



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**La Disfunción Mitocondrial Inducida
Por El Acetaldehído Sensibiliza A Los
Hepatocitos Al Daño Oxidativo**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA

M. en Biol. Exp. Blanca Eugenia Farfan Labonne

TUTORA

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

ASESORES

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Dr. David Kershenovich Stalnikowitz
Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

México, D.F.
Diciembre 2008

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud; División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz con la asesoría del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz del mismo departamento. Asimismo se contó con la asesoría del Dr. David Kershenobich del Departamento de Medicina Experimental de la Fac. de Medicina de la UNAM y del Dr. Alejandro Zentella del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa con el número de registro 309-0, se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Para la realización de este trabajo se contó con la beca-crédito con número de registro 152987. Asimismo el proyecto contó con el apoyo del CONACYT con el número de convenio # 34195M y 61544.

Agradecimientos

Deseo hacer patente mi reconocimiento a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron con su trabajo al logro de esta tesis y en especial:

A mis padres por el inmenso apoyo y amor que me han brindado, y a quienes debo lo que soy

A Alejandro por ayudarme a seguir adelante en todos mis proyectos

A la Dra. Concepción Gutiérrez-Ruíz por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y de llevar a cabo este trabajo, así como por su apoyo

Al Dr. Luis Gómez Quiroz por su valiosa colaboración en el planteamiento de la línea de investigación y en las reflexiones que ayudaron a dar fortaleza a este trabajo

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio por haberme brindado su tiempo, compañía y ayuda a lo largo de la elaboración de esta tesis

Al Lic. Mario Gutiérrez, al Dr. Victor Ortiz y al Dr. Oscar Flores que fueron esenciales en el desarrollo del trabajo experimental.

A los **miembros del jurado** cuyas observaciones y comentarios ayudaron a mejorar esta tesis

Al Ing. Omar Agni García por la valiosa ayuda en la estructuración de este trabajo.

La ciencia es larga y la vida breve.

SÉNECA, Lucio Anneo

Se debe hacer todo tan sencillo como sea posible, pero
no más sencillo.

EINSTEIN, Albert

Índice

1. ABREVIATURAS	3
1.1 Lista de Imágenes	5
1.2 Resumen	6
1.3 Abstract	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Daño Hepático y Cirrosis	8
2.2 Metabolismo del Etanol	8
2.3 Toxicidad del Etanol	11
2.4 Toxicidad del Acetaldehído	12
2.5 Mitocondria: Especies Reactivas de Oxígeno	14
2.6 Sistema Antioxidante Celular	16
2.7 Efecto Del Etanol Y El Acetaldehído En La Producción De ROS	19
2.8 Modelo Celular	22
4. HIPOTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos Particulares	26
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	27
7. MATERIAL Y METODOS	29
7.1 Aislamiento de Hepatocitos y Cultivo Celular de HepG2	29
7.2 Prueba de Viabilidad Celular por MTT	30
7.3 Aislamiento de Mitocondrias de Hígado de Rata	31
7.4 Control Respiratorio	32
7.5 Actividad SOD2 en Mitocondrias	33
7.6 Hinchamiento Mitocondrial	34
7.7 Liberación de Citocromo C	35
7.8 Contenido de ATP	35
7.8.1 Actividad de SOD2 en Cultivos Celulares	36
7.9 Determinación de Actividades Enzimáticas	
7.9.1 Glutación Peroxidasa	37
7.9.2 Catalasa	38
7.10 Parámetros de Estrés Oxidativo	38
7.10.1 Contenido de Glutación Reducido	38
7.10.2 Niveles de Peróxido de Hidrógeno	40
7.10.3 Lipoperoxidación	41
7.10.4 Oxidación de proteínas	41
7.11 Recuperación de la Actividad de SOD2	42
7.11.1 Western Blot para SOD2	42
7.11.2 Aislamiento ARNm	42
7.11.3 RT-PCR	43

7.12 Determinación del Contenido de Proteína	
7.13 Prueba de Funcionalidad Celular por Rojo Neutro	45
7.14 Análisis Estadístico	46
8. RESULTADOS	47
8.1 Funcionalidad Celular Determinada por MTT	47
8.2 Funcionalidad Mitocondrial	48
8.2.1 Control Respiratorio	48
8.2.3 Hinchamiento Mitocondrial	48
8.2.4 Liberación de Citocromo C	50
8.2.5 Contenido de ATP	51
8.3 Determinación de Actividades Enzimáticas	51
8.3.1 SOD2	52
8.3.2 Ensayo Libre de Células	54
8.3.3 Actividad de SOD2 de Mitocrondria de Hígado de Rata	56
8.3.4 Glutación Peroxidasa	57
8.3.5 Catalasa	59
8.4 Alteraciones del Estado Redox	60
8.4.1 Determinación de Oxidación de Proteínas	60
8.4.2 Determinación del Grado de Lipoperoxidación	61
8.4.3 Radio GSH/GSSG	63
8.4.4 Generación de Peróxido de Hidrógeno	64
8.5 Recuperación de la Actividad de SOD2	66
8.5.1 Expresión de SOD2	66
8.5.2 Cantidad de SOD2	68
8.6 Sensibilización al Daño Oxidativo	69
9. DISCUSIÓN	72
10.CONCLUSIONES	86
11.BIBLIOGRAFIA	87
12. ARTÍCULO ACEPTADO	98

ABREVIATURAS

A	Adenina
Ac	Acetaldehído
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
ADNc	Acido Desoxiribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de Varianza
AP1	Proteína Activadora 1
ARNasas	Acido Ribonucleicasas
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
Cat	Catalasa
CypC	Citocromo C
Cyp P450	Citocromo P 450
CTP	Citocin trifosfato
DCFH2	2,7-Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DE	Desviación Estandar
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNTB	5,5´-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
EHA	Enfermedad hepática alcohólica
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
EtOH	Etanol
g	Gramo
Xg	Gravedades
Gd Cl ₃	Cloruro de Gadolinio
GPx	Glutación Peroxidasa
GRd	Glutación Reductasa
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidasa
GTP	Guanosin trifosfato
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HCl	Acido Clorhídrico
HepG2	Línea celular derivada de hepatoblastoma humano
Hp	Hepatocitos de cultivo primario
HSP	Proteína de Choque Térmico (siglas en inglés)
IgA	Inmunoglobulina A

IL 8RA	Receptor tipo A de IL 8
IL 8RB	Receptor tipo B de IL 8
IL	Interleucina
Kd	Kilodalton
l	Litros
LB	Amortiguador de carga
LBP	Proteína Unidora a LPS
LPO	Lipoperoxidación
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MDA	Malondialdehído
MEOS	Sistema Oxidativo Microsomal
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NBT	Azúl tetrasolio-nitro
NF κ B	Factor nuclear κ B
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
PBS	Amortiguador de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retro-transcripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
-SH	Grupo tiol
SLC	Sistema Libre de Células
SOD2	Super óxido dismutasa mitocondrial
T	Timina
TCA	Acido tricloroacético
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TTP	Timina trifosfato

LISTADO DE IMÁGENES, TABLAS Y GRÁFICAS

Fig 1. Vías Metabólicas del Etanol	13
Fig 2. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss	18
Fig 3. Metabolismo del anión superóxido	21
Tabla 1. Reducción de MTT	50
Tabla 2. Control Respiratorio	51
Gráfica 1. Hinchamiento Mitocondrial	52
Gráfica 2. Liberación del citocromo C	53
Gráfica 3. Contenido de ATP	54
Gráfica 4. Actividad SOD2 HepG2	55
Gráfica 5. Actividad SOD2 Hp	56
Gráfica 6. Actividad SOD2 Hp controles	57
Gráfica 7. Actividad SOD2 Sistema Libre de Células	58
Gráfica 8. Actividad SOD2 en Mitocondrias	59
Gráfica 9. Actividad GSHPx HepG2	60
Gráfica 10. Actividad GSHPx Hp	61
Gráfica 11. Actividad Cat HepG2	62
Gráfica 12. Actividad Cat Hp	63
Gráfica 13. Oxyblot	64
Gráfica 14. LPO HepG2	65
Gráfica 15. LPO Hp	65
Gráfica 16. GSH/GSSG HepG2	66
Gráfica 17. GSH/GSSG Hp	67
Gráfica 18. H ₂ O ₂ HepG2	68
Gráfica 19. H ₂ O ₂ Hp	68
Gráfica 20. Ensayo con cicloheximida	70
Gráfica 21. Expresión SOD2	70
Gráfica 22. Contenido celular SOD2	72
Gráfica 23. Viabilidad Celular por rojo neutro	73

Resumen. El acetaldehído (Ac), el principal metabolito de la oxidación del etanol, es un compuesto altamente reactivo involucrado en la inducción del daño hepático durante el consumo de alcohol. En el presente trabajo se estudia el efecto de este agente en la funcionalidad mitocondrial. Los hepatocitos o las mitocondrias se aislaron de ratas machos Wistar y fueron expuestos a la presencia de Ac por periodos menores a 24 h. Este tratamiento disminuyó el control respiratorio en más del 50% con una disminución asociada de los niveles de ATP (28.5%). Estos resultados sugirieron que el Ac podría inducir cambios en el estado redox celular. Se determinaron los niveles de proteínas oxidadas, la actividad de SOD2, Cat y GSHPx así como el cociente GSH/GSSG; estos análisis indicaron que el Ac indujo un aumento en la oxidación de proteínas, una disminución acentuada de la actividad de SOD2 (90%) y en el cociente GSH/GSSG (36%). Los datos evidenciaron que el Ac induce cambios en el estado redox de la célula probablemente como resultado de su acción sobre la mitocondria lo que podría limitar la capacidad de respuesta de la célula a una segunda agresión de tipo oxidativo. Con el fin de estudiar esta posibilidad los hepatocitos fueron pretratados con Ac para posteriormente ser sometidos a la presencia de antimicina A, un potente inductor de estrés oxidativo. Este experimento reveló una disminución de la viabilidad celular, determinada con el ensayo de rojo neutro, en comparación con las células que únicamente fueron tratadas con Ac. Nuestros datos demuestran que el Ac tiene efectos deletéreos sobre la funcionalidad mitocondrial modificando el estado redox lo que sensibiliza a las células a un segundo insulto de tipo oxidativo lo que puede contribuir al desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.

Abstract. Acetaldehyde (Ac), the main metabolite of ethanol oxidation, is a very reactive compound involved in alcohol-induced liver damage. In the present work we studied the effect of Ac in mitochondria functionality. Mitochondria from Wistar rats were isolated and treated with Ac. Ac decreased respiratory control 50% which was associated with a decrease in ATP content (28.5%). These results suggested that Ac could be inducing changes in cell redox status. We determined protein oxidation, superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione ratio, indicating that Ac induced an enhanced oxidation of proteins, and a decrease in SOD activity (90%) and, GSH/GSSG ratio (36%). The data suggested that Ac-induced oxidative stress mediated by mitochondria dysfunction can lead cell sensitization to a second oxidative challenge. We pretreated hepatocytes with Ac followed of a treatment with antimycin A, this experiment revealed that a noticeable decrease in cell viability, determined by neutral red assay, in comparison with cells treated with Ac alone. Our data demonstrate that Ac impairs mitochondria functionality generating oxidative stress that sensitizes cells to a second damaging signal contributing in the development of alcoholic liver disease.

INTRODUCCION

El hígado.

El hígado es el mayor órgano del cuerpo y es esencial para mantener la homeostasis del organismo. Este órgano elimina y neutraliza las sustancias tóxicas a las que nuestro organismo se ve expuesto; además, elimina las bacterias que ingresan a la sangre y produce agentes inmunitarios esenciales para controlar las infecciones. El hígado produce las proteínas que regulan la coagulación así como la bilis para ayudar a absorber las grasas y las vitaminas liposolubles, entre otras muchas funciones (Gútierrez-Ruíz MC, 2002).

La cirrosis es una enfermedad hepática crónica que afecta la función del órgano; cursa con lesión hepatocelular, fibrosis y la formación de nódulos de regeneración. En nuestro país, la cirrosis se encuentra entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad; los principales agentes etiológicos de esta enfermedad son los virus de la hepatitis B y C, la exposición a diversos agentes químicos incluidos algunos fármacos así como el consumo crónico de alcohol (Campollo O, 1997).

