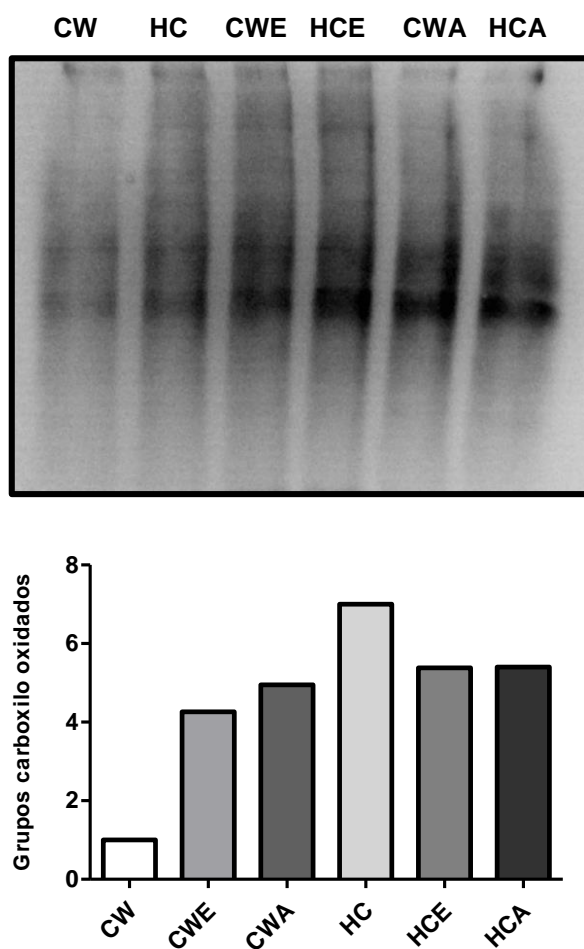


Fig. 6 Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de grupos carboxilo por Oxyblot (Un solo experimento). **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a su control.

5.5 La dieta HC induce cambios morfológicos en RE

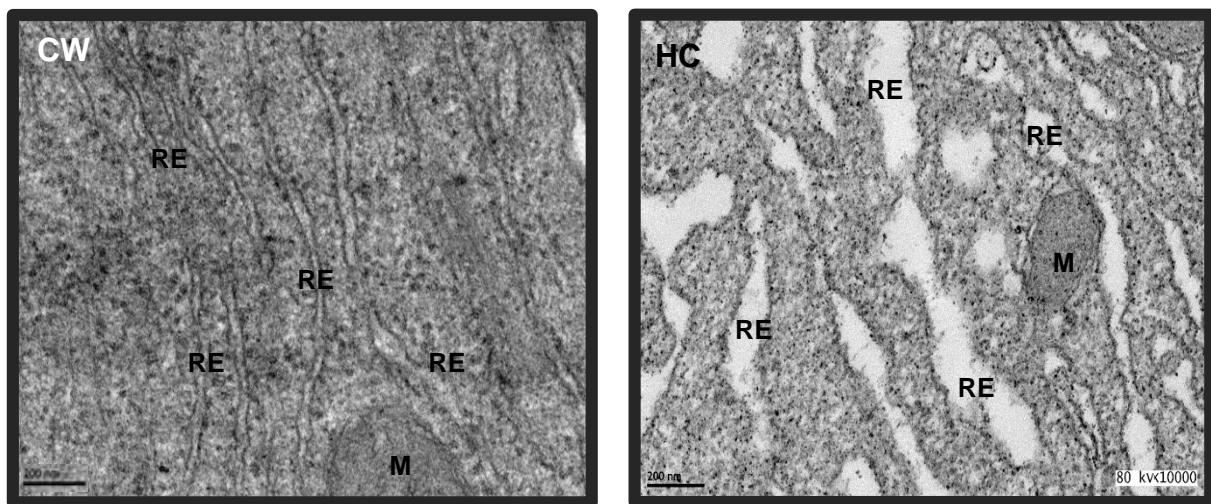
Para confirmar ERE bajo nuestras condiciones experimentales se evaluaron los cambios morfológicos en RE por microscopía electrónica de transmisión.

Los hepatocitos control (CW) presentaron la arquitectura típica del RE: un sistema de cisternas aplanadas que se extienden desde la periferia del núcleo hasta el citoplasma. Sin embargo, en el caso de los hepatocitos que recibieron la dieta HC por 48 h se presentaron modificaciones sustanciales, las cisternas se expandieron, aumentando notoriamente el tamaño, la forma y la disposición del organelo.

