

# El ácido alfa-lipoico previene la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por el alcohol etílico en los riñones

Feyzullah Uçmak<sup>1</sup>  y Eda Yildizhan<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Gastroenterología; <sup>2</sup>Departamento de Histología y Embriología. Facultad de Medicina, Dicle University, Diyarbakir, Turquía

## Resumen

**Antecedentes:** Nuestro objetivo fue investigar la eficacia terapéutica del ácido alfa-lipoico (ALA) contra el estrés oxidativo inducido por el alcohol etílico (EA) y las vías apoptóticas en los riñones sobre la base de análisis bioquímicos, histopatológicos y apoptóticos. **Materiales y métodos:** Veintiocho ratas albinas Wistar fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos iguales. Grupo I (grupo Sham): 1 cc de solución salina al día; Grupo II (ALA): 100 mg/kg/dosis/día; Grupo III (grupo EA): 5 g/kg/día; Grupo IV (grupo EA + ALA): se administraron tanto ALA como EA por vía oral con sonda gástrica simultáneamente. **Resultados:** En el grupo EA, los niveles de malondialdehído y de estado oxidante total aumentaron, mientras que los niveles de superóxido dismutasa y catalasa disminuyeron significativamente ( $p = 0.002$ ). Sin embargo, los niveles de oxidantes se estabilizaron significativamente con la administración de ALA. Además, las señales apoptóticas como Bax y APAF-1 aumentaron en el grupo EA, mientras que las señales Bcl-2 (antiapoptóticas) se expresaron ampliamente con la administración de ALA. **Conclusiones:** La coadministración de ALA con EA aumentó la expresión antiapoptótica y atenuó el daño histológico en los riñones. El ALA puede ser un potencial agente terapéutico contra la lesión por EA.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido alfa-lipoico. Alcohol etílico. Nefrotoxicidad. Estrés oxidativo. Apoptosis.

## Alpha-lipoic acid prevents ethyl alcohol-induced apoptosis and oxidative stress in kidneys

### Abstract

**Background:** Our aim was to investigate the therapeutic efficacy of Alpha-lipoic acid (ALA) against ethyl alcohol (EA)-induced oxidative stress and apoptotic pathways in the kidneys based on biochemical, histopathological, and apoptotic analysis. **Materials and methods:** Twenty-eight Wistar albino rats were randomly divided into four equal groups. Group I (Sham group): 1 cc saline daily; Group II (ALA): 100 mg/kg/dose/day; Group III (EA group): 5 g/kg/day; Group IV (EA + ALA group): both ALA and EA were administered orally with a gastric catheter simultaneously. **Results:** In the EA group, malondialdehyde and total oxidant status levels increased, while superoxide dismutase and catalase levels decreased significantly ( $p = 0.002$ ). However, oxidant levels were significantly stabilized with ALA administration. Furthermore, apoptotic signals such as Bax and Apoptotic peptidase activating factor-1 were increased in the EA group, while Bcl-2 (antiapoptotic) signals were widely expressed with ALA administration. **Conclusions:** Co-administration of ALA with EA increased antiapoptotic expression and attenuated histologic damage in the kidneys. ALA may be a potential therapeutic agent against EA injury.

**KEYWORDS:** Alpha-lipoic acid. Ethyl alcohol. Nephrotoxicity. Oxidative stress. Apoptosis.

### \*Correspondencia:

Eda Yildizhan

E-mail: edayildizhan21@gmail.com

Fecha de recepción: 29-04-2025

Fecha de aceptación: 17-07-2025

DOI: 10.24875/GMM.M25001047

Gac Med Mex. 2025;161:603-612

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

El consumo de alcohol etílico (AE) está aumentando día a día en todos los países en desarrollo.<sup>1</sup> Se sabe que un consumo excesivo de alcohol puede causar cambios en los procesos fisiológicos y bioquímicos de todo el organismo y de las células.<sup>2</sup> Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se acumulan en las células debido al consumo de AE, lo que conduce al desarrollo de estrés oxidativo.<sup>3</sup> El daño tisular renal puede desencadenarse por el aumento de ERO.<sup>4</sup> Aunque se sabe que el uso de AE es una de las causas de glomerulonefritis,<sup>5</sup> la necrosis tubular aguda<sup>6</sup> y la disfunción tubular renal<sup>7</sup> están estrechamente asociadas al alcoholismo. Aunque se desconoce el papel del consumo de alcohol en el daño renal, se ha informado que el AE duplica la incidencia de enfermedad renal crónica.<sup>8</sup> Por otro lado, algunos estudios clínicos y experimentales se han centrado en los efectos del consumo de AE sobre la función renal y la morfología microscópica.<sup>9</sup> Mientras que el consumo agudo de alcohol provoca un efecto nefrotóxico, el consumo crónico aumenta indirectamente el riesgo de enfermedad renal crónica al causar hipertensión.<sup>10</sup>

El estrés oxidativo es un desequilibrio que favorece a los prooxidantes mientras afecta negativamente a los antioxidantes, lo que conduce al daño tisular.<sup>11</sup> Tanto las ERO como el estrés oxidativo se reconocen como las principales causas del daño renal inducido por alcohol.<sup>12</sup> Por tanto, el consumo crónico y excesivo de alcohol puede alterar directa o indirectamente el mecanismo oxidativo, lo que resulta en muerte celular y daño tisular.<sup>13</sup>

El ácido alfa-lipoico (AAL), ácido 1,2-ditioano-3-pentanoico, es un agente con un potente contenido antioxidante, producido por la síntesis de ácido lipoico en las mitocondrias y que forma parte de enzimas mitocondriales.<sup>14</sup> La actividad terapéutica del AAL y su capacidad para reparar el daño oxidativo se basan en su propiedad antioxidante.<sup>15</sup> El hecho de que el AAL tenga un efecto regulador sobre las vías del estrés oxidativo y un fuerte contenido antioxidante ha generado un gran interés en el campo de la medicina en los últimos años.<sup>16</sup> Estudios han demostrado que el AAL reduce el estrés oxidativo en los tejidos del corazón, hígado y riñón después de la sepsis.<sup>17</sup> Otro estudio sugirió que el AAL atenúa el estrés oxidativo en modelos experimentales de insuficiencia cardíaca y daño muscular.<sup>18</sup> Se ha informado que el tratamiento con AAL reduce significativamente los niveles de malondialdehído

(MDA), un producto de la peroxidación lipídica, en plasma, hígado, riñón y tejido cerebral, y suprime células cancerosas proliferativas en cáncer de vejiga, mama, colon, hepatoma, ovario y pulmón.<sup>19</sup>

Nuestro objetivo fue demostrar la eficacia terapéutica del AAL frente al estrés oxidativo inducido por AE y las vías apoptóticas en los riñones, basándonos en análisis bioquímicos, histopatológicos y apoptóticos.