Metabolismo del etanol.

El etanol (EtOH) ingerido inicia su proceso metabólico en la mucosa gástrica donde se absorbe entre un 20 y 30% vía difusión simple. El EtOH es metabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa

(ADH) particular de este órgano y durante esta fase es oxidado a acetaldehído (Ac) (Riveros-Rosas H, 1997). Se ha sugerido que los bajos niveles de esta enzima gástrica en las mujeres es la causa del incremento en la susceptibilidad de desarrollar enfermedad hepática alcohólica grave. El resto del EtOH es canalizado hacia el duodeno donde se absorbe y se dirige a la vena porta para llegar al hígado (Riveros-Rosas H, 1997).

El EtOH se metaboliza principalmente en los hepatocitos (Hp), las células parenquimatosas del hígado. Existen tres sistemas enzimáticos en el hepatocito encargados del catabolismo del EtOH: el sistema de la ADH, el sistema oxidativo microsomal (MEOS por sus siglas en inglés) y la catalasa (Cat) (figura 1).

El sistema de la ADH es la principal vía de la oxidación del EtOH, oxidando cerca del 90% del EtOH ingerido. La ADH humana existe en por lo menos 20 isoformas diferentes codificadas por 7 genes independientes (Seitz HK, 2007).

En este sistema el EtOH es transformado en Ac, para lo cual necesita como aceptor de protones una molécula de nicotín-adenín dinucleótido oxidado (NAD^+) para dar lugar a Ac, NADH y un protón (figura 1-A).

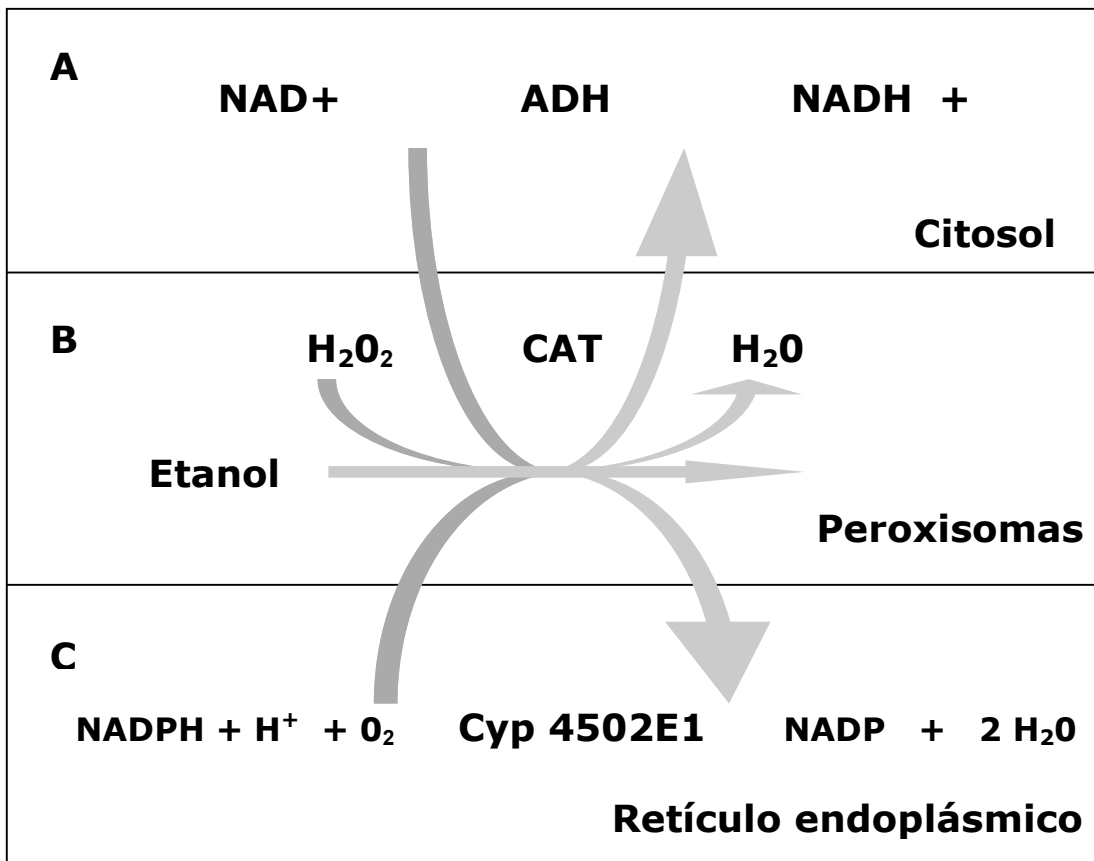


Fig 1. Vías Metabólicas del Etanol. (A) La alcohol deshidrogenasa (ALD) transforma el etanol en acetaldehído con mediación del nicotina adenin dinucleotido (NAD⁺), esta reacción ocurre en el citosol. (B) La catalasa cataliza la misma reacción pero requiere de peróxido de hidrógeno. (C) El citocromo P450 2E1 metaboliza el etanol en presencia de NAD fosfato (NADPH) y oxígeno molecular.

Si bien el sistema de la ADH es la vía principal de destoxificación del EtOH, se ha demostrado que en la ingesta crónica la actividad de la enzima disminuye y que es el MEOS inducible por el EtOH el encargado de su oxidación en este caso. El citocromo específico para metabolizar esta reacción es la isoforma 2E1 del citocromo P450 (Cyp P450 2E1) (Lieber, 1984; Nomura, 1983).

El sistema MEOS cataliza la reacción en presencia de oxígeno y nicotín-adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) produciendo Ac, NADP^+ y peróxido de hidrógeno (Riveros-Rosas H, 1997). Este sistema oxidativo no solo promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), además modifica el estado redox celular por lo que puede generar estrés oxidativo (figura 1-B) (Lu Y, Cederbaum AI, 2008).

La tercera ruta para la oxidación enzimática del EtOH es la catalasa presente en los peroxisomas. En este sistema, el EtOH se oxida utilizando peróxido de hidrógeno y se obtienen como productos Ac y agua (figura 1-C). Lieber (2000) reporta que la participación de esta vía en el metabolismo del EtOH ingerido es de menos del 2% por lo que se considera que contribuye en forma mínima.

Finalmente, existen otras rutas no enzimáticas para el metabolismo del EtOH en las que por medio del fierro y utilizando al peróxido de hidrógeno como agente oxidante el EtOH es transformado a Ac; sin embargo la oxidación por estos sistemas participan de forma poco significativa al metabolismo del EtOH.

Toxicidad del etanol.

La toxicidad ejercida por el EtOH puede atribuirse a varios factores; por un lado la deficiencia en el metabolismo de lípidos y la inducción de citocinas, y por otro lado la generación de Ac y la formación de ROS, estos últimos resultan importantes pues llevan a la modificación del estado redox celular (Diluzio NR, 1965, Klotz U, 1998). La mayor parte de estos mecanismos de daño están

mediados directamente por el Ac, el cual resulta ser más tóxico que el EtOH mismo (Mantena SK, et al, 2007).

En cuanto al efecto del EtOH y del Ac en el sistema antioxidante celular, han sido descritas modificaciones en la actividad de enzimas antioxidantes y en los niveles de moléculas cuya función es la defensa ante agresiones oxidativas (Husain k et al, 2005; Oh S et al, 1998; Venkatraman A et al, 2004). Incluso existe un trabajo de Szuster-Ciesielska (2002) en el que se demuestra que existen varios parámetros de estrés oxidativo elevados en la sangre de pacientes con cirrosis alcohólica.

Adicionalmente, algunas publicaciones muestran que el consumo crónico de EtOH altera la función mitocondrial así como el metabolismo de lípidos en la mitocondria (Cunningham CC, 2001; Cederbaum AI, 1975).

Toxicidad del acetaldehído.

El Ac es una molécula altamente reactiva, para su destoxificación es metabolizada principalmente por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) que la transforma en acetato. Se ha propuesto que la mayor parte del metabolismo del Ac ocurre en la mitocondria (Yoshida A, 1998; Niemela O, 2001).

El Ac puede formar aductos con proteínas, glicoproteínas y fosfolípidos de membranas (Niemela O, 2005), principalmente con residuos de lisina, aunque también puede formarlos con tirosina y

cisteína. El resultado de este proceso es un desajuste en algunas funciones celulares. Los aductos formados con las proteínas actúan como neoantígenos y esto genera un daño indirecto ya que se promueve la activación del complemento.

Dado que la formación de dichos complejos Ac-proteína se incrementa con el consumo crónico de EtOH este es uno de los mecanismos de generación de daño inducido por EtOH (Hill GE, 1998).

Algunos estudios demuestran que el Ac se une covalentemente a la membrana de los Hp, a proteínas citosólicas, al Cyp P450, a la tubulina, a la actina, a la albúmina, a la hemoglobina y a las ARNasas, lo que impide el funcionamiento normal de estas proteínas y altera su estructura (Niemela O, 1999; Niemela O (2), 1999).

Existen muchos estudios en los que se ha descrito como el Ac en un esquema de exposición crónica incrementa el estrés oxidativo directamente al promover la formación de peróxido de hidrógeno y la lipoperoxidación (LPO) y de manera indirecta por disminuir los niveles de glutatión (GSH) en la mitocondria (García-Ruiz C, 2000). Además, el Ac puede modificar la actividad celular por la activación de factores de transcripción que responden a cambios en el estado redox celular como el factor nuclear κ B (NF κ B) y la proteína activadora 1 (AP1) (Roman J, 2000).

Enfermedad hepática alcohólica.

El EtOH y sus metabolitos resultan ser deletéreos para el hígado y como resultado de una ingesta crónica del EtOH se genera un estado patológico denominado enfermedad hepática alcohólica (EHA).

En la actualidad se conceptualiza a esta enfermedad como un proceso de gran complejidad en el que intervienen prácticamente todos los tipos celulares hepáticos (Stewart S, 2001); a pesar de la dificultad que plantea estudiar un fenómeno de este tipo, en los últimos años ha habido grandes avances en la comprensión de los mecanismos de daño involucrados en la EHA (Fernández-Checa, 2003; Webb C, 2008). Sin embargo, poco se conoce aún sobre el efecto del Ac en exposiciones menores a 24h (tiempos cortos de exposición) sobre los hepatocitos y en particular en su efecto en el estado redox celular.

Mitocondria: especies reactivas de oxígeno.

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS; estos se definen como cualquier especie atómica o molecular de oxígeno con uno o más electrones desapareados. Los ROS son agentes químicos altamente reactivos. El desbalance entre la producción de estas especies y el sistema antioxidante existente en las células origina un exceso de oxidantes que puede tener serias repercusiones en el estado fisiológico celular (Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, 2005). A este estado fisiológico se le denomina estrés oxidativo.

Uno de los principales ROS presentes en las células es el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), este se produce de manera natural en todas las células aeróbicas ya que si bien la respiración mitocondrial es sumamente eficiente, alrededor del 3% de las moléculas de O_2 no forman agua, en lugar de ello se genera este radical libre. El radical superóxido también se puede generar en reacciones catalizadas por la xantina oxidasa así como por los procesos catalizados mediante el Cyp P450.

Como mecanismo de defensa antioxidante este radical puede transformarse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) vía la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Boveris A, 1973). Sin embargo, se ha propuesto que posterior a la formación del peróxido de hidrógeno puede ocurrir un rompimiento homolítico del enlace O-O produciéndose dos radicales hidroxilo ($OH^{\cdot}$) con la participación de metales de transición como el fierro y el cobre por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 2) (Halliwell B, 1984).