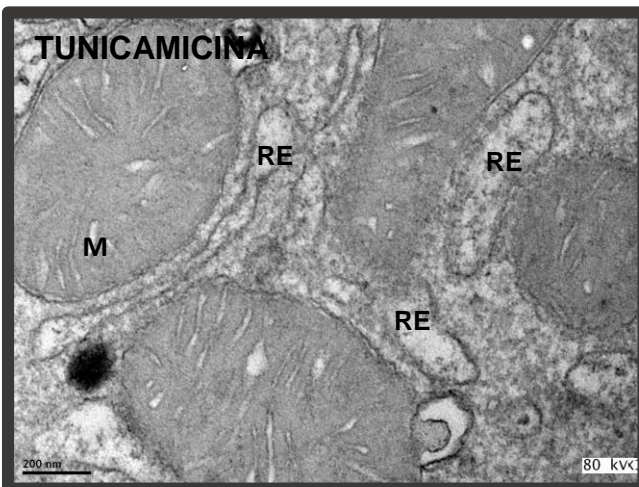
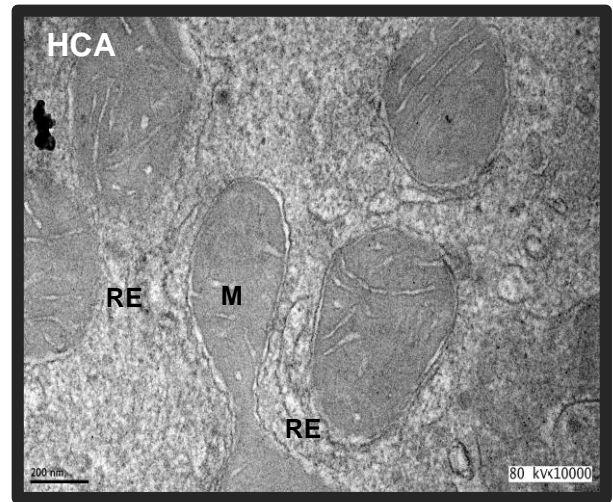
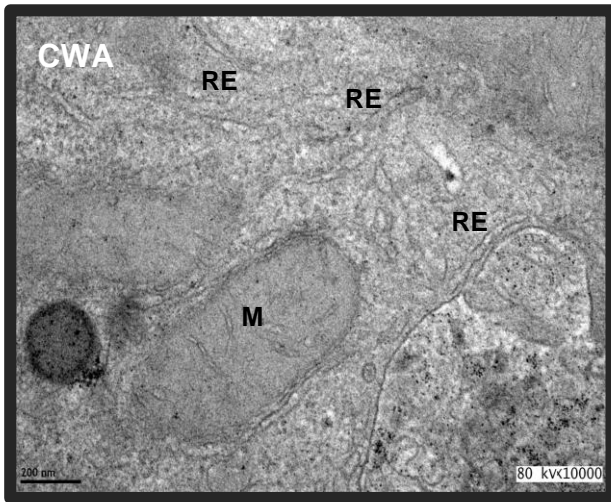
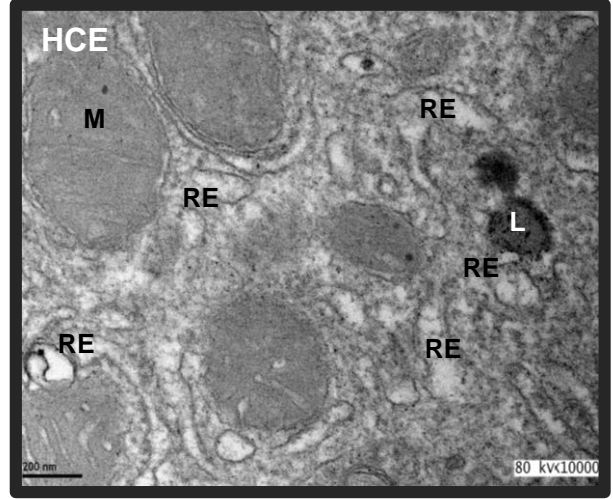
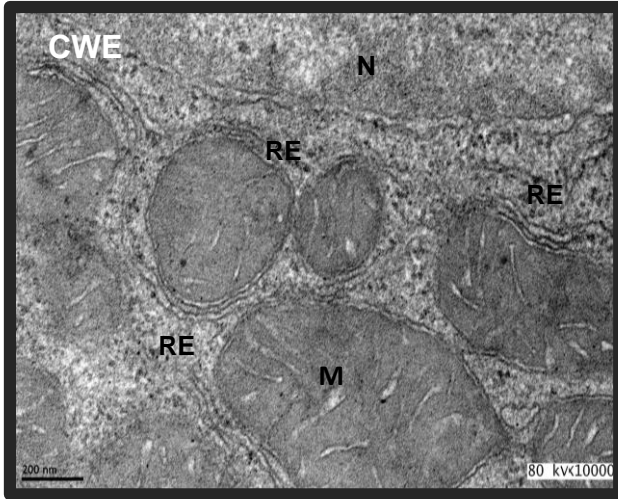
En el caso de la exposición a etanol en combinación con la dieta HC (HCE), se observó un alto número de cisternas circulares, y algunas de ellas se observaron asociadas a lisosomas (Panel 1).

Los hepatocitos expuestos a acetaldehído (CWA) y su combinación con la dieta HC (HCA) no presentaron cambios notables en la morfología del RE. Sin embargo, se observaron cambios asociados a la mitocondria, particularmente en el tratamiento HCA, donde se observaron mitocondrias en fisión (Panel 1).

Como control positivo para ERE, el cultivo primario de hepatocitos fue tratado con 10 µg/ml de tunicamicina durante 24 h.



Panel 1



Panel 1 (página 28-29) Cambios morfológicos del RE evaluados por microscopía electrónica de transmisión en cultivo primario. Imágenes representativas de dos experimentos independientes. **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 µM de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 µM de acetaldehído. Control positivo: tratamiento con tunicamicina por 24 h (10µg/mL). M: mitocondria, RE: retículo endoplásmico, N: núcleo, L: lisosomas.

5.6 La respuesta de los sensores de ERE bajo nuestras condiciones experimentales

5.6.1 PERK y p-eIF2 α

Para determinar ERE se evaluó el contenido de PERK y la fosforilación de p-eIF2 α bajo las diferentes condiciones experimentales. La activación de estas proteínas es clave en el restablecimiento de la función del RE, ya que tienen como objetivo detener temporalmente la síntesis de proteínas y así evitar su acumulación en el lumen del RE.

A juzgar por el análisis densitométrico del western blot, el contenido de PERK incrementó 1.5, 1 y 1.3 veces con respecto al control en presencia de la dieta HC, el tratamiento con etanol (CWE) y la combinación de ambos (HCE) respectivamente. El tratamiento con acetaldehído y su combinación con la dieta HC no reportaron cambios significativos (Fig. 7).