## Material y métodos

### Aprobación del comité de ética y consentimiento

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Animales de Experimentación de la Universidad de Dicle (Protocolo n.º 2023/30, Fecha: 31 de enero de 2024, Diyarbakir, Turquía). Todo el estudio se realizó de acuerdo con la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.<sup>20</sup>

### Determinación de la dosis de AAL

El AAL utilizado en el estudio fue de  $\geq 98,0\%$  de pureza (Sigma Aldrich, EE.UU.), se diluyó en dimetilsulfóxido y se administró por vía oral mediante sonda intragástrica (IG) a una dosis diaria de 100 mg/kg. Para la determinación y preparación de la dosis de AAL se tomaron como referencia los estudios de Eser et al. y El-sayed et al.<sup>21</sup>

### Determinación de la dosis de AE

Los estudios sobre la toxicidad del AE han demostrado que puede administrarse por vía oral o por inhalación. En nuestro estudio, preferimos administrarlo por vía oral mediante sonda IG. El AE ( $\geq 99,8\%$  de pureza, Alemania) se administró a razón de 5 g/kg de peso corporal, como en el estudio de Pierce et al.<sup>22</sup>

### Determinación de los grupos experimentales

En nuestro estudio, se alojaron ratas con un peso promedio de 200-250 g bajo condiciones estándar (ciclo luz/oscuridad de 12 h/12 h, humedad del 55-65%, temperatura de  $22 \pm 2$  °C) y se alimentaron *ad libitum* con agua y pienso. Se utilizaron un total de 28 ratas Wistar albinas y se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos con igual número de animales ( $n = 7$  por grupo).

Grupo I (Grupo simulado): se administraron 1 cc de solución salina durante 4 semanas. Grupo II (AAL): 100 mg/kg/dosis/día durante 4 semanas. Grupo III (AE): 5 g/kg/día durante 4 semanas. Grupo IV (AE + AAL): se administraron simultáneamente AE y AAL.

Todas las ratas fueron sacrificadas al final del estudio mediante exanguinación bajo anestesia general con ketamina HCl 90 mg/kg (Ketalar, Pfizer Inc., EE.UU.) + xilacina HCl 10 mg/kg (Rompun, Bayer Health Care AG, Alemania). Después del sacrificio, los tejidos renales se retiraron rápidamente. Los tejidos renales se utilizaron para los procedimientos histológicos.

### **Análisis bioquímicos**

Los niveles de urea (mg/dl) y creatinina (Cr) (mg/dl), que son pruebas de función renal, se determinaron a partir de muestras de sangre obtenidas por vía intracardíaca después de la anestesia.<sup>23</sup>

### **Análisis de MDA**

Los radicales libres pueden aumentar en las células debido a factores endógenos y exógenos. El producto más importante de los radicales libres es la peroxidación lipídica, cuyo producto final es el MDA. Para determinar el aumento de MDA en sangre, se utilizaron kits ELISA compatibles con rata (Cat. No: E0156Ra) obtenidos de Bioassay Technology Laboratory (Shanghái, China), y los resultados se expresaron como nmol/ml.<sup>24</sup>

### **Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad total de SOD se midió espectrofotométricamente a 560 nm tras una incubación a 25 °C durante 20 minutos. La actividad de SOD se expresó como U/g de proteína. La actividad total de SOD se determinó utilizando el método de Sun et al.<sup>25</sup>

### **Determinación de la actividad de catalasa (CAT)**

La actividad de CAT se determinó en función de la reacción de la enzima con metanol en presencia de la concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad de CAT acumulada en los tejidos se expresó como nmol/min/mg.<sup>26</sup>

### **Análisis de estado antioxidante total (TAS) y estado oxidante total (TOS)**

Los niveles de TAS de las muestras se registraron espectrofotométricamente con el kit Rell Assay Diagnostics (Gaziantep, Turquía), utilizando  $\mu\text{mol}$  Equivalente de Trolox/L (unidad  $\mu\text{mol/L}$ ) y un autoanalizador bioquímico (AU5800; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EE.UU.) como dispositivo lector. Las mediciones se realizaron utilizando el método de Erel.<sup>27</sup>

La unidad de medida del TOS fue mmol Equivalente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L, y se utilizó el mismo autoanalizador bioquímico como dispositivo de lectura. Las mediciones se realizaron mediante el método desarrollado por Erel.<sup>28</sup>

### **Evaluación histológica**

Los riñones extraídos de todos los grupos del estudio fueron enviados al laboratorio de Histología/Embriología en formol al 10%. Los cortes obtenidos tras el seguimiento tisular histológico rutinario se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E), una tinción nuclear. Los tejidos fueron examinados bajo microscopio de luz (microscopio Zeiss, Alemania) por un histólogo, ciego al estudio, y se aplicó el método de puntuación histopatológica utilizado por Chatterjee et al.<sup>29</sup>

### **Evaluación inmunohistoquímica**

Tras el seguimiento histológico rutinario, se colocaron cortes de 5 $\mu$  en portaobjetos cargados positivamente y, posteriormente, se introdujeron en una solución de ácido etilendiaminotetraacético, calentándose en horno microondas durante 15 minutos. Tras el lavado con solución salina fosfatada tamponada, se aplicó el protocolo de tinción de Keşim et al.<sup>30</sup> Por último, se realizó la contratinción con hematoxilina y los cortes fueron examinados y fotografiados bajo un microscopio de luz (Zeiss Imager A2). El tono marrón en las secciones indica intensidades de señal positivas (expresión), mientras que el tono azul indica expresión negativa. La intensidad de la tinción inmunohistoquímica en los tejidos renales de todos los grupos fue evaluada de forma semicuantitativa por un histólogo. La intensidad de la expresión se puntuó como: sin tinción (0), baja (1), moderada (2) y fuerte (3).<sup>26</sup>