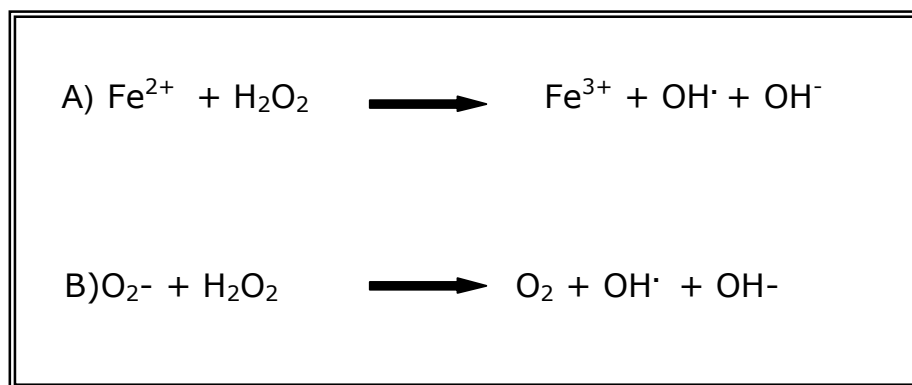


Fig 2. Reacciones de Fenton (a) y Haber-Weiss (b). Se esquematizan las reacciones por las que los metales pesados pueden participar en la formación de radicales hidroxilo.

El radical hidroxilo es altamente reactivo e inestable. Reacciona con cualquier molécula que se encuentre cerca de él sin preferencias, la principal defensa celular contra él es evitar su formación.

Los ROS en general, y el radical hidroxilo en particular, pueden reaccionar con moléculas orgánicas reducidas, en especial las que contienen dobles enlaces como los lípidos insaturados, proceso que se denomina lipoperoxidación (LPO); este daño conlleva a la pérdida de la permeabilidad y fluidez de la membrana, lo que termina siendo fatal para la célula. Las reacciones posteriores que involucran a los peróxidos lipídicos, pueden liberar otros compuestos como alcanos y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal), por medio de una ruptura catalizada por Fe^{2+} . Asimismo, los ROS pueden reaccionar con proteínas modificando su estructura y funcionalidad lo resulta en un grave daño celular (Berlett B, 1997; Mantena SK, 2007, Gopalakrishna R, 1987).

Sistemas antioxidantes.

Con el fin de contrarrestar el exceso de ROS la célula posee un sistema de defensa el cual se compone de elementos enzimáticos entre los que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (Cat); y por elementos no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH) y las vitaminas C, E y A (Koch OR, 2004).

La enzima SOD es la primera que actúa en la destoxificación de ROS; se encarga de la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno. Existen 3 isoformas de la enzima SOD: una asociada

a cobre y zinc, que se encuentra en el citosol y en el espacio intermembranal de las mitocondrias (SOD1); otra isoforma utiliza como cofactor un átomo de manganeso, esta enzima se localiza en la matriz mitocondrial (SOD2); finalmente existe otra isoforma que se localiza en el espacio extracelular denominada SOD3.

La GPx es una enzima citosólica que emplea selenio como cofactor, su función es transformar al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua. En esta reacción participan dos moléculas de GSH que ceden dos hidrógenos formando el glutatión oxidado (GSSG) por medio de un enlace disulfuro. El GSH se regenera a partir del GSSG por medio de la glutatión reductasa (GRd) en presencia de NADPH, este ciclo permite reutilizar esta molécula.

Finalmente la catalasa, enzima confinada a los peroxisomas transforma también al peróxido de hidrógeno en agua por dismutación (Figura 3).

Agentes antioxidantes no enzimáticos.

El glutatión (GSH) es un tripéptido (glutamil-cisteínil-glicina) que existe en altas concentraciones, del rango de nanomoles, en todas las células. Si bien su síntesis se realiza exclusivamente en el citosol, su distribución celular en general es de 80-85% en citosol y el resto en mitocondria (Meister A, 1994).

Para la síntesis del GSH se requiere realizar dos reacciones secuenciales dependientes de adenosin trifosfato (ATP), mismas

que catalizan las enzimas γ -glutamylcystein sintetasa y la GSH sintetasa (Fernández-Checa, 1997).

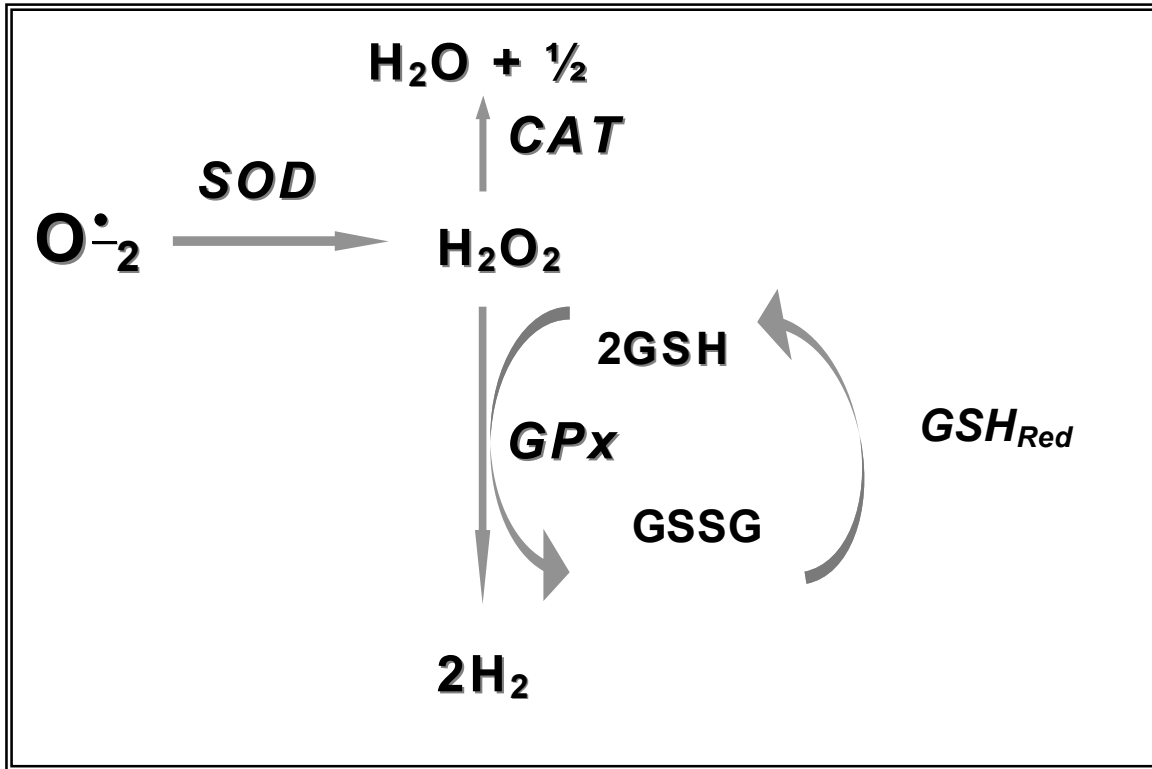


Figura 3. Metabolismo del anión superóxido. Abreviaturas: SOD superóxido dismutasa, CAT catalasa, GSH glutatión reducido, GSSG glutatión oxidado, GPx glutatión peroxidasa, GSHRed glutatión reductasa. Se esquematizan las reacciones por las que es posible eliminar al radical superóxido.

El GSH es el principal agente hepatoprotector ya que neutraliza ROS por medio de su grupo sulfhidrilo, además sirve como sustrato para la destoxificación del H_2O_2 por la GPx (Shen H. 2002).

Se sabe que en gran medida, el daño producido por los ROS se debe a una disminución del GSH, ya sea por una deficiencia en la síntesis *de novo* o por una inapropiada restauración del GSSG. La

síntesis del glutatión se encuentra reducida durante la ingesta crónica de EtOH ya que el Ac interactúa con aminoácidos precursores de esta molécula pues forma aductos con ellos (Fernandez-Checa J, 1993; Lash LH, 2006).

No obstante que los ROS están íntimamente ligados con la progresión de la EHA y pueden ser considerados como agentes precursores de daño celular, también están asociados a diferentes procesos celulares que se desarrollan como parte de la fisiología normal del organismo. Los ROS son esenciales para que se lleven a cabo adecuadamente la apoptosis, el crecimiento y la diferenciación celular (Antunes F, 2001; Powis G, 1997; Monterio HP, 1996; Heffetz D, 1992; Guyton KZ, 1996), incluso la regulación de los mecanismos de señalización celular puede estar mediada por la presencia de ROS (Kamata H, 1999; Konishi H, 1997; Suzuki YJ, 1997). Una regulación fina entre la producción de ROS y su eliminación es necesaria para el adecuado funcionamiento celular, por ello, los fenómenos en los que este control se encuentre comprometido puede tener serias consecuencias para el funcionamiento celular.

Efecto del etanol y el acetaldehído en la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.

Estudios recientes sugieren que la mitocondria puede ser una fuente importante de ROS en Hp expuestos a EtOH aguda o crónicamente (Tanikawa K, 2006). Algunas observaciones indican que la habilidad de este para incrementar la producción de ROS se

asocia con su metabolismo y con la capacidad de alterar el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria. Más aún, la exposición crónica al EtOH ha mostrado causar efectos deletéreos en los sistemas antioxidantes de los distintos modelos empleados, desde cultivo celular hasta babuinos (Arai M, 1984; Segel L, 1984; Vendemiale G, 1998).

La modificación oxidativa y la inactivación de proteínas mitocondriales podría ser un mecanismo mediante el cual el EtOH perturbe la estructura y función de la mitocondria y contribuya a la patología observada en el hígado de pacientes alcohólicos (Cahill H, 2002), sin embargo este fenómeno no ha sido descrito con precisión.

Cuando un individuo consume cantidades moderadas de EtOH, la mayoría de este es catabolizado por la enzima ADH hepática, como resultado se genera Ac y NADH. El Ac es oxidado por la ADH a acetato, resultando también en la producción de NADH. Por lo tanto, se presenta un aumento significativo en las concentraciones de NADH citosólico y mitocondrial, lo que estimula el flujo de equivalentes reducidos en la cadena transportadora de electrones (Sastre J, 2007).

Estudios realizados por Bailey y col. (2001), han demostrado que la mitocondria es una fuente significativa de ROS cuando los Hp son incubados con EtOH. El metabolismo del EtOH se requiere para el incremento de las ROS, ya que el pretratamiento con 4-metilpirazol, inhibidor de la ADH, atenúa esta inducción. Del mismo modo la cianamida, inhibidor de la ALDH, también suprime

el incremento de ROS. Estas observaciones enfatizan que la producción de estos radicales ocurre en presencia de dosis agudas de EtOH lo que podría relacionarse con modificaciones temporales del estado redox celular. Sin embargo no existen estudios que discriminen entre el metabolismo del EtOH y la presencia de Ac en el medio.

Se ha resaltado el efecto de la exposición crónica de alcohol en los mecanismos antioxidantes que protegen a los Hp del daño oxidativo. Se ha sugerido que el incremento de ROS en presencia de EtOH está ligado al decremento en la actividad de la glutatión peroxidasa-1. La ingesta crónica con EtOH reduce significativamente la actividad de esta enzima un 40% (Bailey SM, 1998), esto implica que parte del efecto tóxico del EtOH o del Ac podrían ocurrir por la modificación de la actividad de enzimas antioxidantes.

Las ROS son capaces de oxidar proteínas mediante el ataque a diferentes residuos de aminoácidos específicos generando grupos carbonilos (Berlett S, 1997). El consumo crónico de EtOH aumenta significativamente la concentración de carbonilos protéicos en el hígado (Bailey SM, 2001). El aumento de ROS relacionado al EtOH puede inactivar proteínas mitocondriales, afectando su funcionalidad (Bulteau AL, 2006).

El Ac se genera en la célula en un estado en que el balance redox esta modificado o en un franco proceso de estrés oxidativo. Se ha descrito que la administración crónica de EtOH y de Ac induce modificaciones en el estado redox celular y que este efecto puede

estar relacionado con una disminución en la funcionalidad mitocondrial (Han D, 2006; Kakkar P, 2007). A pesar de ello pocos estudios se han realizado para comprender como tratamientos agudos con Ac podrían estar involucrados en la aparición de estrés oxidativo en los Hp o como podría un tratamiento de estas características afectar la actividad mitocondrial de los Hp.

Para poder estudiar el efecto tóxico del Ac deben emplearse modelos celulares que permitan el estudio a tiempos cortos de los diversos parámetros involucrados en este fenómeno. Resulta importante realizar estudios por los que sea posible determinar si el Ac *per se* puede modificar la fisiología celular de manera que la respuesta de la célula a nuevas agresiones de tipo oxidativo se encuentre limitada, como en el caso de una ingesta continua de EtOH.