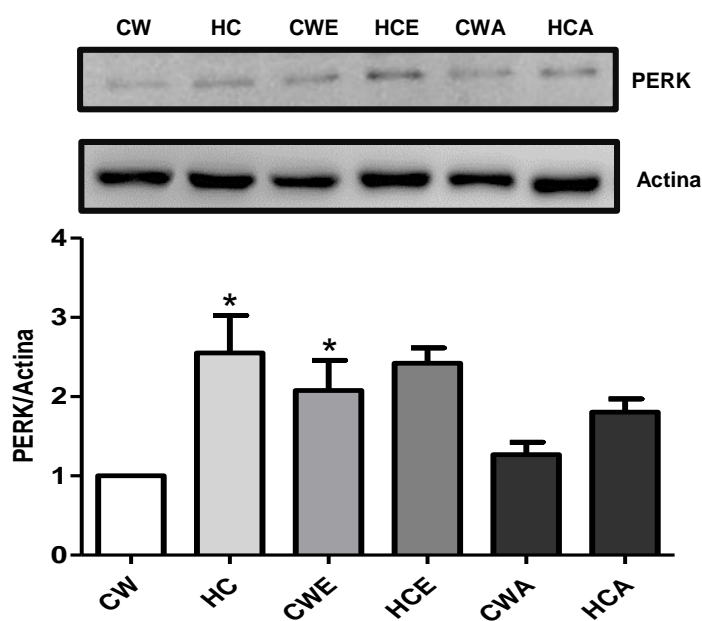


Fig. 7 Análisis densitométrico e imagen representativa del contenido de PERK por western blot. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a CW. **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído.

Contrario a las expectativas, la fosforilación de p-eIF2 α disminuyó significativamente en los hepatocitos aislados de ratones tratados con dieta HC y su combinación con etanol o acetaldehído (HCE y HCA, respectivamente) no representó un efecto aditivo (Fig. 8).

Los tratamientos con etanol (CWE) y acetaldehído (CWA) no mostraron cambios en la fosforilación de eIF2 α (Fig. 8).

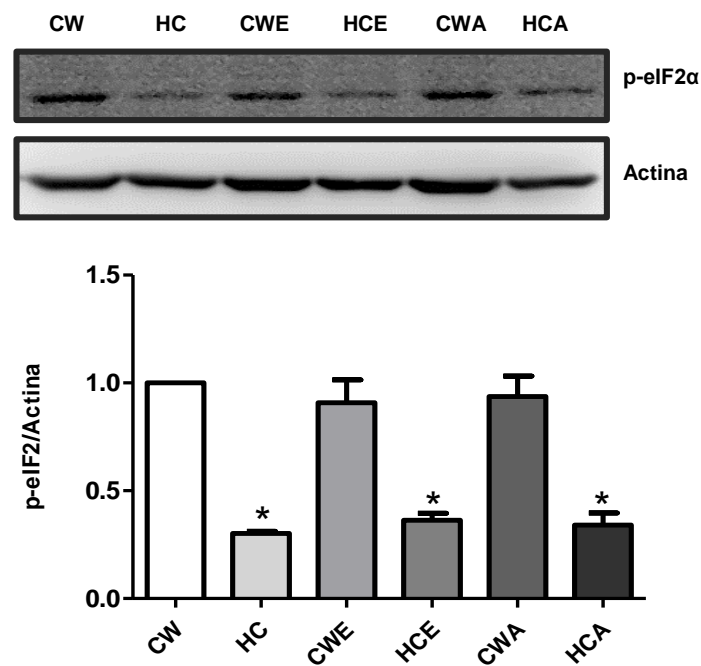
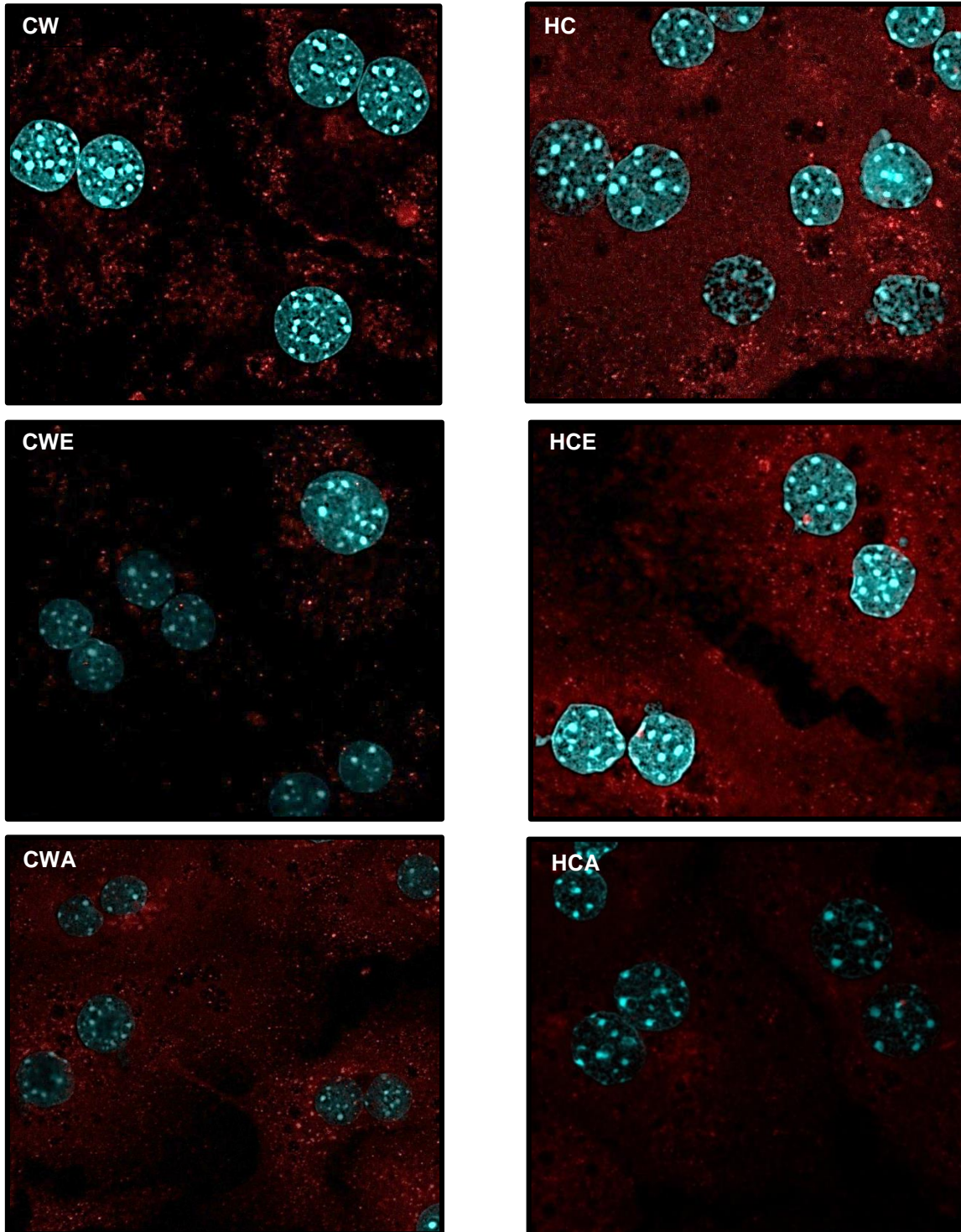