El análisis inmunohistoquímico se basó en la intensidad de expresión de las proteínas *B-cell lymphoma gene-2* (Bcl-2) (Santa Cruz, dilución 1/100), Bax (Santa

**Tabla 1.** Media  $\pm$  desviación estadística de los valores séricos bioquímicos (Urea, Cr, MDA, TAS, TOS, SOD y CAT) de todos los grupos

Grupos	Urea (mg/dl)	Cr (mg/dl)	MDA (nmol/ml)	TAS ( $\mu$ mol)	TOS (mmol)	SOD (U/g de proteína)	CAT (nmol/min/mg)
Simulado (n = 7)	51.28 $\pm$ 3.81 <sup>c,d</sup>	0.59 $\pm$ 0.13 <sup>c,d</sup>	0.91 $\pm$ 0.09 <sup>e</sup>	1.23 $\pm$ 0.10 <sup>b,c,d</sup>	20.11 $\pm$ 1.41 <sup>c</sup>	5.58 $\pm$ 0.92 <sup>b,c</sup>	97.02 $\pm$ 5.88 <sup>b</sup>
ALA (n = 7)	50.57 $\pm$ 5.12 <sup>c,d</sup>	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>c,d</sup>	0.91 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	2.42 $\pm$ 0.28 <sup>a,b,d</sup>	17.58 $\pm$ 1.43 <sup>c,d</sup>	11.02 $\pm$ 1.74 <sup>a,c,d</sup>	115.92 $\pm$ 7.27 <sup>a,c,d</sup>
AE (n = 7)	143.28 $\pm$ 34.47 <sup>a,b</sup>	2.78 $\pm$ 0.57 <sup>a,b</sup>	1.73 $\pm$ 0.23 <sup>a,b,d</sup>	0.95 $\pm$ 1.15 <sup>a,b,d</sup>	41.93 $\pm$ 4.85 <sup>b,d</sup>	38.88 $\pm$ 0.38 <sup>a,b,d</sup>	88.34 $\pm$ 5.17 <sup>b,d</sup>
AE + ALA (n = 7)	100.14 $\pm$ 4.94 <sup>a,b,c</sup>	1.78 $\pm$ 0.46 <sup>a,b</sup>	1.08 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	1.65 $\pm$ 1.13 <sup>a,b,c</sup>	22.97 $\pm$ 2.23 <sup>b,c</sup>	6.04 $\pm$ 1.29 <sup>b,c</sup>	101.04 $\pm$ 1.38 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>p < 0,005 (vs grupo simulado).

<sup>b</sup>p < 0,005 (vs grupo ALA).

<sup>c</sup>p < 0,005 (vs grupo EA).

<sup>d</sup>p < 0,005 (vs grupo AE + ALA).

ALA: ácido alfa-lipoico; EA: alcohol etílico; n: número de sujetos; Cr: creatinina; MDA: malondialdehído (nmol/ml); TAS: estado antioxidante total ( $\mu$ mol equivalente Trolox/L); TOS: estado oxidante total (mmol equivalente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L); SOD: superóxido dismutasa (U/g de proteína); CAT: catalasa (nmol/min/mg).

Cruz, dilución 1/100) y Apoptotic peptidase activating factor-1 (APAF-1) (Santa Cruz, dilución 1/100). Se sabe que Bcl-2 es un tipo de proteína con función antiapoptótica sintetizada en muchos tejidos del cuerpo, mientras que Bax es un marcador de proapoptosis.<sup>31</sup> Las inducciones de Bax y Bcl-2 se encuentran entre las citocinas que estabilizan la apoptosis.<sup>32</sup>

APAF-1 es uno de los receptores intrínsecos que provocan la muerte apoptótica celular mediante la liberación de citocromo c desde la mitocondria.<sup>33</sup> En la vía extrínseca, APAF-1 desempeña un papel similar en la activación de la vía mitocondrial.<sup>34</sup>

### Análisis estadístico

Todos los datos fueron evaluados como media  $\pm$  desviación estándar (x  $\pm$  Error Estándar de la Media) utilizando el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). A los valores que no mostraron distribución normal se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis H, y para la comparativa entre grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney U. El nivel de significación se aceptó como significativo a p < 0.05. El tamaño mínimo de muestra para este estudio fue calculado utilizando los criterios de Cohen.

## Resultados

### Investigaciones bioquímicas

#### PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL (UREA Y CREATININA)

Al comparar los valores de urea, se observó que el valor medio más bajo correspondió al grupo ALA,

mientras que el grupo AE presentó el valor medio más alto. En la comparativa intergrupar entre el grupo AE y el grupo AE + ALA, se observó una diferencia significativa entre ambos. La administración de ALA junto con AE tuvo un efecto positivo sobre los valores séricos de urea (p = 0.005).

En cuanto al análisis de creatinina (Cr), se observó que el valor medio más alto correspondió al grupo AE, pero no hubo diferencia significativa entre el grupo AE y el grupo AE + ALA (p > 0.05) (Tabla 1).<sup>23</sup>