Modelo celular.

La valoración de los efectos que produce un agente químico es difícil de determinar en un modelo animal debido a que la presencia de los diferentes sistemas homeostáticos no permite una evaluación directa del fenómeno. Por ello el estudio de los efectos tóxicos del EtOH y del Ac se facilita en sistemas de cultivo celular de hepatocitos *in vitro* (Yang SS, 2005). Entre ellos existen varias opciones como son los hepatocitos de cultivo primario (Hp) de rata y las líneas celulares. Los estudios de citotoxicidad basados en estos modelos pueden proveer información acerca de la potencia y mecanismos de acción de xenobióticos con un mayor número de

parámetros cuidadosamente controlados (Porquet P, 1992; Dierick NA, 1989).

Las principales diferencias entre ambos modelos es que el cultivo primario de hepatocitos mantiene por un tiempo limitado (horas o días) prácticamente todas las funciones de un Hp en el hígado pero son inestables, es decir, van perdiendo funciones conforme el tiempo de cultivo aumenta por lo que la actividad de diversos sistemas enzimáticos no son constantes en el tiempo. Las líneas celulares usualmente han perdido diferentes funciones pues son células que tienen algún grado de dediferenciación, no obstante muestran una gran estabilidad en su actividad metabólica (Donato MT, 2008). Además puede señalarse que los Hp de cultivo primario mueren por apoptosis por lo que el tiempo que las células permanecen viables es muy limitado y el número de células que se obtienen también lo es; las líneas celulares son fácilmente cultivables y pueden proliferar hasta obtener la cantidad deseada de células.

Entre las líneas de origen hepático se encuentran las células HepG2. Esta línea establecida desde 1979 fue derivada de un hepatoblastoma humano. Esta línea celular exhibe muchas de las características de un hepatocito normal aunque ha perdido la capacidad de metabolizar el EtOH tanto por el mecanismo de la ADH como por el Cyp P450. Sus características morfológicas y forma celular epitelial son comparables con las células del parénquima hepático. Así mismo presenta la síntesis de diversas proteínas hepáticas, como la albúmina, la transferrina, lipoproteínas, fibrinógeno y algunos factores de coagulación (Kelly H, 1989).

Las líneas celulares humanas derivadas de hepatoblastomas han sido propuestas como alternativa para los modelos celulares de cultivo primario en el estudio de metabolismo de xenobióticos. Las ventajas potenciales de células de hepatoma son que en una línea celular se obtienen poblaciones celulares en grandes cantidades, son propagadas fácilmente y pueden crioconservarse con éxito. Respecto al metabolismo de ciertos fármacos, la actividad de las enzimas no disminuye durante el tiempo de cultivo, como pasa con cultivos primarios de Hp (Duthie SJ, 1994). Las células HepG2 han sido extensamente utilizadas para estudiar funciones hepáticas que incluyen la síntesis de lípidos (Wang SR, 1988), el metabolismo del grupo hemo (Visser O, 1991; Krijt J, 1993) y el estudio de metabolismo de xenobióticos (Roe AL, 1993). Por estas razones se considera que tanto los Hp como la línea celular HepG2 son modelos adecuados para el estudio de la toxicología hepática.

HIPÓTESIS

La exposición a Acetaldehído por tiempos menores a 24 h (tiempos cortos) será capaz de inducir daño mitocondrial en los hepatocitos, daño que generará una disminución en la capacidad antioxidante de las células sensibilizándolas a un nuevo reto de estrés oxidativo.

OBJETIVOS

O. General.

Determinar el efecto del Ac a tiempos cortos de exposición (menores a 24h) sobre la funcionalidad mitocondrial y su relación con la capacidad antioxidante de los hepatocitos.

O. Particulares.

Determinar el efecto de la exposición a corto plazo de Ac sobre la funcionalidad de la mitocondria en un modelo *in vitro* de hepatocitos.

Evaluar el efecto tóxico de la exposición a corto plazo de Ac sobre el sistema antioxidante en un modelo *in vitro* de hepatocitos.

Estudiar el efecto tóxico de tratamientos a corto plazo de Ac sobre la oxidación de proteínas en un modelo *in vitro* de hepatocitos.

Determinar la capacidad de respuesta a una agresión de tipo oxidativo de un modelo *in vitro* de hepatocitos después de ser expuesto a tratamiento con Ac.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron empleando células HepG2 y Hp aislados de rata; el cultivo celular se llevó a cabo utilizando los medios William y Dulbecco respectivamente. El tratamiento aplicado fue Ac 80 μM a menos que se indique otra condición experimental. Las células fueron expuestas a este tratamiento durante diferentes tiempos desde 15 min hasta 24 h (definidos como tratamientos a corto plazo) y durante este período se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO_2 . Las botellas de cultivo con los tratamientos de Ac fueron selladas con parafilm para evitar la evaporación de este. En todos los casos las células HepG2 fueron sembradas a una densidad de 7×10^4 cel/cm² mientras que los Hp fueron sembrados con una densidad de 3×10^4 cel/cm². Terminado el tiempo de tratamiento las células se emplearon para las diferentes pruebas bioquímicas y moleculares.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de daño del Ac, la actividad de SOD2 fue determinada tanto en células como en mitocondrias sometidas a la presencia de Ac. Asimismo se determinó el efecto del Ac directo sobre la enzima mediante un ensayo Libre de Célula en el que la enzima aislada fue sometida a la presencia del agente. Todo lo referente a los métodos requeridos para cada uno de estos estudios se encuentra descrito en la sección de material y métodos de forma independiente.

Como agente inhibidor de la síntesis de proteínas se empleó cicloheximida 40mM con un esquema de exposición de 1 h previa a la administración directa al medio del Ac.

Para estudiar la sensibilización al daño por la presencia del acetaldehído se empleó Antimicina A (AA) como agente generador de estrés oxidativo. Se aplicó un tratamiento con Ac 80 μ M con una duración de 1 h, posteriormente se adicionó al medio la Antimicina A (40 μ M) durante 6, 12 y 24 h.

Todos los tratamientos se aplicaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de Hepatocitos y Cultivo Celular de HepG2.

Los Hp se aislaron de ratas macho Wistar (250 g) mediante perfusión con colagenasa como se ha descrito previamente (Villafuerte BC, 1992). Brevemente, las ratas se anestesiaron con éter y se abrió la cavidad abdominal. Se localizó la vena hepática y se canuló con un tubo de poliestireno para pasar solución Krebs-Ringer hasta que el tejido se limpiara de sangre. Se adicionaron 50 ml de krebs-Ringer que contenían 13 mg de colagenasa tipo II (276 U/mg) (Gibco) y se recirculó por medio de una bomba de perfusión durante 15 min. Una vez digerido el hígado, las células se obtuvieron mediante agitación mecánica en solución Krebs-Ringer, se realizó una separación por filtraron a través de una malla de 250 micras, las células así obtenidas se lavaron con la misma solución y se centrifugaron a 500 Xg durante 1 minuto. El proceso de lavado se repitió hasta que el botón celular apareciera libre de eritrocitos.

La viabilidad celular se evaluó con azul de tripano, rutinariamente fue superior al 90%. Los Hp de rata fueron sembrados a una densidad de 3×10^4 cel/cm² y se cultivaron en medio Dulbecco (Gibco) adicionado con 20 mU/ml de insulina, 10% de suero fetal de bovino (Hyclone), penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 mg/ml) (Microlab). Después de 2 h, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora salina de fosfatos 0.01M pH 7.4 (PBS) para remover restos celulares y se adicionó medio fresco. Las células se dejaron adherir por 24 h empleando el mismo medio, posteriormente se añadieron los tratamientos como se indica en el

diseño experimental. Todos los tratamientos se prepararon empleando medio en ausencia de suero.

Las células HepG2 (línea celular de un hepatoblastoma humano) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, HB 8065; Maryland USA) en el pasaje número 92, se cultivaron en medio William (Gibco BRL), el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (Hy-Clone), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Microlab). Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Nunc). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma) previo lavado con un amortiguador de fosfatos con EDTA al 1% (PBS-EDTA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% CO₂ y 90% de humedad con una temperatura de 37 °C.

Para los distintos experimentos las células se sembraron a una densidad de 7×10^4 cel/cm² con medio completo y se dejaron estabilizar durante 24 h antes de llevar a cabo los experimentos. Los tratamientos fueron preparados en medio sin suero.

Determinación de reducción de MTT. Viabilidad Celular.

La prueba de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil) se determinó por el método de Mosmann (1983) que se basa en la capacidad de las succinato-deshidrogenadas mitocondriales para reducir el MTT a formazan.

Las células fueron sembradas en multicámaras de 24 pozos con medio completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, después de este tiempo, las células se lavaron con PBS y se aplicó el tratamiento con Ac 80uM en medio sin suero durante 24 h. Concluido el periodo de exposición, las células se lavaron con PBS y se les adicionó 1 ml de MTT (0.5 mg/ml en PBS pH 7.5). Se incubó por 3 h a 37 °C. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS y se agregaron 500 µl de una solución de HCl 0.04 N en isopropanol. Se agitaron las placas por 15 min, para disolver el formazán. Se recuperaron 250 µl de muestra y se diluyó con 500 µl de la solución ácida de isopropanol. La absorbancia se leyó a 570 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman. La funcionalidad se determinó por el porcentaje de absorbancia de las muestras con respecto a la absorbancia de las células control.

Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.

Con el fin de estudiar la respiración aeróbica y la actividad de la enzima SOD en mitocondrias expuestas directamente a la presencia del Ac se aislaron estos organelos de hígados de ratas Wistar machos de 200 gr de acuerdo a la técnica de Adler y Lardy (1967). Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. El hígado se obtuvo y se homogenizó en PBS frío. El homogenado se filtró y se colocó en medio 1 (sacarosa 0.25 M, HEPES 5mM y EGTA 1mM, pH 7.4). Se centrifugó 10 min a 750 Xg a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó 10 min a 7 000 Xg a 4°C. Se resuspendió el botón con ayuda de un pincel con medio 1 que contenía albúmina sérica bovina (BSA) libre de grasa 1% y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se resuspendió el botón en medio 2

(sacarosa 0.25 M, HEPES 5mM, pH 7.4) y se centrifugó 10 min a 10 700 Xg a 4°C. El botón corresponde a las mitocondrias aisladas y se resuspendió en 0.5 ml de medio 2. Se guardó una alícuota para determinar el contenido de proteína. Las mitocondrias se emplearon inmediatamente para determinar el control respiratorio y la actividad de SOD2 como se explicará a continuación.

Control respiratorio (CR).

Las mitocondrias recién aisladas se mantuvieron en hielo todo el tiempo. Se determinó el consumo de oxígeno en un potenciómetro con un electrodo tipo Clark (YSI Incorporated, USA). Se colocaron 50 µl del homogenado mitocondrial previamente homogenizados en medio de respiración (230mM sacarosa, 10mM trietilamina, 5mM fosfato de potasio, 3mM MgCl₂, pH 7.4) y se fueron adicionando los reactivos de la mezcla de reacción directamente al oxímetro: glutamato (5mM) - malato (5mM), ADP (90mM) para inducir el estado de respiración III, y Ac suficiente para obtener las concentraciones finales de 20, 40 y 80 µM. Se registró en papel milimétrico el consumo de oxígeno en los estados III y IV cuyos resultados fueron calculados como nanomoles de oxígeno molecular consumidos por minuto por µg de proteína total. El control respiratorio se obtuvo dividiendo el consumo de oxígeno en los estados III / IV, como control positivo se empleo carbonilo cianida de m-clorofenilhidrazona (CCCP). Las mitocondrias restantes se emplearon simultáneamente para determinar la actividad de SOD2 según la metodología que se describirá a continuación.

Determinación de la actividad de SOD2 en mitocondrias expuestas a Ac.