Fig. 8 Análisis densitométrico e imagen representativa de la fosforilación de p-eIF2 α por western blot. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a su control. **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μ M de acetaldehído.

5.6.2 Traslocación de ATF6

Se evaluaron los cambios en la localización nuclear de ATF6 para determinar ERE, su traslocación al núcleo favorece la transcripción de genes que codifican chaperonas como GRP78 y GRP94.

Contrario a lo que especulábamos el análisis por microscopía confocal demostró que los cambios en la localización de ATF6 al núcleo no fueron significativos bajo ninguno de los tratamientos (Panel 2).



Panel 2 Localización de ATF6 nuclear por inmunofluorescencia. Dapi (Cian) para núcleo y Alexa 647 para ATF6 (rojo). Imágenes representativas de tres experimentos independientes (40x). **CW**: dieta CHOW por 48 h., **HC**: dieta HC por 48 h., **CWE**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **HCE**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 100 mM de etanol, **CWA**: dieta CHOW por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído, **HCA**: dieta HC por 48 h. más 24 h con 200 μM de acetaldehído.

5.7 La dieta HC incrementa el contenido de colesterol en fracciones microsomales

Debido a que los sensores de ERE no respondieron como se esperaba decidimos cuantificar el colesterol presente en las fracciones microsomales de animales tratados con dieta HC por 48 h, esto como una posibilidad de que el colesterol estuviera afectando su correcta activación.

Los resultados demostraron que el depósito de colesterol incrementó 1.8 veces en fracciones microsomales aisladas de ratones tratados por 48 h con dieta HC con respecto al control (Fig. 9).

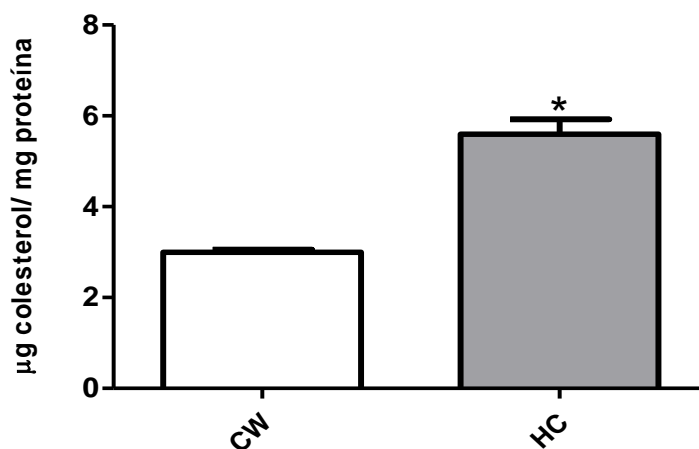


Fig. 9 Determinación de colesterol en fracciones microsomales de tejido hepático por OPA. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a CW. **CW**: dieta CHOW por 48h., **HC**: dieta HC por 48h. *Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a CW.

6 Discusión

6.1 Teoría de las dos agresiones “two-hits”

En 1998 James y Day propusieron la hipótesis de dos agresiones o como se conoce de “two-hits” para explicar la progresión en la patogénesis de NAFLD. De acuerdo con esta hipótesis, la esteatosis representa la primera agresión, la cual a su vez incrementa la susceptibilidad al daño de una segunda agresión como la exposición a ciertos fármacos, virus o productos químicos como el alcohol, que eventualmente llevan a inflamación, daño mitocondrial, ERE y muerte celular, favoreciendo la progresión a estadios más severos de daño hepático como esteatohepatitis y hepatocarcinoma (Yilmanz et al., 2012; Gentile y Pagliassotti, 2008).

Marí y colaboradores reportaron en 2006 que la esteatosis generada por una sobrecarga de colesterol causa daño hepático por disfunción mitocondrial y procesos inflamatorios, teniendo como resultado un hígado sensibilizando a segundas agresiones. La dieta HC no solo induce la acumulación de colesterol en los hepatocitos sino que también promueve la síntesis y almacenamiento de lípidos neutros como mecanismo compensatorio para manejar el exceso de colesterol en la célula.