### Análisis de MDA

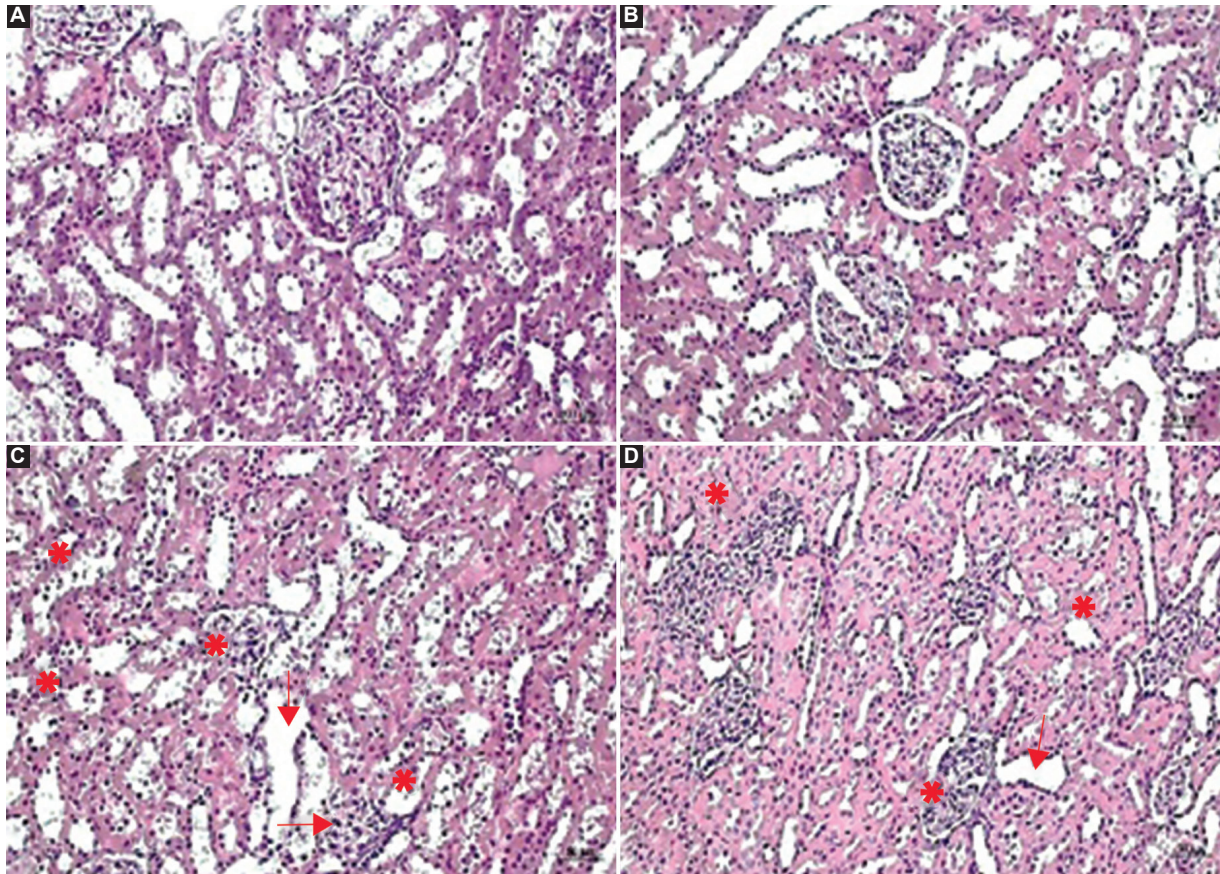
En la comparativa entre grupos, se observó que el grupo AE presentó el valor medio más alto de MDA, así como una diferencia significativa entre los grupos Sham, ALA y AE (p = 0.002). También una diferencia estadísticamente importante entre el grupo AE y el grupo AE + ALA (Tabla 1). Cuando se administró ALA junto con AE, se observó un efecto favorable sobre los valores séricos de MDA.<sup>24</sup>

### Análisis de SOD

En el análisis de los valores de SOD, se observó que el valor medio más bajo correspondió al grupo AE, pero se incrementó de manera importante en el grupo AE + ALA (p = 0.002) (Tabla 1).<sup>25</sup>

### Análisis de CAT

El análisis de CAT reveló resultados coincidentes con nuestros demás hallazgos. Todos los análisis bioquímicos confirmaron que el consumo de alcohol incrementó significativamente los niveles de TOS y MDA, y disminuyó las actividades de SOD y CAT. Los



**Figura 1.** Imagen microscópica óptica de los tejidos renales (tinción: hematoxilina y eosina, barra: 50-100  $\mu\text{m}$ ). **A:** Sham. **B:** ALA. **C:** AE. **D:** AE+ALA. Atrofia de glomerulos (punta de flecha), degeneración y dilatación de túbulos proximales (flecha), y alteración de túbulos distales (asteriscos). ALA: ácido alfa-lipoico; AE: alcohol etílico.

componentes antioxidantes de ALA modificaron de manera significativa los parámetros de estrés oxidativo ( $p = 0.002$ ) (Tabla 1).<sup>26</sup>

### **Análisis de TAS y TOS**

El análisis estadístico de los valores de TAS indicó una diferencia significativa entre el grupo simulado y los demás grupos del estudio ( $p < 0.05$ ). Los valores más bajos de TAS se observaron en el grupo AE, mientras que los valores más altos correspondieron al grupo ALA. No obstante, hubo también una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo AE y el grupo AE + ALA ( $p = 0.002$ ).