Las mitocondrias obtenidas de hígado de rata fueron empleadas para determinar la actividad de SOD empleando el método de Winterbourn y cols. (1975). Las mitocondrias fueron sometidas directamente a un tratamiento con Ac a diferentes concentraciones (20, 40 y 80 μM) durante 15, 30 y 60 min. Pasado este tiempo las mitocondrias fueron sometidas a un proceso de sonicación con el fin de romper las membranas. A continuación se centrífugo a 60 000 Xg durante 60 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y con este se realizó el ensayo de determinación de SOD2. En una serie de tubos de ensaye se preparó la mezcla de reacción formada por la muestra en diferentes volúmenes desde 5 hasta 300 μl , 0.2 ml de EDTA 0.1 M, 0.1 ml de tetrazolio-nitro azul (NBT) 1.5 mM y PBS 0.067 M pH 7.8, teniendo un volumen final de 3.0 ml. Los tubos se colocaron en una cámara iluminada con lámparas fluorescentes de 15 W por un periodo de 10 min. Pasado este tiempo se agregaron a los tubos de ensaye 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM y se incubaron en la misma cámara iluminada por 20 min más. Al final de este tiempo las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 560 nm de longitud de onda. Se determinó el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT para calcular el volumen que proporciona la mitad de la máxima inhibición por la enzima. La actividad se determinó por la siguiente relación:

Unidades = $100,000/\text{Vol}$ que resulta de la mitad de la máxima inhibición

Los resultados fueron reportados como mU/mg de proteína.

Hinchamiento mitocondrial.

Se sembraron las células en botellas de cultivo de 162 cm² con medio completo, el cultivo se dejó estabilizar por 24 h a 37 °C. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS frío y con un gendarme de goma fueron levantadas. El homogenado celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador A (NaCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris 10 mM) y se dejó en hielo durante 20 minutos, posteriormente las células se lisaron manualmente empleando un homogenizador de vidrio, una vez hecho esto se colocaron 5 ml de amortiguador estabilizador B (sacarosa 70 mM, KH₂PO₄ 1 mM, succinato de sodio 5 mM, HEPES 5 mM, manitol 220 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) y el homogenado fue centrifugado a 10 000 Xg durante 5 min, este proceso se repitió 3 veces, en todos los casos el sobrenadante fue colectado. El sobrenadante total se recuperó y se centrifugó a 14 000 Xg por 20 min a 4°C. El botón resultante fue resuspendido en el amortiguador de estabilización B, se tomaron 0.05 ml para cuantificar proteína por el método de Lowry (1951). A esta suspensión de mitocondrias se adicionó el tratamiento con Ac a una concentración final de 80 µM, el ensayo se realizó por diferentes periodos de tiempo (15, 30 y 60 min) durante este ensayo los homogenados fueron mantenidos en hielo. Como control positivo se empleó Atractilosida (Atr) por su capacidad de inducir un proceso de transición de permeabilidad en la membrana mitocondrial. Posteriormente se incubaron en un amortiguador que consistió en 200 mM sacarosa, 10 mM Tris-MOPS, 5 mM succinato, 1 mM fosfato de potasio, 2 µM rotenona, 1 µg/ml oligomicina y 10 µM EGTA, pH 7.4 durante 20 minutos a 25 °C y posteriormente se registró el cambio de absorbancia a 540 nm en

el tiempo, la determinación se realizó en un espectro Beckman (Levak-Frank S et al, 1995).

Contenido de Citocromo C

Las células tratadas con Ac 80 μ M por diferentes periodos fueron lavadas con PBS y resuspendidas en un amortiguador de permeabilización (KCl 120 μ M, NaCl 10 mM, KH_2PO_4 1mM, HEPES-Tris 20 μ M, leupeptina 1 μ g/nl, pepstatina 1 μ b/ml, digitonina 40 μ g/ml, pH 7.2) por 15 min a 4 °C, terminado este tiempo se agitaron brevemente en vortex. El homogenado celular se centrifugó a 14 000 Xg por 10 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción citosólica) y el botón que contenía las mitocondrias fue alicotado y mantenido a – 80 °C hasta su uso (por no más de 30 h). Se realizó un análisis por Western Blot para el que se emplearon 30 μ g de proteína de la fracción citosólica para cada tiempo estudiado y 10 μ g de proteína de la fracción mitocondrial como control positivo. Se empleó un anticuerpo anti-citocromo c humano (Santa Cruz, Biotechnology, INC).

Contenido de ATP

El contenido de ATP se determinó empleando 4×10^6 células resuspendidas en PBS frío después del tratamiento con Ac 80 μ M. La suspensión celular y una curva de ATP fueron mezcladas con un reactivo de luciferasa ATP-dependiente (Celltiter-Glo, Promega, Madison, USA). El ATP se midió en un contador de luminiscencia (Beckman-Coulter). Para normalizar las unidades de ATP en la

muestra se determinó el contenido de proteína usando un estuche para determinación de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Pierce, Rockford IL, USA). Los resultados fueron expresaron como nmol de ATP por mg de proteína.

Actividad de la SOD2 obtenida de cultivo celular.

Las células fueron sometidas a tratamiento con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos, posteriormente se determinó la actividad de SOD2 de mitocondrias aisladas de estas células como se explica a continuación.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HEPATOCITOS DE CULTIVO PRIMARIO. Pasado el tiempo del tratamiento con Ac las células fueron lavadas con PBS frío y con un gendarme de goma se levantaron. El homogenado celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador A (NaCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris 10 mM) y se dejó en hielo durante 20 minutos, posteriormente las células se lisaron manualmente empleando un homogenizador de vidrio, una vez hecho esto se colocaron 5 ml de amortiguador estabilizador B (sacarosa 70 mM, KH₂PO₄ 1 mM, succinato de sodio 5 mM, HEPES 5 mM, manitol 220 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) y el homogenado fue centrifugado a 10 000 Xg durante 5 min, este proceso se repitió 3 veces, en todos los casos el sobrenadante fue colectado. El sobrenadante total se recuperó y se centrifugó a 14 000 Xg por 20 min a 4°C. El botón fue resuspendido en el amortiguador de estabilización B, se tomaron 0.05 ml para cuantificar proteína por el método de Lowry (1951). Esta suspensión de mitocondrias se llevó al sonicador (Ultrasonic Processor XL2020) para lisar las

mitocondrias y el homogenado fue centrifugado a 60 000 Xg durante 90 min a 4°C en una ultracentrífuga Beckman para retirar los restos de membranas. La actividad de la enzima fue determinada en el sobrenadante. La actividad de la SOD2 se determinó empleando el método de Winterbourn como ya fue descrito anteriormente (1975).

Ensayo Libre de Células.

Para analizar la posibilidad de que el Ac forme aductos con la SOD2 se realizó un ensayo libre de células que consistió en obtener un lisado total de mitocondrias que posteriormente se sometió a un tratamiento con Ac 80 μ M durante 1 h para posteriormente determinar la actividad de la enzima. Este ensayo se validó también con enzima SOD2 comercial (Sigma) sometida al mismo tratamiento.

Determinación de actividades enzimáticas citosólicas.

Actividad de la glutatión peroxidasa.

Las células fueron sometidas a tratamiento con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos, posteriormente las células fueron lavadas con PBS frío y con un gendarme de goma se levantaron. El homogenado celular se resuspendió en 1 ml de PBS frío. La actividad de la enzima GPx fue estudiado por el método de

Lawrence (1976). Se tomaron 0.5 ml de muestra a la cual se le adicionaron 0.2 ml de una mezcla de reacción compuesta por GSH 0.25 mM, H_2O_2 0.2 mM, azida de sodio 1mM, 1 U/ml de Glutación reductasa y EDTA 0.091 mM en Tris HCl 50 mM (pH 7.6). La mezcla se dejó incubar 2 min a 37°C. Después de este tiempo de incubación se agregaron 42 μl de NADPH 0.12 mM y las muestras se leyeron a 350 y 380 nm, se dejó incubar un minuto y se volvió a leer para determinar la diferencia de las absorbancias.

Actividad de la catalasa.

Las células fueron sometidas a tratamiento con Ac 80 μM durante diferentes tiempos, posteriormente las células se lavaron con PBS frío y con un gendarme de goma se levantaron. El homogenado celular fue resuspendido en 1 ml de PBS frío. La actividad de la catalasa se estudió por el método de Beers y Sizer (1952). Se tomaron 100 μl de muestra y se agregaron 1.9 ml de agua, se dejó incubar por 2 min a 25 °C, posteriormente se adicionó 1 ml de una solución de H_2O_2 59 mM en PBS 0.05 M (pH 7.0). La absorbancia de la muestra se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 240 nm en el espectrofotómetro, se repitió la lectura pasado un minuto. Se obtuvo la diferencia de absorbancias en el tiempo para evaluar los cambios en la absorbancia.

Contenido de glutatión.

Se sembraron las células en botellas de cultivo de 125 cm^2 con medio completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h,

posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se adicionaron los diferentes tratamientos en medio sin suero; al término de la incubación con Ac se retiraron los medios y se lavaron las células con PBS frío para levantar las células con un gendarme de goma y estas fueron resuspendidas en 0.6 ml de PBS. La determinación de GSH y GSSG se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un equipo Beckman comparando con curvas estándares de ambos agentes. El homogenado celular fue derivatizado como se explicará a continuación: brevemente, el lisado celular fue tratado con ácido tricloroacético 10% (1:1, v/v) y se centrifugó 13 000 Xg por 5 minutos, los sobrenadantes (0.5 ml) fueron incubados con 100 µl de ácido iodoacético (100 mM) y el pH se ajustó a 8.5-9.0. Se mezcló un volumen de 0.5 ml de dinitrofluorobenceno (1.5% en etanol) que fue adicionado a la mezcla, esta fue incubada a 4°C por 18 h. Antes de analizar por HPLC, la mezcla se centrifugó a 13 000 Xg por 2 min, y el sobrenadante se inyectó dentro de una columna de 3- amino propiril-Spherisorb de 20 cm, 4.6 mm, 5µm (fase reversa/intercambio iónico). La detección se llevó a cabo empleando dos fases móviles, la fase 1 consistió de metanol 80% y la fase 2 de acetato sódico 0.5M en metanol 64%. Las muestras se corrieron en el HPLC con un flujo constante de 1.5 ml por min según el siguiente esquema: del minuto 0 al 8 la proporción de la fase móvil fue de 80% de la fase 1 y 20% de la fase dos; del minuto 8 al 33 se aplicó un gradiente que cambió las proporciones de la fase 1 a 1% y de la fase 2 a 99%, posteriormente del minuto 33 al 48 la fase móvil mantuvo una relación de 80% de fase 1 y 20% de fase 2. Este procedimiento permitió estudiar la oxidación

de GSH a GSSG utilizando estándares de GSH (1mM) y de GSSG (1 mM).

Niveles de H₂O₂.

Los niveles de peróxido de hidrógeno fueron analizados empleando 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂, Molecular Probes) que es un marcador fluorescente que se activa en presencia de peróxido de hidrógeno. El DCFH₂ se adicionó a las células en suspensión (1×10^6) durante 15 min y posteriormente se hizo el análisis de la fluorescencia por medio de un citómetro de flujo (Becton-Dickinson FACScan), el análisis de los resultados se realizó con el programa CELLQuest como se ha descrito anteriormente por Bass et al. Brevemente, la técnica se basa en la oxidación de 2,7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) el cual no es fluorescente a DCF (producto verde fluorescente) en presencia de peróxidos en las células vivas. Se sembraron las células en cajas Petri, dejándolas crecer por 24 horas, después de este tiempo las células fueron lavadas con PBS y posteriormente fueron tratadas con Ac (80 μ M), por 30, 60, 120, 240 y 360 min. Las células se lavaron con PBS para retirar los tratamientos y fueron levantadas con tripsina-EDTA al 25%. Posteriormente el DCF-DA se adicionó a las células a una concentración final de 20 μ M por 15 min a 37°C en oscuridad. Inmediatamente el índice de fluorescencia (IF) de DCF se determinó en un citómetro de flujo FACScalibur (BD) a 529 nm/503 nm (emisión/excitación).

Determinación del grado de lipoperoxidacion.