En nuestro estudio se comprobó que la sobrecarga de colesterol (Fig. 2 B) genera esteatosis, pues se observó la acumulación de triglicéridos en el cultivo primario de hepatocitos (Fig. 2 D). Se ha reportado que la acumulación de lípidos genera estrés oxidante en los hepatocitos (Wei et al., 2006). Por otra parte, el estrés oxidante se considera como uno de los principales mecanismos de toxicidad asociado a la exposición a etanol (Lu y Cederbaum, 2009), mientras que al producto de su biotransformación, el acetaldehído, se le considera aún más tóxico (Farfán et al., 2009) debido a su capacidad de formar aductos y producir daño mitocondrial. Las pruebas de viabilidad celular revelaron que tanto la exposición a dosis agudas de etanol como de acetaldehído potenciaron el daño tóxico generado por la acumulación de lípidos debido a la dieta HC (Fig. 3), siendo el colesterol la primera agresión que sensibiliza a los hepatocitos ante la exposición a etanol o acetaldehído.

6.2 El CYP2E1 y estrés oxidante

El CYP2E1 es una enzima altamente inducible por sus sustratos, la mayoría de ellos son compuesto polares y de bajo peso molecular. El etanol, tanto en dosis agudas como crónicas, puede incrementar su contenido proteico y/o su actividad (Lu y Cederbaum, 2009).

Aunque el incremento en el contenido de CYP2E1 fue discreto bajo las diferentes condiciones experimentales (Fig. 4), estas observaciones no necesariamente correspondieron con su patrón de actividad (Fig. 5), de hecho el ensayo enzimático que se realizó, confirmó, por un lado, que el etanol indujo la actividad de CYP2E1 y además demostró que la dieta HC por sí sola tenía un efecto similar sobre su actividad. Es interesante destacar este hallazgo, ya que está bien documentado que el CYP2E1 puede oxidar ácidos grasos (Collom et al., 2007), los cuales se ven incrementados en un cuadro de esteatosis (Rolo et al., 2012).

La combinación de la dieta HC con etanol (HCE) no produjo un efecto aditivo sobre la actividad del CYP2E1. La inhibición por sustrato es uno de los mecanismos más comunes de regulación en la actividad enzimática, se ha reportado que muchos de los sustratos del CYP2E1 se ajustan a este sistema de regulación (Collom et al., 2007). Teniendo en cuenta que tanto los ácidos grasos que se generan en el hepatocito como consecuencia de la sobrecarga de colesterol como el etanol son sustratos del CYP2E1, es probable que los sitios activos de la enzima tiendan a saturarse y la actividad enzimática se detenga, reflejándose en la producción de nitrocatecol: 5.3 nmoles/hr/ μ g de proteína microsomal de nitrocatecol para el tratamiento HCE, muy similar al de las fracciones microsomales aisladas de animales que recibieron la dieta HC por 48 h (HC) con 5 nmoles/hr/ μ g de proteína microsomal de nitrocatecol y a las que solo fueron expuestas por 24 h a etanol (CWE) (4.85 nmoles/hr/ μ g de proteína microsomal de nitrocatecol).

Dado que el CYP2E1 requiere de oxígeno molecular para oxidar a sus sustratos, asociada a su actividad se encuentra la producción de EROS como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (White 1991), lo cual, coloca al CYP2E1 como

molécula clave en la generación de estrés oxidante. Para determinar estrés oxidante por efecto de los tratamientos descritos se utilizó la inmunodetección de grupos carbonilo. Los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) se producen en las cadenas laterales de proteínas, especialmente en aminoácidos como; prolina, arginina, lisina, y treonina cuando éstos son oxidados.

Nuestros resultados demostraron que todos los tratamientos generan estrés oxidante (Fig. 6). Se sabe que la principal vía por la cual el etanol genera estrés oxidante es a través de la inducción de la actividad del CYP2E1, pues como se mencionó anteriormente hay un incremento en la producción de EROS (Lu y Cederbaum, 2009), mientras que el mecanismo que sigue el acetaldehído, más bien, está asociado con disfunción mitocondrial. (Farfán et al., 2009).

La contribución que tiene la dieta HC para generar estrés oxidante en este contexto, es incluso mayor que la del etanol o el acetaldehído. En los últimos años nuestro grupo de investigación ha reportado estrés oxidante por tratamiento con dieta hipercolesterolemica, ratones de la cepa C56BL/6 que fueron alimentados por 48 h con dieta HC presentaron un incremento en la producción de EROS y proteínas oxidadas (Domínguez Mayra, Tesis de Maestría, 2011).

Otro evento que ha sido implicado en la progresión a NASH es la oxidación de lípidos (Sumida et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que se genera lipoperoxidación mediada por EROS (Niki 2009), en pacientes con NASH se detectó la presencia de marcadores sistémicos de estrés oxidante como malondialdehído (MDA), sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y LDL oxidado (Zein et al., 2011; Oliveira et al., 2005).

Además se ha reportado en modelos murinos con NASH y en ratones ob/ob el abatimiento de la defensa antioxidante y la detección de bajos niveles de glutatión mitocondrial (Llacuna et al., 2011; Caballero et al., 2010). El abatimiento en los niveles de glutatión hepático puede deberse en parte a la disminución en la síntesis de S-adenosilmetionina, el principal donador de grupos metilo en hígado y precursor de glutatión (García-Ruíz et al., 2006; Martínez-Chantar et al., 2002). Se ha observado que ratones deficientes de glicina N-metiltransferasa, la enzima

responsable de la degradación de S-adenosilmetionina en el hígado, tienden a desarrollar esteatosis, NASH y fibrosis (Martínez-Chantar et al., 2008).

Aunque los tratamientos con etanol y acetaldehído en combinación con la dieta HC (HCE y HCA respectivamente) también generan daño oxidante, no se observó un efecto aditivo por efecto de los tóxicos (el etanol y el acetaldehído) (Fig. 6), debido a que la dieta HC induce respuesta antioxidante, generando un efecto compensatorio transitorio (Domínguez Mayra, Tesis de Maestría, 2011).

6.3 ¿El estrés oxidante induce estrés de retículo endoplásmico?