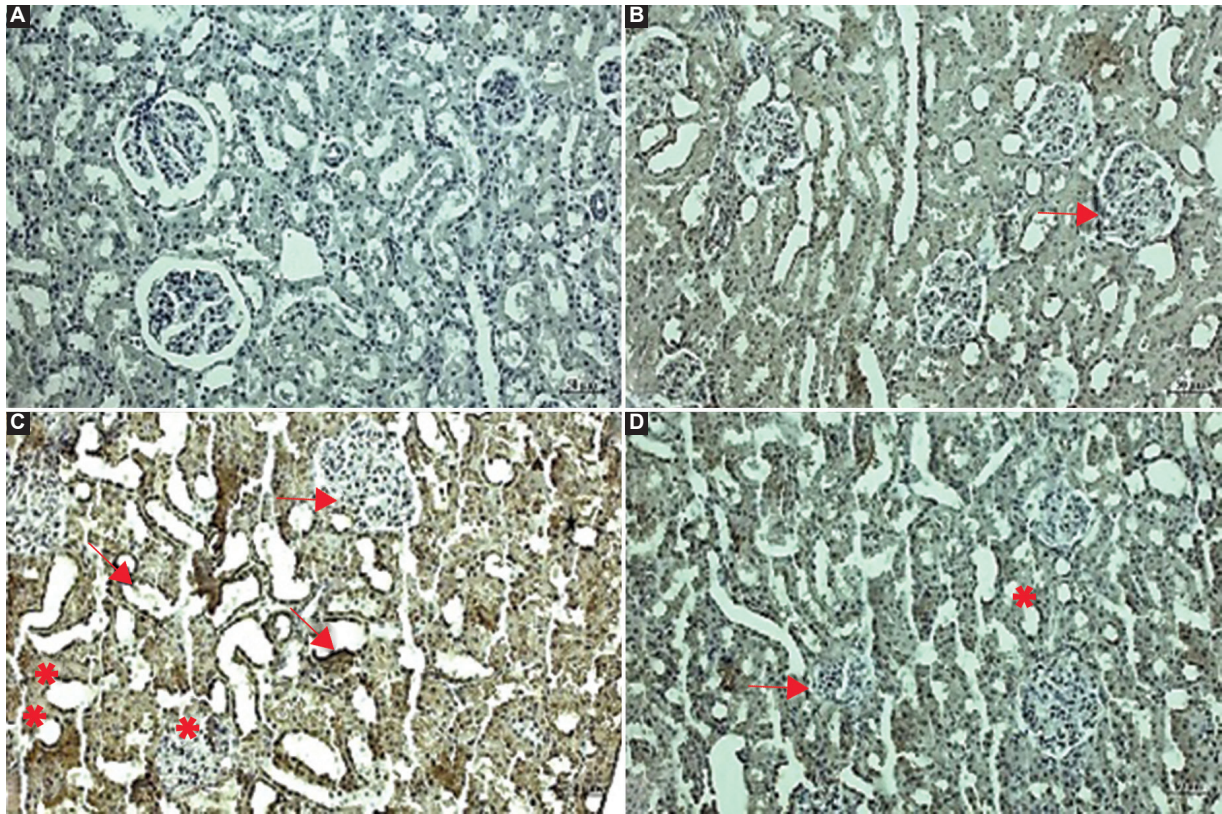
En el análisis de TOS, el nivel de oxidantes más alto se observó en el grupo AE. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo AE y el grupo AE + ALA ( $p = 0.002$ ).<sup>27-28</sup>

Cuando ALA se administró junto con AE, tanto los valores de TAS como de TOS se vieron afectados positivamente. Dado que el valor antioxidante más

alto y el nivel oxidante más bajo se observaron en el grupo ALA, al comparar ambos grupos se observó una diferencia significativa. ALA aumentó los niveles séricos de TAS y disminuyó significativamente los niveles de TOS y MDA gracias a sus propiedades antioxidantes (Tabla 1).

### **Evaluación histopatológica**

Los riñones fueron examinados cuidadosamente en las muestras teñidas con H&E. Los riñones de los grupos Sham y ALA fueron normales y no se observaron hallazgos histopatológicos. La imagen microscópica del grupo AE reveló que la estructura histológica normal del riñón estaba alterada. En los tejidos del grupo AE se observó atrofia de los glomerulos, dilatación tanto de túbulos proximales como distales, y degeneración de su estructura normal. En el grupo AE + ALA se observó un daño histopatológico menor (Fig. 1).<sup>29</sup> Además, al puntuar el daño tisular, se observó que el promedio más alto



**Figura 2.** Expresiones positivas de Bax (tinción: bax; contratinción: hematoxilina; barra: 50  $\mu$ m). **A:** Sham. **B:** ALA. **C:** AE. **D:** AE + ALA. Expresión positiva en glomérulos (puntas de flecha), expresión positiva en túbulos proximales (flecha), expresión positiva en túbulos distales (asterisco). ALA: ácido alfa-lipoico; AE: alcohol etílico.

**Tabla 2.** Media  $\pm$  desviación estadística de las intensidades de expresión (daño renal, Bax, Bcl-2, APAF-1) de todos los grupos

Grupos	Daño renal	Bax (+) Expresión	Bcl-2 (+) Expresión	APAF-1 (+) Expresión
Simulado (n = 7)	0.14 $\pm$ 0.37 <sup>c,d</sup>	0.57 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.48 <sup>c,d</sup>	0.42 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>
ALA (n = 7)	0.14 $\pm$ 0.37 <sup>c,d</sup>	0.15 $\pm$ 0.37 <sup>c,d</sup>	0.42 $\pm$ 0.53 <sup>a,c,d</sup>	0.28 $\pm$ 0.48 <sup>c,d</sup>
AE (n = 7)	2.42 $\pm$ 0.53 <sup>a,b,d</sup>	2.71 $\pm$ 0.48 <sup>a,b,d</sup>	2.71 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	2.42 $\pm$ 0.53 <sup>a,b</sup>
AE + ALA (n = 7)	1.28 $\pm$ 0.48 <sup>a,b,c</sup>	1.42 $\pm$ 0.53 <sup>b,c</sup>	1.28 $\pm$ 0.48 <sup>a,b</sup>	1.42 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p < 0,005 (vs grupo simulado).

<sup>b</sup>p < 0,005 (vs grupo ALA).

<sup>c</sup>p < 0,005 (vs grupo EA).

<sup>d</sup>p < 0,005 (vs grupo AE + ALA).

ALA: ácido alfa-lipoico; AE: alcohol etílico; n: número de sujetos.