El grado de lipoperoxidación se determinó por el método de Buege y Aust (1978) el cual se basa en la formación de malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. Las células fueron sembradas con medio completo, se dejó estabilizar el cultivo 24 h. Pasado este tiempo se expusieron las células a Ac 80 μ M en medio sin suero, a continuación se retiraron los medios con el Ac y se lavaron las células con PBS y se levantaron con un gendarme de goma. Se resuspendieron en 1 ml de solución salina isotónica y se lisaron en un sonicador (Ultrasonic Processor XL2020). De este lisado se tomó 0.1 ml para una determinación posterior de proteína. A la muestra restante se le adicionaron 2 ml de una solución reactiva compuesta por ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0.5% y HCl 0.25 N. Las muestras se agitaron vigorosamente y se incubaron en un baño de agua a 100°C durante 30 min. Se dejaron enfriar y se centrifugaron a 1 500 Xg por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 535 nm de longitud de onda. La concentración de MDA se determinó de la relación: $C=A/\epsilon l$. Dónde: C = concentración de MDA, A = Absorbancia, ϵ = Coeficiente de extinción molar (1.56×10^5 cm / M), l = grosor de la celda. Los resultados se expresaron en nmol de MDA / mg de proteína.

Oxidación de proteínas.

La modificación oxidativa de proteínas genera grupos carbonilos que representan un parámetro del estatus de oxidación protéica. Estos grupos carbonilos se inmunodeterminaron por medio del

estuche comercial Oxyblot (Chemicon) siguiendo el protocolo del fabricante.

Western Blot de SOD2.

El Western blot se llevo a cabo como se describe a continuación, 5×10^6 células se resuspendieron en amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas M-PER complete (Pierce). Posteriormente se centrifugaron a 14 000 Xg durante 20 min a 4°C. En el sobrenadante recuperado se cuantificó la proteína por el método de Lowry (Lowry OH, 1951). Se corrió la proteína en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% a 100 V por 1 h. La proteína total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La membrana fue bloqueada con TBS-Tween 20-leche 5% por 1 h, después se lavó con TBS-Tween 20 y se le agregó el anticuerpo primario monoclonal contra SOD2 (Santa Cruz, Biotechnology, INC). Se lavó con TBS-Tween 20 y se le agregó el anticuerpo secundario (anti-ratón IgG,) acoplado a peroxidasa por 1 h. Finalmente la membrana se lavó con TBS y se reveló con el Estuche SuperSignal® West Pico Substrate (Pierce). Las bandas se cuantificaron por densitometría.

Aislamiento de ARN total.

El aislamiento de ARN total se llevó al cabo empleando la técnica de Chomczynski (1993). Se sembraron las células a las confluencias correspondientes a cada tipo celular por cada tratamiento, después de 24 h se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS. Posteriormente se les agregó 1 ml de Trizol por cada 1×10^6

células y se levantaron con un gendarme de goma estéril. Las células se pasaron a un tubo eppendorf en donde se les dejó reposar 20 min a temperatura ambiente y se les agregó 0.5 ml de cloroformo, se agitó el tubo por 15 segundos y se centrifugó 10 min a 10 000 g a 4°C. La fase acuosa (superior) fue recuperada, se agregaron 500 µl de isopropanol, se dejó reposar por 12 min, se centrifugó por 10 min a 10 000 xg. Se decantó y el precipitado se lavó con EtOH al 70%, a continuación se centrifugó por 5 min a 10000 g. El precipitado de ARN se secó al vacío y se resuspendió la pastilla de ARN en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%. Finalmente se cuantificó el ARN por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. Usando la siguiente relación: Concentración de ARN = (D.O. 260) (40) (factor de dilución) lo que da la concentración expresada como mg/ml.

Transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa. (RT-PCR).

EL RT-PCR se realizó usando un ensayo comercial (GeneAmp, Perkin Elmer). Para la transcripción reversa (RT) se tomaron 1.5 µg/µl de ARN total de cada tratamiento y se agregaron 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de ATP 10 mM; 1 µl de GTP 10 mM; 1 µl de CTP 10 mM; 1 µl de TTP 10 mM; 0.5 µl de inhibidor de ARNasa a una concentración de 10 U/L, 0.5 µl de oligo d(T) 5 nM; 0.5 µl de transcriptasa reversa a una concentración de 50 U/L y 1 µl de un amortiguador para PCR 10X que contenía: 10 mM de KCl; 200 mM TRIS-HCl; pH 8.8, 100 mM de (NH₄)₂ SO₄; 10% Triton X y 100 g/ml de BSA. La mezcla se llevó a reacción en un termociclador (Perkin

Elmer 480) y se incubó a 37 °C por 60 min seguidos de 5 min a 95 °C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó al cabo utilizando el ensayo comercial anteriormente mencionado. A 3 µl del ADN complementario (ADNc) que se obtuvo en la reacción de RT, se le agregaron 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 4µl de Amortiguador PCR 10X descrito anteriormente; 31.75 µl de agua estéril; 0.25 µl de DNA polimerasa (AmpliTaqaDNA polimerase, Perkin Elmer) a una concentración de 5 U/L y 2.5 µl de los oligonucleótidos siguientes: para SOD2 el oligo sentido fue 5'- AATCCGTGTGACTTG CAT-3' y el oligo antisentido fue 5'- GGCTGACGTACTATT -3', a una concentración de 10 µM. La mezcla se llevó a reacción al termociclador con las siguientes condiciones. 74 °C ,1 min; 63 °C, 1 min; 92 °C,1 min por 35 ciclos. Para β2 microglobulina, que se empleó como sonda interna, se usaron los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'-GAT GCT GCT TAC ACG-3', antisentido 5'- CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3', a una concentración de 10 µM con las siguientes condiciones: 74 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 92 °C, 1 min por 35 ciclos.

Los ADNc amplificados se identificaron en geles de Agarosa al 1%. Se disolvieron 0.60 g de agarosa en 40 ml de TBE 0.5 X y se agregaron 4.5 µl de una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 g/l. Se pusieron 5 µl de ADN con 2 µl de amortiguador de carga (LB) (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y ficoll 15%) en los pozos del gel y se corrió en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) a 100 Volts por 30 min Los

geles se observaron en un analizador de geles (Phosphor Imager). Bio Rad).

Funcionalidad Celular. Rojo Neutro.

La tinción de rojo neutro permitió evaluar la incorporación supravital de este agente a los lisosomas. El monto de tintura se cuantificó espectrofotométricamente y se comparó con los controles como describió Borenfreund y Puerner (1986). Brevemente, 6×10^4 células se sembraron en multicámaras de 4 pozos y el cultivo se dejó estabilizar durante 24 h. Posteriormente se adicionaron los tratamientos con Ac 80 μ M durante 1 h en medio sin suero, subsecuentemente se adicionó Antimicina A (40 mM) durante 6, 12 y 24 h a una unidad experimental. Terminados los tratamientos se cambio el medio por otro que contenía rojo neutro (40 μ g/ml). Un pozo con células control recibió medio sin rojo neutro para servir como blanco. Se incubó por 2h y se lavó dos veces con una solución de formaldehído 4%/cloruro de calcio 1%. Posteriormente se adicionó 0.5 ml de ácido acético 1% en etanol 50% para extraer la tintura de los lisosomas. La absorbancia se leyó a 540 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto al control.

Determinación del contenido de proteína.

El contenido de proteína en las muestras se determinó por el método de Lowry y cols. (1951). Se preparó una solución A (carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio 0.1 N y tartrato de sodio-potasio al 0.02%) y la solución B se preparó con sulfato de cobre al 0.5%, se mezclaron ambas soluciones 1:10 (solución

A:solución B) para obtener la que denominamos Solución C. A una alícuota de la muestra se le adicionaron 5 ml de la solución C y 0.5 ml de Folín (Sigma) 1 N y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Subsiguientemente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Para determinar la concentración de proteína de las muestras problemas se realizó una curva estándar de BSA a concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 mg/ml.

Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba no paramétrica de Tukey. Se empleó para el análisis el programa SPSS 7.0. El nivel de significancia fue considerado para valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Funcionalidad celular determinada por MTT.

Para evaluar la toxicidad del Ac tanto en células HepG2 como en Hp se determinó la capacidad de reducir el MTT a formazán, este parámetro es un indicativo de la funcionalidad de las succinato deshidrogenasas mitocondriales y es considerado un buen parámetro de la funcionalidad celular en general. En la tabla 1 se muestran los resultados de la reducción del MTT a las 24 h. Las células HepG2 no mostraron una diferencia significativa en la funcionalidad mitocondrial mientras que en el caso de los Hp hubo una reducción estadísticamente significativa de la funcionalidad mitocondrial de un 27%.

	HepG2	Hp
Control	100	100
Acetaldehído	82±3.7	73±5

Tabla 1. Reducción del MTT a formazán por las células expuestas por 24 h a Ac 80 μ M. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ el error estándar (E.S.) del porcentaje de la absorbancia de las muestras tratadas con Ac con respecto a la absorbancia de las muestras de las células control. * $p \leq 0.05$ con respecto al control.

A pesar de que se presentó una reducción de la funcionalidad celular como resultado de la exposición al Ac se consideró que la concentración empleada era adecuada para realizar los experimentos propuestos en este trabajo pues los valores no disminuyeron por debajo del 70%.

Ya que las células HepG2 no mostraron una alteración en la reducción del MTT como resultado de la exposición al Ac se realizaron los experimentos relacionados con la funcionalidad mitocondrial únicamente con Hp.

Control respiratorio (CR).

A continuación se decidió estudiar si el Ac puede inducir alteraciones en la funcionalidad mitocondrial. El CR es uno de los parámetros más importantes que indican el estado general de la mitocondria. Este análisis requería de grandes cantidades de mitocondrias para poder ser realizado, aspecto difícil de lograr en células cultivadas por lo que se determinó el efecto del Ac sobre mitocondrias recién aisladas de hígado de rata macho Wistar.

Para realizar los tratamientos fueron empleadas varias concentraciones de Ac (20, 40 y 80 μ M). Fue posible probar (tabla 2) que el tratamiento provocó una disminución en el valor del cociente respiratorio, esto nos indicó que podría existir un desacoplamiento de la cadena respiratoria y por lo tanto una alteración de la fisiología mitocondrial como resultado de la exposición al Ac desde la concentración de 20 μ M; este efecto se mantuvo hasta los 80 μ M. Se empleó el CCCP, agente desacoplante de la respiración mitocondrial, como control positivo.

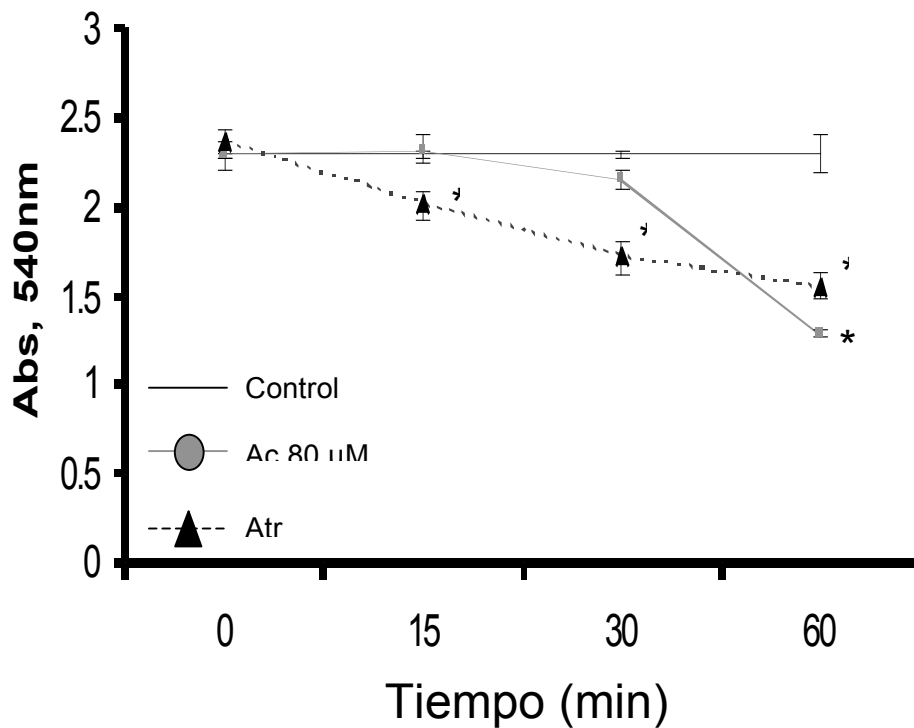
Ac (μ M)	RC Edo III/Edo IV
0	4.61 $\pm$ 0.49
20	2.45 $\pm$ 0.16*
40	2.65 $\pm$ 0.51*
80	1.82 $\pm$ 0.42*
CCCP	0.97 $\pm$ 0.2*

Tabla 2. Control Respiratorio de mitocondrias aisladas de hígado de rata tratadas con Ac. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Hinchamiento mitocondrial.