Estudios recientes han asociado al estrés oxidante como causa de ERE en diferentes tipos celulares. En 2014, Farrukh y colaboradores reportaron que la exposición a rayos UV genera estrés oxidante en fibroblastos, resultando en un vaciado de las pozas de calcio en el RE, lo cual induce ERE. Dietas altas en fructuosa provocan estrés oxidante y apoptosis, además de ERE (Ren et al., 2013). Otros estudios hechos en ratones infectados con *Toxoplasma gondii* han reportado que los trofoblastos presentan ERE debido al incremento de especies reactivas de oxígeno (Xu et al., 2012). En nuestro diseño experimental, habiendo comprobado que todos los tratamientos generaron estrés oxidante, lo siguiente fue determinar el ERE, para lo cual evaluamos la morfología del RE y la activación de las vías PERK-peIF2 y la localización de ATF6.

Cuando PERK censa ERE, incrementa su actividad de cinasa y fosforila al factor de iniciación de la traducción eIF2. Este evento detiene temporalmente la síntesis de proteínas evitando que se sigan acumulando proteínas mal plegadas en el lumen del retículo. Nuestros resultados demostraron que el contenido de PERK incrementó en presencia del etanol (CWE), la dieta HC (HC) y la combinación de ambos (HCE) (Fig. 7). Los tratamientos con acetaldehído (CWA y HCA) no representaron cambios significativos en el contenido de este sensor, lo cual nos hace suponer que el acetaldehído sigue otro mecanismo para generar ERE, probablemente asociado a la mitocondria (Lluis et al., 2003).

El siguiente paso fue comprobar la actividad de PERK evaluando la fosforilación de eIF2 α . Contrario a lo esperado, los tratamientos y particularmente aquellos que provenían de animales tratados con la dieta HC (HC, HCE y HCA) presentaron una notoria disminución en la fosforilación de eIF2 α (Fig. 8), sugiriendo que PERK no estaba señalizando adecuadamente. Esto nos condujo a plantearnos dos interrogantes: ¿Realmente las condiciones experimentales estaban causando ERE?, ¿Qué ocasiona que PERK no señalice adecuadamente? Como primera medida se decidió monitorear otra de las vías de ERE, la localización nuclear de ATF6.

Durante eventos que inducen ERE, ATF6 migra al aparato de Golgi donde se rompe proteolíticamente para liberar el dominio NH₂ terminal, el cual entra al núcleo y ejerce su función como factor de transcripción. ATF6 promueve la transcripción de al menos 3 genes GRP78, GRP94 y calnexina que codifican proteínas chaperonas que restauran el plegamiento de proteínas en el lumen del RE (Bravo et al., 2013).

Los análisis realizados por microscopia confocal no revelaron cambios significativos sobre la localización nuclear de ATF6 bajo ninguna de las condiciones experimentales (Panel 2), por lo tanto, evaluar el estado que guardaban los sensores de estrés PERK-peIF2 α y ATF6 no era suficiente para aclarar las interrogantes.

Para corroborar ERE bajo las distintas condiciones experimentales se evaluaron los cambios en el RE. Se sabe que el ERE se caracteriza por la presencia de alteraciones morfológicas en la forma y tamaño de este organelo (Bravo et al., 2013).

Las micrografías mostraron que el tratamiento con dieta HC por 48 h indujo una marcada expansión del RE, comparadas con las células control que presentaron la arquitectura propia del RE, es decir, un sistema de cisternas aplanadas que van desde la periferia del núcleo hasta el citoplasma (Panel 1).

La combinación de la dieta HC con el etanol (HCE) también promovió cambios en la estructura del retículo, las cisternas se tornaron redondas y además se observó

la presencia de lisosomas, sugiriendo que podrían estarse llevando a cabo procesos de autofagia. De hecho, se sabe que la autofagia puede emerger como un mecanismo de defensa ante el daño generado por la exposición a dosis agudas de etanol (Ding et al., 2010). La morfología de la mitocondria también se vio alterada, en particular por la exposición a acetaldehído (CWA y HCA), donde se observan mitocondrias hinchadas y crestas mitocondriales poco definidas (Panel 1). De manera particular, con el tratamiento HCA se observan mitocondrias alargadas, que sugieren procesos de fisión. Recientemente se han documentado alteraciones en la morfología y función mitocondrial por exposición a etanol (Han et al., 2012). Estos hallazgos colocan al daño hepático por exposición a alcohol como una patología compleja que no solo involucra al RE sino también a otros organelos como la mitocondria, debido a la estrecha dinámica que guarda el RE con este organelo. Interesantemente, un estudio reciente señala que la acumulación de colesterol en mitocondria está asociada con el incremento en la expresión de proteínas de membrana de retículo asociadas a mitocondrias. Los resultados obtenidos revelaron que la expresión de estas proteínas favorece la translocación del colesterol de RE hacia mitocondria. Otros hallazgos señalaron que, el ERE promueve la acumulación de colesterol en mitocondria conduciendo a la disminución de glutatión mitocondrial (Barbero-Camps et al., 2014), estos resultados nos confirman la relación cercana que guarda el RE con la mitocondria.

6.4 La sobrecarga de colesterol y su efecto sobre los sensores de estrés de retículo endoplásmico

Después de comprobar por microscopía electrónica de transmisión que los tratamientos generan ERE, restaba comprender porque los sensores de estrés no estaban señalizando adecuadamente. Está bien documentado que el incremento de colesterol en las membranas biológicas puede modificar sus propiedades dinámicas (Coll et al., 2003; Gimpl et al., 1997; Rouslin et al., 1982).

En 2006, Marí y colaboradores demostraron que el depósito de colesterol libre en la mitocondria disminuye la fluidez de la membrana mitocondrial y los niveles de

mGSH, también consideran que el mGSH es un factor crítico en el desarrollo de la esteatohepatitis ya que sensibiliza a los hepatocitos a las citocinas proinflamatorias. Datos del mismo grupo (Almansa et al., 2009) han demostrado la existencia de alteraciones en la homeostasis del glutatión y el colesterol en mitocondrias de cerebro de ratas tratadas con etanol de forma crónica.