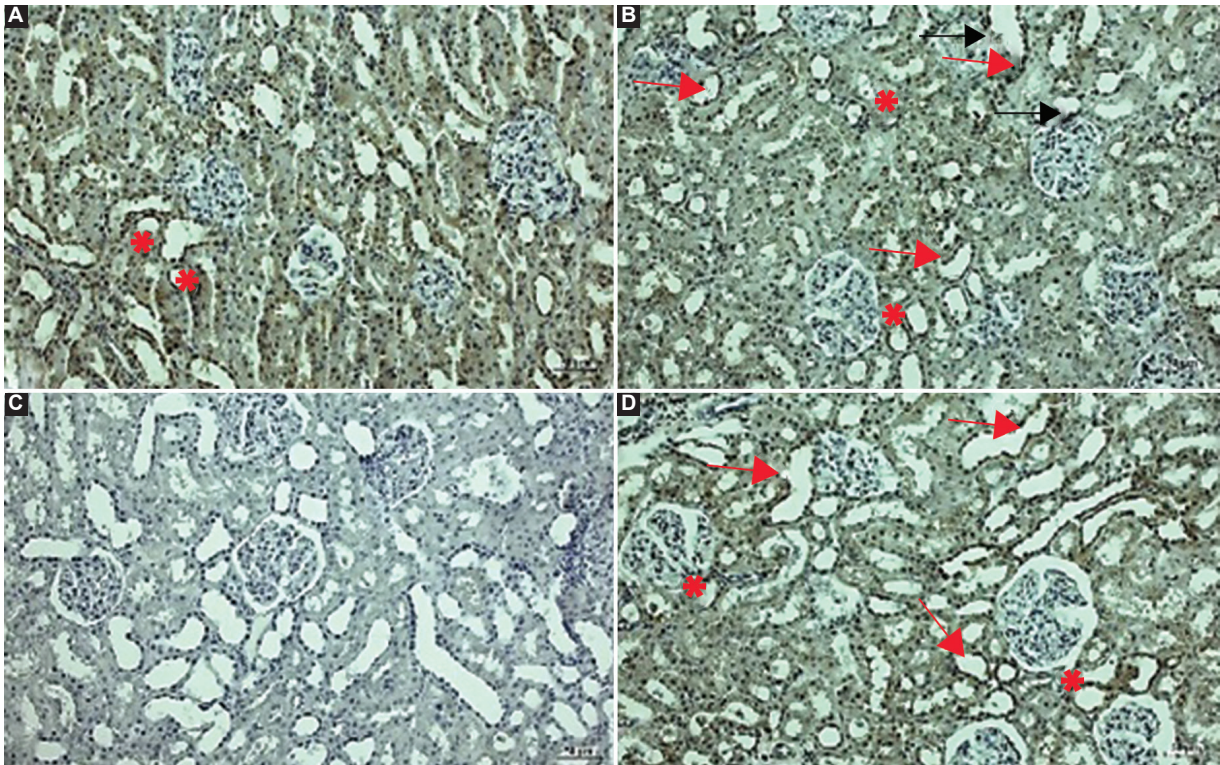
correspondió al grupo AE, pero el daño en el grupo AE + ALA fue mucho menor ( $p = 0.004$ ).

### Expresiones de Bax y Bcl-2

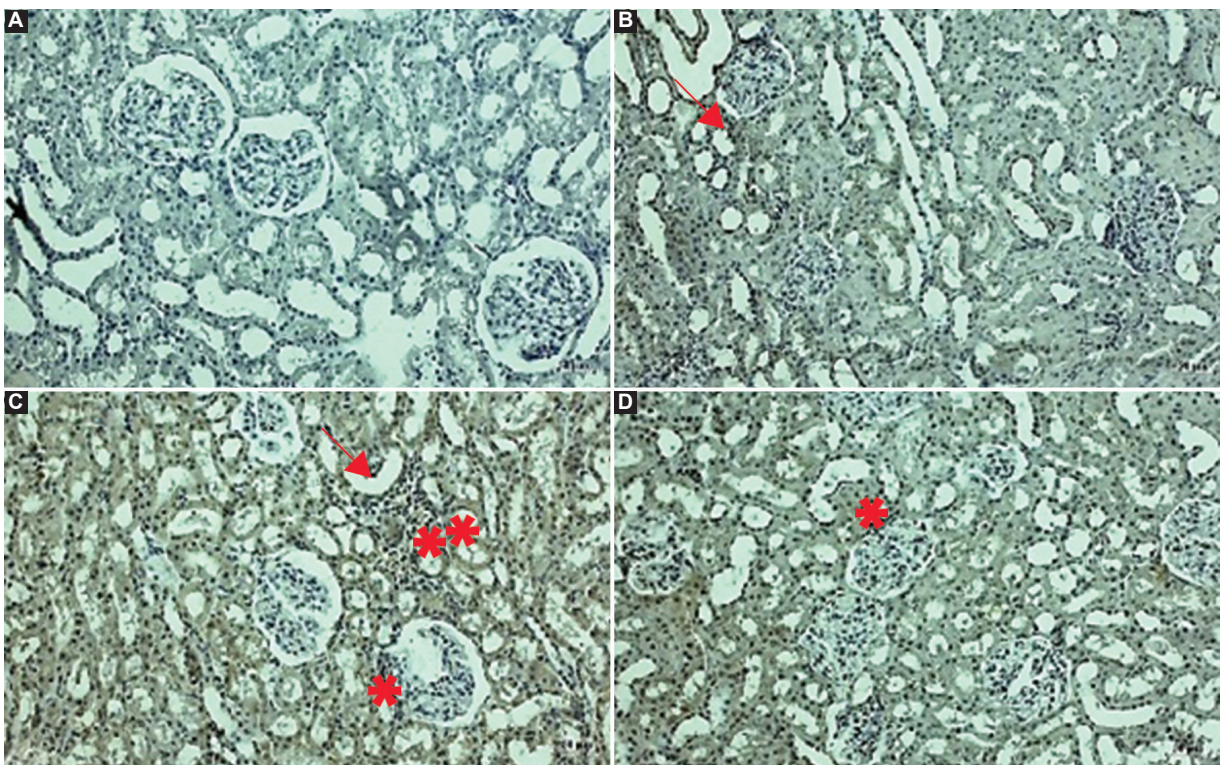
La densidad de células teñidas de color marrón en el citoplasma y núcleos de las células glomerulares, así como en los túbulos proximales y distales, fue examinada bajo microscopía óptica. Las expresiones

de Bax fueron significativamente mayores en el grupo AE en comparativa con los demás grupos; sin embargo, se observaron expresiones positivas menos intensas en el grupo AE + ALA ( $p = 0.004$ ) (Fig. 2).<sup>30-31</sup>

Las expresiones de Bcl-2 mostraron tinción positiva extensa en el grupo ALA (Fig. 3). En la comparativa entre grupos, el promedio más alto se observó estadísticamente en el grupo ALA. La diferencia entre la



**Figura 3.** Expresiones positivas de Bcl-2 (tinción: bcl-2; contratinción: hematoxilina; barra: 50  $\mu$ m). **A:** Sham. **B:** ALA. **C:** AE. **D:** AE+ALA. Expresión positiva en glomérulos (punta de flecha), expresión positiva en túbulos proximales (flecha), expresión positiva en túbulos distales (asterisco). Bcl-2: B-cell lymphoma gene-2; ALA: ácido alfa-lipoico; AE: alcohol etílico.