A continuación se determinó el efecto del tratamiento con Ac sobre el hinchamiento mitocondrial otro parámetro importante para

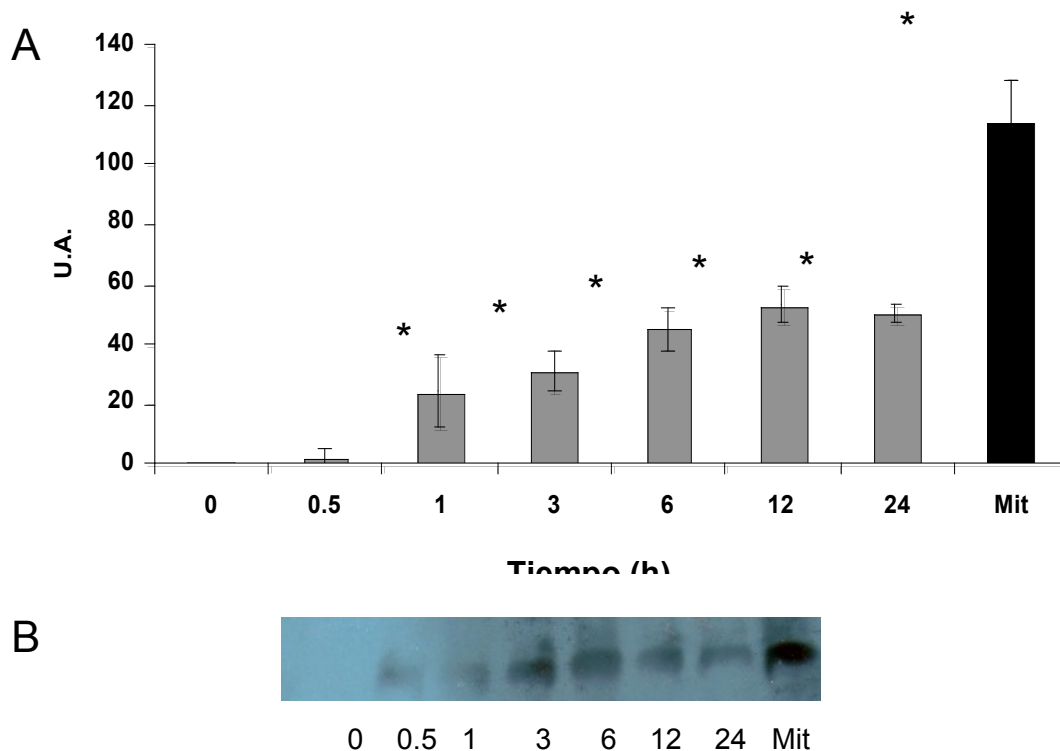
definir el estado funcional de este organelo. Puede observarse en la gráfica 1 que las células tratadas con Ac mostraron una disminución significativa de la absorbancia a 540 nm desde los 30 min de tratamiento. Esto indica que se produjo un hinchamiento de las mitocondrias lo que corrobora el hecho de que el Ac puede inducir un daño mitocondrial a tiempos cortos de exposición.



Graf 1. Efecto del Ac en el hinchamiento mitocondrial de Hp. Las mitocondrias de los Hp fueron sometidos a la presencia del Ac 80 μ M (círculos grises) durante diferentes tiempos (15-60 min), un grupo de mitocondrias control (línea negra) fue evaluado en ausencia de Ac. Se determinó la absorbancia a 540 nm. Como control positivo se empleó Atractilosida (A). La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control.

Liberación de citocromo C.

Un fenómeno que se presenta cuando existe daño mitocondrial es la liberación al citosol del citocromo C (CypC). A continuación se procedió a estudiar si el Ac promovía la liberación de esta proteína; para ello los Hp fueron expuestos a un tratamiento con 80 μ M de Ac durante diferentes tiempos. Fue posible observar un incremento en la presencia del Cyp C en el citosol a partir de 1 h de tratamiento con el Ac (Graf 2), cabe señalar que este efecto se mantuvo durante las 24 h que duró este ensayo.

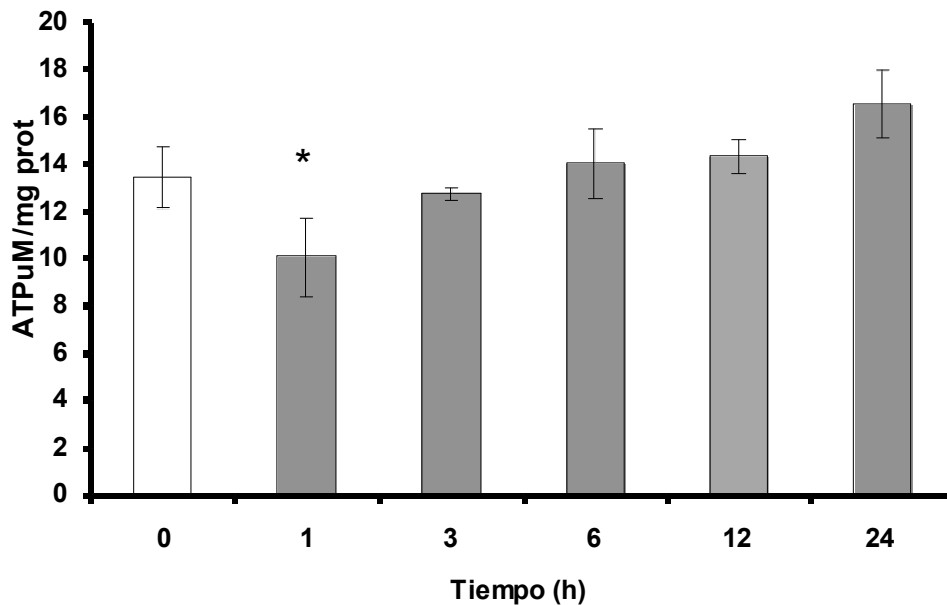


Graf 2. Liberación del Citocromo C al citosol. **A.** Los Hp fueron sometidos a la presencia del Ac 80 μ M durante diferentes tiempos (0.5- 24 h). Se obtuvo la fracción citosólica de los hepatocitos y con ella se realizó un Western blot para determinar el contenido de Citocromo C, como control positivo se empleó una muestra de la fracción mitocondrial (barra negra denominada Mit). La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$

E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0. **B.** Imagen representativa de Western Blot.

Contenido celular de ATP.

La alteración en la funcionalidad mitocondrial podría tener serias consecuencias para la célula si se trastorna el metabolismo energético de estas, por ello se decidió estudiar el efecto del tratamiento a corto plazo con Ac sobre el contenido de ATP. Pudo observarse (Graf 3) que un tratamiento con $80 \mu\text{M}$ de Ac ciertamente indujo una disminución en el contenido celular de ATP al cabo de 1 hora, sin embargo la célula pudo contrarrestar este efecto y recuperar los niveles de esta molécula a las 3h de tratamiento.



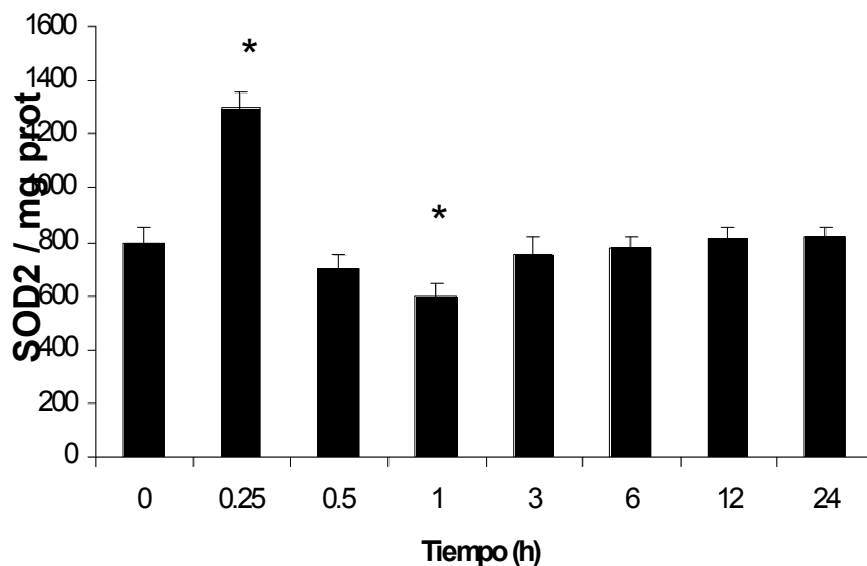
Graf 3. Contenido de ATP en Hp aislados de hígado de rata tratados con Ac $80 \mu\text{M}$. Se muestra en la grafica el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Determinación de actividades enzimáticas.

Dado que la mitocondria es una de las principales fuentes celulares de ROS y que demostramos que el Ac altera su funcionalidad, resultaba importante establecer el efecto de un tratamiento agudo de Ac en el estado redox para estudiar si se producían cambios; con el fin de lograr este objetivo se determinó tanto en Hp como en células HepG2 la actividad de tres de las principales enzimas del sistema antioxidante celular: SOD2, GPx y Cat.

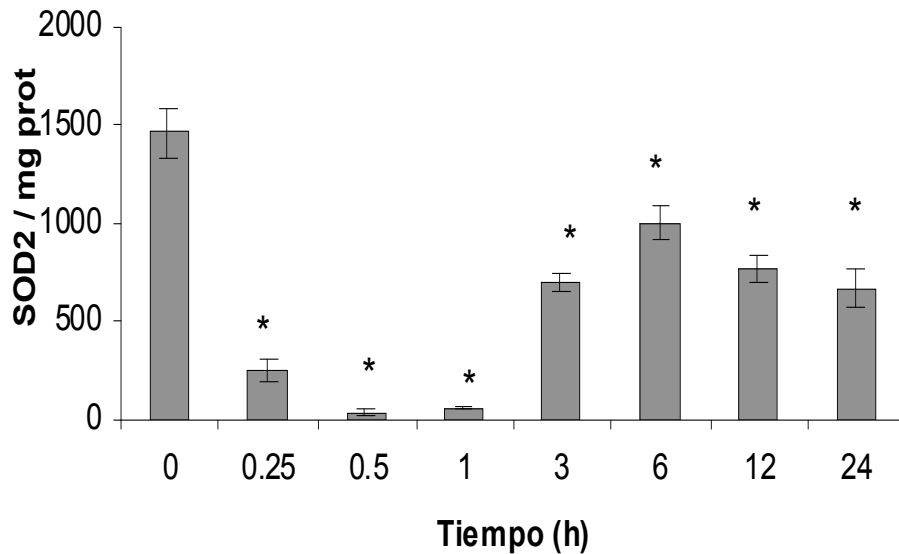
SOD2.

En la gráfica 4 se muestran los resultados obtenidos al determinar la actividad de la SOD2 en células HepG2 tras un tratamiento a diferentes tiempos con Ac 80µM. Se observó que el Ac produjo una respuesta compleja en este tipo celular ya que a los 15 min se evidenció un aumento significativo de la actividad pero dicho efecto se revirtió y la actividad enzimática se encontró disminuida cuando el tratamiento con Ac se mantuvo durante de 1 h. Finalmente, la actividad de la SOD2 en las células HepG2 recuperó el valor basal después de 3 h de tratamiento con Ac.