Otros estudios han demostrado que el colesterol altera la fluidez de la membrana del RE, confiriéndole rigidez e inhibiendo cambios conformacionales de las enzimas que están embebidas en él, promoviendo ERE (Tabas 2010). Fue por ello que determinar la cantidad de colesterol presente en RE fue crucial para entender la falta de respuesta de los sensores de estrés. La cuantificación de colesterol en fracciones microsomales reveló un incremento de casi el doble de colesterol en aquellos animales que recibieron la dieta HC por 48 h (Fig. 9), esto nos hace suponer que los sensores de estrés al ser proteínas embebidas en las membranas del RE son sensibles a cambios en su entorno lipídico que afectan su correcto funcionamiento, probablemente a través de la inhibición de cambios conformacionales esenciales para su adecuada señalización. Esto provee una posible explicación en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

7 Conclusiones

Los hepatocitos de ratones tratados con una dieta alta en colesterol por 48 h presentaron esteatosis (Fig. 2) y estrés oxidante (Fig. 6), hecho que coincidió con el incremento en la actividad (Fig. 5) y el contenido de CYP2E1 (Fig. 4), lo cual nos indica, que el estrés oxidante generado por la dieta HC podría estar mediado por el CYP2E1.

Los datos sugieren que el estrés oxidante producido por una sobrecarga de colesterol genera ERE (Panel 1), a su vez este incremento de colesterol en RE (Fig. 9) evitó que los sensores de estrés PERK-p ϵ IF2 (Fig. 7 y 8) y ATF6 (Panel 2) respondieran adecuadamente.

El etanol potencia el daño generado inicialmente por la dieta HC, induciendo eventos de muerte celular (Fig. 3 A) posiblemente a través de autofagia (Panel 1).

Los resultados demostraron que el acetaldehído genera daño hepático pues se observó la mayor disminución en la viabilidad celular (Fig. 3 A), a través de un mecanismo distinto al ERE, que más bien podría estar relacionado con disfunción mitocondrial y estrés oxidante.

Bibliografía

- Almansa I, Fernández A, García-Ruiz C, Muriach M, Barcia JM, Miranda M, Fernández-Checa JC, Romero FJ. Brain mitochondrial alterations after chronic alcohol consumption. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2009; 65(3):305-12.
- Aubert J, Begriche K, Nockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and Research in hepatology and Gastroenterology* 2011; 35(10):630-7.
- Baffy, G., E. M. Brunt and S. H. Caldwell. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *Journal of Hepatology* 2012; 56(6):1384-91.
- Barbero-Camps E, Fernández A, Baulies A, Martínez L, Fernández-Checa JC, Colell A. Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Amyloid β Neurotoxicity via Mitochondrial Cholesterol Trafficking. *The American Journal of Pathology* 2014; 184(7):2066-81.
- Bravo R, Parra V, Gática D, Rodríguez AE, Torrealba N, Paredes F, Zhao V. Wang, et al., Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2013; 227-250.
- Caballero, F.; Fernández, A.; Matías, N.; Martínez, L.; Fucho, R.; Elena, M.; Caballeria, J.; Morales, A.; Fernández-Checa, J. C.; García-Ruiz, C. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(24):18528-36.
- Chen Q, Galleano M, Cederbaum AI. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing human cytochrome P-4502E1. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; (4):782-4.

- Coll O, Colell A, García-Ruiz C, et al. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 2003; 38(3):692-702.
- Collom L. S, Laddusaw M. R, Burch M. A, Petr Kuzmic, Martin D. Perry, Jr., and Grover P. Miller. CYP2E1 Substrate Inhibition. Mechanistic interpretation through an effector site for monocyclic compounds. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 283(6):3487-96.
- Dey A, Kessova I, Cederbaum AI. Decreased protein and mRNA expression of the ER stress proteins GRP78 and GRP94 in HepG2 cells over-expressing CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006; 447(2):155-66.
- Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, Lu B, Stolz DB, Clemens DL, Yin XM. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139(5):1740-52.
- Domínguez Mayra. Tesis de maestría: Efecto protector del HGF en cultivo primario de hepatocitos de ratones alimentados con una dieta aterogénica 2011.
- Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez Quiroz LE, Königsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortíz V, Hernández E, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biology and Toxicology* 2009; 25(6):599-609.
- Farrukh Mufti R, Ul A. Nissar, Quadri Afnan, Rather A. Rafiq, Love Sharma, Shajrul Amin, Peerzada Kaiser, Parduman R. Sharma, Sheikh A. Tasduq. Oxidative stress mediated Ca²⁺ release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells. *Journal of Dermatological Science* 2014; 75(1):24-35.
- Feierman DE, Cederbaum AI. Role of cytochrome P-450 IIE1 and catalase in the oxidation of acetonitrile to cyanide. *Chemical Research in Toxicology* 1989; 2(6):359-66.
- García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of

mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 94(1):193-201.

- García-Ruiz, C, Fernández-Checa, J. C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21 Suppl 3:S3-6.
- Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2008; 19(9):567-76.
- Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F. Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*. 1997; 36(36):10959-74.
- Gómez-Quiroz LE, Bucio L, Souza V, Escobar C, Farfán B, Hernández E, Konigsberg M, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC. Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide. *Hepatology Research* 2003; 26(2):134-141.
- Gómez-Quiroz LE, Factor M. V, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner A. E, and Thorgeirsson S. S. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(21):14581-9.
- Gómez-Quiroz LE, Paris R, Lluís JM, Bucio L, Souza V, Hernández E, Gutiérrez M, Santiago M, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC. Differential modulation of interleukin 8 by interleukin 4 and interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver International* 2005; 25(1):122-30.
- Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; 58(3):693-700.
- Gutierrez-Ruiz MC, Gomez Quiroz LE, Hernandez E, Bucio L, Souza V, Llorente L, Kershenobich D. Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells. *Israel Medical Association Journal* 2001; 3(2):131-6.