**Figura 4.** Expresiones positivas de APAF-1 (tinción: apaf-1; contratinción: hematoxilina; barra: 50  $\mu$ m). **A:** Sham. **B:** ALA. **C:** AE. **D:** AE+ALA. Expresión positiva en glomérulos (punta de flecha), expresión positiva en túbulos proximales (flecha), expresión positiva en túbulos distales (asterisco). APAF-1: Apoptotic peptidase activating factor-1; ALA: ácido alfa-lipoico; AE: alcohol etílico.

intensidad de expresión del grupo AE y el grupo ALA fue significativa ( $p = 0.001$ ).

### Expresiones de APAF-1

Al puntuar la intensidad de expresión de APAF-1, el grupo ALA mostró la intensidad media más baja (Fig. 4). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre el grupo AE y el grupo AE + ALA ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4, Tabla 2).<sup>32-34</sup>

### Discusión

La liberación de ERO y de productos de peroxidación lipídica, una de las consecuencias de la metabolización del EA, contribuye al aumento del estrés oxidativo al dañar la membrana celular y las funciones mitocondriales. Esto puede conducir a un debilitamiento de los mecanismos de defensa antioxidante, y las células pueden volverse vulnerables al daño oxidativo.<sup>35</sup>

El daño celular, la apoptosis y el daño del ADN pueden sobrevenir cuando el equilibrio entre la formación de radicales libres y la neutralización de sus efectos se ve alterado. Aquí es donde interviene el sistema de defensa antioxidante. Los antioxidantes reducen los compuestos reactivos y previenen la peroxidación lipídica o reaccionan directamente con ellos para evitar la apoptosis.<sup>36</sup> La medición de la capacidad antioxidante es una herramienta importante para evaluar los factores fisiopatológicos de las enfermedades, y se pueden utilizar diversos biomarcadores para determinar los niveles de estrés oxidativo.<sup>37</sup>

El ALA ha recibido recientemente el título de potente antioxidante.<sup>38</sup> Estudios *in vivo* han descrito como el ALA reduce el estrés oxidativo en tejidos renales y cardíacos.<sup>39</sup> Se ha descrito que el tratamiento con ALA reduce los niveles de MDA, un producto de la peroxidación lipídica, en plasma y en los tejidos hepático, renal y cerebral, y que suprime células proliferativas en cáncer de vejiga, mama, colon, hepatoma, ovario y pulmón.<sup>40</sup> También se ha demostrado que el ALA protege frente a la nefrotoxicidad inducida por cisplatino mediante un mecanismo oxidativo.<sup>41</sup> Se piensa que el ALA está asociado con la inactivación de la infiltración de neutrófilos y la regulación de la producción de mediadores inflamatorios.<sup>42</sup> Se informó que la administración de ALA a 60 mg/kg/dosis en ratas durante 24 semanas no causó efectos histopatológicos ni pérdida de peso. Sin embargo, en otro

estudio también se sugirió que dosis altas (180 mg/kg) de ALA no provocaron patología significativa.<sup>43</sup> En nuestro estudio, cuando el ALA se administró a una dosis de 100 mg/kg durante 4 semanas, se observó que no afectó negativamente las pruebas de función renal ni provocó efectos histopatológicos. También se observó que el ALA disminuyó los niveles de MDA y TOS, que son productos de la peroxidación lipídica, mediante un mecanismo oxidativo. Sin embargo, también se observó que el ALA mejoró el daño histológico causado por el EA. Este estudio mostró hallazgos similares a los de un estudio previo en el que el ALA redujo la gravedad de las lesiones renales (dilatación tubular, epitelio tubular degenerado) causadas por la toxicidad del metotrexato o por la exposición a malatión.<sup>44</sup> Se ha sugerido que el ALA mejora la insuficiencia renal aguda isquémica y conduce a una disminución de la Cr sérica y de la urea en sangre.<sup>45</sup> Goraca y Skibska informaron que el ALA proporciona un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por endotoxinas en el pulmón y tiene propiedades antioxidantes potenciales frente a los radicales libres.<sup>46</sup>

Se ha comprobado que las ERO contribuyen a la apoptosis al aumentar el daño oxidativo.<sup>47</sup> La apoptosis es un evento fundamental necesario para el desarrollo y la homeostasis del organismo.<sup>48</sup> Se sabe que Bcl-2 es una proteína con función antiapoptótica y que se sintetiza en muchos tejidos del cuerpo. Bax es un tipo de proteína de la familia Bcl-2 cuya función es proapoptótica.<sup>49</sup> La inducción del factor proapoptótico Bax y del factor antiapoptótico Bcl-2 estabiliza la apoptosis.<sup>32</sup> El aumento de los niveles de TOS y MDA, marcadores de daño oxidativo, y la disminución de los niveles de SOD y CAT desencadenaron señales proapoptóticas en los riñones. Esto provocó un aumento positivo en las expresiones de Bax. No obstante, la administración de ALA + AE aumentó la señalización antiapoptótica de Bcl-2 y ALA + AE mostró un efecto protector frente a las expresiones apoptóticas en los riñones.

### Conclusiones

El consumo de AE aumentó el daño oxidativo, desencadenó señales apoptóticas debido a los productos liberados y mostró expresiones positivas en los riñones. No obstante, se observó que el daño inducido por AE podía atenuarse cuando se administraba AAL. El AAL puede ser un agente terapéutico potencial contra el daño oxidativo y apoptótico inducido por AE.

A pesar de estos datos, se recomiendan más estudios para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la apoptosis antes de que sean activados.

## Financiamiento

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de organismos públicos, comerciales o sin ánimo de lucro.

## Conflicto de intereses

Los autores no declararon ningún conflicto de intereses.

## Consideraciones éticas

**Protección de seres humanos y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos cumplieron con las normas éticas del comité responsable de la experimentación humana y respetaron la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética institucional.

**Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética.** Los autores han seguido los protocolos de confidencialidad de su institución, obtuvieron el consentimiento informado de los pacientes y recibieron la aprobación del Comité de Ética. Las directrices SAGER fueron seguidas de acuerdo con la naturaleza del estudio.

**Declaración sobre el uso de inteligencia artificial.** Los autores declaran que no se utilizó inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito.

## Referencias

- Sivapiriya V, Jayanthisakthisekaran, Venkatraman S. Effects of dime-thoate (O,O-dimethyl S-methyl carbamoyl methyl phosphorodithioate) and Etanol on antioxidant status of liver and kidney of experimental mice. *Pestic Biochem Physiol.* 2006;85:115-21.
- Acay A. Current medical treatment in NAFLD. *KTD.* 2015;16:67-76.
- Cigremis Y, Turkoz Y, Tuzcu M, Ozen H, Kart A, Gaffaroglu M, et al. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the formation of peroxynitrite, level of nitric oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney. *Mol Cell Biochem.* 2006;291:127-38.
- Varga ZV, Matyas C, Paloczi J, Pacher P. Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol Res.* 2017;38:283-8.
- Keller CK, Andrassy K, Waldherr R, Ritz E. Postinfectious glomerulonephritis is there a link to alcoholism? *Q J Med.* 1994;87:97-102.
- Hirsch DJ, Jindal KK, Trillo A, Cohen AD. Acute renal failure after binge drinking. *Nephrol Dial Transplant.* 1994;9:330-1.
- De Marchi S, Cecchin E, Basile A, Bertotti A, Nardini R, Bartoli E. Renal tubular dysfunction in chronic alcohol abuse--effects of abstinence. *N Engl J Med.* 1994;329:1927-34.
- Pan CS, Ju TR, Lee CC, Chen YP, Hsu CY, Hung DZ, et al. alcohol use disorder tied to development of chronic kidney disease: a nationwide database analysis. *PLoS One.* 2018;13:e0203410.
- Çalışkan A, Güney TG, Kar F, Cakir Gündoğdu A, Özbayer C. Acute toxicity of ethanol and protective role of boric acid in rat kidney tissue. *BioDiCon.* 2022;15:107-13.
- Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, Zambon A, Poikolainen K. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction.* 2000;95:1505-23.
- Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol.* 2012;3:997-1019.
- Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology.* 2000;7:25-32.
- Sun A, Ingelman-Sundberg M, Neve E, Matsumoto H, Nishitani Y, Minowa Y, et al. Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25:237-43.
- Reed LJ. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Sci.* 1998;7:220-4.
- Goraça A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep.* 2011;63:849-58.
- Superti F, Russo R. Alpha-lipoic acid: biological mechanisms and health benefits. *Antioxidants (Basel).* 2024;13:1228
- Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, et al. Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. *Inflammation.* 2016;39:357-65.
- Brancaccio M, Mennitti C, Cesaro A, Fimiani F, Moscarella E, Caiazza M, et al. Dietary thiols: a potential supporting strategy against oxidative stress in heart failure and muscular damage during sports activity. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:9424.
- Schwartz L, Guais A, Israel M, Junod B, Steyaert JM, Crespi E, et al. Tumor regression with a combination of drugs interfering with the tumor metabolism: efficacy of hydroxycitrate, lipoic acid and capsaicin. *Invest New Drugs.* 2013;31:256-64.
- Council NR. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. p. 246.
- Eser HF, Tras B, Uney K. Alpha lipoic acid and vitamin E improve atorvastatin-induced mitochondrial dysfunctions in rats. *Mitochondrion.* 2020;52:83-8.
- Pierce DR, Serbus DC, Light KE. Intragastric intubation of alcohol during postnatal development of rats results in selective cell loss in the cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17:1275-80.
- Chiang KH, Chiu YC, Yar N, Chen YC, Cheng CH, Liu YC, et al. Renoprotective impacts of Inonotus obliquus ethanol-ethyl acetate extract on combined streptozotocin and unilateral nephrectomy-induced diabetic nephropathy in mice. *Int J Mol Sci.* 2023;24:4443.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 1978;90:37-43.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
- Sönmez MF, Narin F, Akkuş D, Türkmen AB. Melatonin and vitamin C ameliorate alcohol-induced oxidative stress and eNOS expression in rat kidney. *Ren Fail.* 2012;34:480-6.
- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103-11.
- Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota Filipe H, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 2000;58:658-73.
- Keşim DA, Aşir F, Ayaz H, Korak T. The effects of ellagic acid on experimental corrosive esophageal burn injury. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;46:1579-92.
- Manigandan K, Manimaran D, Jayaraj RL, Elangovan N, Dhivya V, Kapile A. Taxifolin curbs NF-κB-mediated Wnt/β-catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis. *Biochimie.* 2015;119:103-12.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419.
- Schulze Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998;254:439-59.
- Huang DC, Strasser A. BH3 only proteins essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 2000;103:839-42.
- Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2006;50:291-6.
- Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 2002;123:245-60.
- Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, et al. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. *Antioxidants (Basel).* 2022;11:1224.
- Salehi B, Azzini E, Zucca P, Varoni EM, Anil Kumar NV, Dini L, et al. Plant-derived bioactives and oxidative stress-related disorders: a key trend towards healthy aging and longevity promotion. *Plant Sci.* 2020;10:947.
- Wang X, Yu Y, Ji L, Liang X, Zhang T, Hai CX. Alpha-lipoic acid protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple target effects. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:2750-7.
- Arivazhagan P, Thilakavathy T, Ramanathan K, Kumaran S, Panneerselyam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats. *J Nutr Biochem.* 2002;13:619-24.
- Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammel GL, Malafa M, Rybak LP. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol.* 2000;86:234-24.

42. Sehirli O, Sener E, Cetinel S, Yüksel M, Gedik N, Sener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:249-55.
43. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006;46:29-41.
44. Al-Attar AM. Physiological and histopathological investigations on the effects of lipoic acid in rats exposed to malathion. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:203503.
45. Takaoka M, Ohkita M, Kobayashi Y, Yuba M, Matsumura Y. Protective effect of alpha-lipoic acid against ischaemic acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:189-94.
46. Goraca A, Skibska B. Beneficial effect of  $\alpha$ -lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:379-86.
47. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:88-97.
48. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*. 2006;27:244-50.
49. Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced liver injury. *J Biol Chem*. 2001;276:27432-40.