- Hager L, Li L, Pun H, Liu L, Hossain MA, Maguire GF, Naples M, Baker C, Magomedova L, Tam J, Adeli K, Cummins CL, Connelly PW, Ng DS. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency protects against cholesterol-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in mice. *The Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(24):20755-68.
- Han D, Ybanez MD, Johnson HS, McDonald JN, Mesropyan L, Sancheti H, Martin G, Martin A, Lim AM, Dara L, Cadenas E, Tsukamoto H, Kaplowitz N. Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice: biogenesis, remodeling, and functional alterations. *Journal of Biological Chemistry* 2012. 287(50):42165-79.
- Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124(5):1488-99.
- Llacuna L.; Fernández A.; Montfor, C.V.; Matías N.; Martínez, L.; Caballero, F.; Rimola, A.; Elena, M.; Morales, A.; Fernández-Checa, J. C.; García-Ruiz, C. Targeting cholesterol at different levels in the mevalonate pathway protects fatty liver against ischemia–reperfusion injury. *Hepatology* 2011; 54(5):1002-10.
- Lluís JM, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology* 2003; 709:719-722.
- Lluís JM. Tesis de doctorado: Relevancia del acetaldehído, la hipoxia y la mitocondria en la hepatopatía alcohólica 2004.
- Lu Y. and Cederbaum AI. CYP2E1 and Oxidative Liver Injury by Alcohol. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(5): 723–738.
- Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC and García-Ruiz G. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism* 2006; 4(3):185-98.
- Martínez-Chantar, M. L.; García-Trevijano, E. R.; Latasa, M. U.; Pérez-Mato, I.; Sánchez del Pino, M. M.; Corrales, F. J.; Avila, M. A.; Mato, J. M. Importance of

a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76(5):1177S-82S.

- Martínez-Chantar, M. L.; Vázquez-Chantada, M.; Ariz, U.; Martínez, N.; Varela, M.; Luka, Z.; Capdevila, A.; Rodríguez, J.; Aransay, A. M.; Matthiesen, R.; Yang, H.; Calvisi, D. F.; Esteller, M.; Fraga, M.; Lu, S. C.; Wagner, C.; Mato, J. M. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2008; 47(4):1191-9.
- Montero J, Mari M, Colell A, et al. Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. *Biochimistry Biophysics Acta* 2010; 1797(6-7):1217-24.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research* 2012; 52(1):175-91.
- Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47(5):469-84.
- Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK Jr, Bastos Mdo S, Matsuda M. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity Surgery* 2005; 15(4):502-5.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306(5695):457-61.
- Petrasek J, Iracheta-Vellve A, Csak T, Satishchandran A, Kodys K, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, Szabo G. STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110(41):16544-9.
- Phillips IR & Shephard AE. *Cytochrome P450 protocols*. Humana Press 2006; 127.
- Ren LP, Song GY, Hu ZJ, Zhang M, Peng L, Chen SC, Wei L, Li F, Sun W. The chemical chaperon 4-phenylbutyric acid ameliorates hepatic steatosis through inhibition of de novo lipogenesis in high-fructose-fed rats. *International Journal of Molecular Medicine* 2013; 32(5):1029-36.

- Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001; 281(5):G1135-9.
- Rolo A, João S. T, Palmeira Carlos M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology & Medicine* 2012; 52(1):59-69.
- Rouslin W, MacGee J, Gupte S, Wesselman A, Epps DE. Mitochondrial cholesterol content and membrane properties in porcine myocardial ischemia. *American Journal of Physiology* 1982; 242(2):H254-9.
- Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, Chait A, Yeh MM, Quinn LS, Ioannou GN. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* 2013; 57(1):81-92.
- Song BJ. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin. Exp Res* 1996; 20(8 Suppl):138A-146A.
- Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, Haigh WG, Yeh MM, Kowdley KV, O'Brien KD, Pennathur S, Chait A. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Lipid Research* 2011; 52(9):1626-35.
- Sumida Y, Niki E, Naito Y and Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free radical research* 2013; 47(11):869-80.
- Tabas, I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circulation Research* 2010; 107(7):839-50.
- Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4):424-30.
- Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, Lee SP, Teoh NC, Farrell GC. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic

- mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2011; 141(4):1393-403.
- Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *Journal of Cellular Physiology* 2013 228(9):1802-18.
 - Wei, Y., D. Wang, F. Topczewski and M. J. Pagliassotti. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2006; 291(2):E275-81.
 - White RE. The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases. *Pharmacology & Therapeutics* 1991; 49(1-2):21-42.
 - Xu X, Liu T, Zhang A, Huo X, Luo Q, Chen Z, Yu L, Li Q, Liu L, Lun ZR, Shen J. Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by endoplasmic reticulum stress via activation of caspase-12, CHOP, and the JNK pathway in *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Infection and Immunity* 2012; 80(6):2121-32.
 - Yilmaz Y. Is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2012; 36(9):815-23.
 - Yang L, Rozenfeld R, Wu D, Devi LA, Zhang Z, Cederbaum A. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 68:260-7.
 - Yu L., Morishima C, Loannou GN. Dietary cholesterol intake is associated with progression of liver disease in patients with chronic hepatitis C: analysis of the Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment Against Cirrhosis trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013; 11(12):1661-6.e1-3.
 - Yun YP, Casazza JP, Sohn DH, Veech RL, Son BJ. Posttranslational activation of cytochrome P450IIE during ketosis induced by a high-fat diet. *Mol Pharmacol* 1992; 41(3):474-9.

- Zein CO, Yerian LM, Gogate P, Lopez R, Kirwan JP, Feldstein AE, McCullough AJ. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 2011; 54(5):1610-9.