Graf 4. Actividad de la SOD2 en células HepG2 tratadas con Ac 80 µM. Las células fueron tratadas durante varios tiempos entre 15 min y 6h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

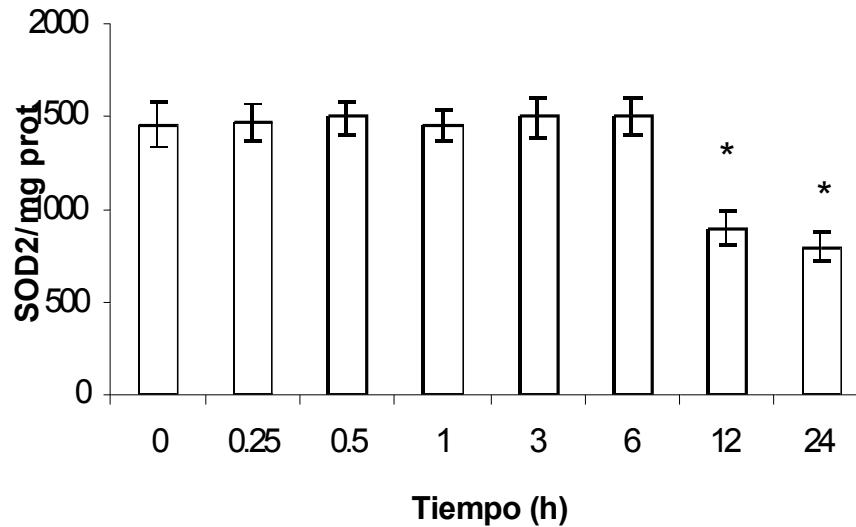
En la gráfica 5 se muestra el efecto del tratamiento con Ac 80 μ M sobre la actividad de la SOD2 de Hp de cultivo primario de rata. Pudo observarse que el Ac tiene un efecto drástico sobre esta enzima, a los 15 min de tratamiento el valor de la actividad enzimática se encontró disminuida en 85% con respecto al valor basal. Durante la primera hora del tratamiento la actividad de la SOD2 disminuyó a niveles menores al 90%. A las 3 h de tratamiento pudo observarse que la actividad de la SOD2 comenzó a recuperarse llegando a un máximo de recuperación a las 6 h y estabilizándose en valores cercanos al 50% de la actividad basal.



Graf 5. Actividad de la SOD2 en Hp de cultivo primario de rata tratados con Ac 80 μ M. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos 15 min-24h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Las actividades enzimáticas de las células en cultivo primario pueden verse alteradas a lo largo del tiempo. Con el fin de evaluar si la actividad de la SOD2 presentaba variaciones por el solo hecho de que las células se encontraban en cultivo se realizaron verificaciones de actividad enzimática en células que no fueron sometidas a tratamiento con Ac. Los resultados mostraron que,

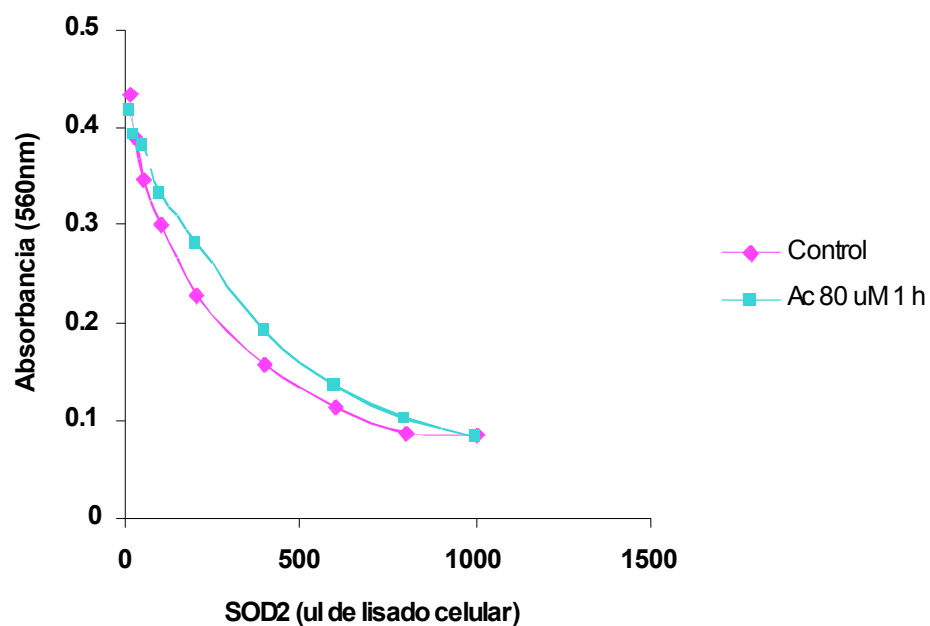
efectivamente, a partir de las 12 h la actividad de la SOD2 de las células en cultivo primario va disminuyendo (Graf 6).



Graf 6. Actividad de la SOD2 en Hp de rata en cultivo primario. La actividad de la SOD2 se evaluó durante diferentes tiempos 15 min-24h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Sistema libre de células.

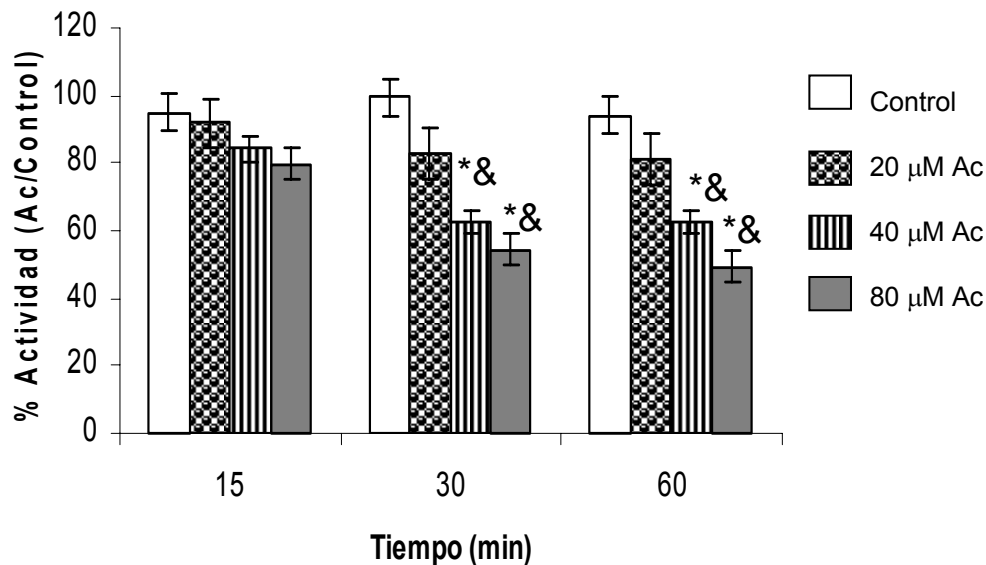
Para determinar si el efecto del tratamiento con Ac sobre la SOD2 se debía a una interacción directa del aldehído sobre la enzima, posiblemente por la formación de aductos, se determinó su actividad en un Sistema Libre de Células (SLC); es decir, se empleó un lisado total celular, este fue sometido a un tratamiento con Ac 80 μ M durante 1 h para posteriormente determinar la actividad de la enzima. Este ensayo reveló que el Ac no afectó de manera directa la actividad de la enzima. Se pudo concluir que no se formaron aductos que interfirieran con la actividad de la enzima (Graf 7). Este ensayo se validó empleando enzima comercial (Sigma) sometida a las mismas condiciones experimentales (datos no mostrados).



Graf 7. Efecto del Ac sobre la actividad de la SOD2 en un Sistema Libre de Células. Se muestran los valores que se obtuvieron de absorbancia con enzima aislada que fue sometida a la presencia de Ac durante 1 h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Actividad de SOD2 en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Con el fin de estudiar si el efecto tóxico del Ac sobre la mitocondria afectaba de manera directa la actividad de la SOD2 se realizaron determinaciones de la actividad de la enzima en mitocondrias aisladas de hígado de rata que fueron sometidas a la presencia de Ac a diferentes concentraciones (20, 40 y 80 μ M) durante varios periodos de tiempo (15, 30, 60 min). En la gráfica 8 se observa que desde los 15 min la actividad de la enzima disminuyó, este cambio resultó estadísticamente significativo a los 30 y 60 min.

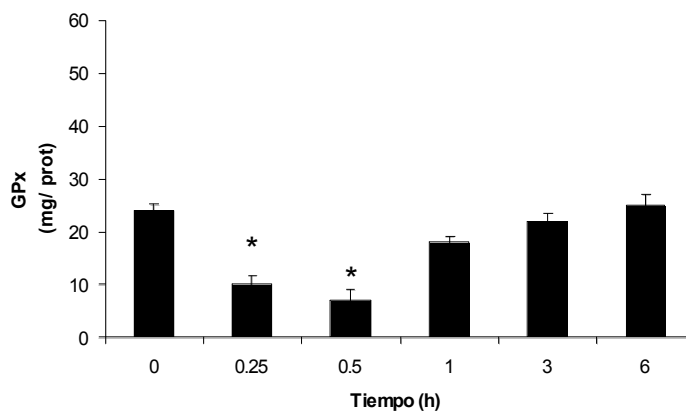


Graf 8. Porcentaje de actividad de la SOD2 en mitocondrias aisladas de hígado de rata tratadas con Ac. Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de Ac, controles (barras blancas), 20 μ M (bolas), 4 μ M (rayas) y 80 μ M (barras gris sólido). Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo correspondiente, & $p < 0.05$ con respecto al tratamiento 20 μ M al tiempo respectivo.

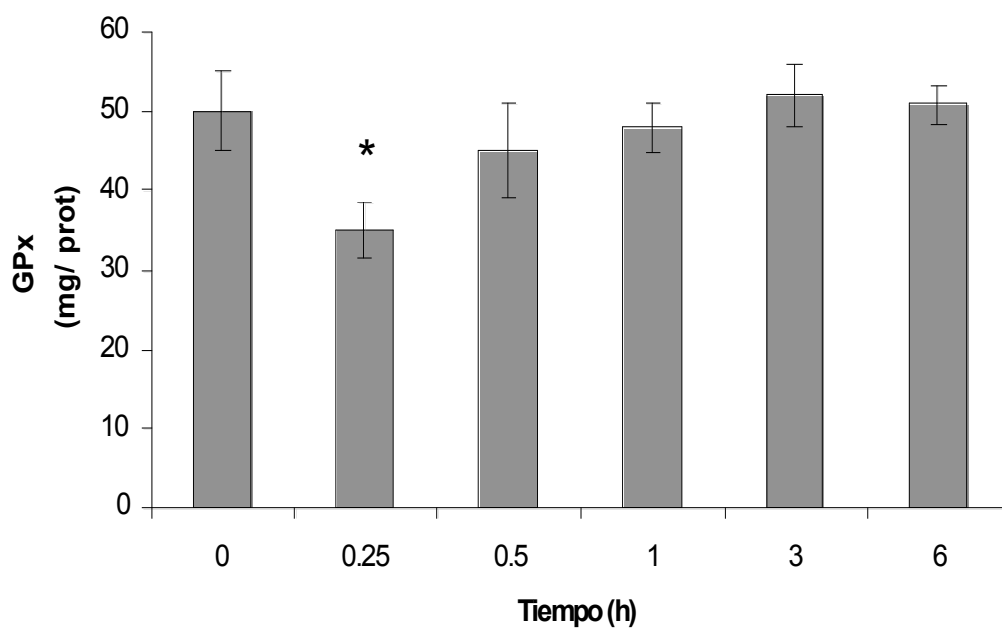
Glutación peroxidasa.

Cuando estudiamos el efecto del tratamiento con Ac 80 μ M sobre la actividad de la GPx en células HepG2 se observó una disminución de la actividad de la actividad basal correspondiente a un 42% a los 30 min de tratamiento (Graf 9). Sin embargo el valor basal de actividad de esta enzima se recuperó rápidamente. En lo que respecta al efecto del tratamiento con Ac 80 μ M en Hp de cultivo primario de rata, este no fue tan notorio como en las células HepG2 pues solo se observó una disminución significativa en la actividad de la GPx a los 15 min de tratamiento correspondiente a un 28% del valor basal, disminución que se recuperó completamente a los 30 min (Graf 10).

Las determinaciones hasta las 6 h de tratamiento con el Ac no mostraron cambios con respecto a los valores basales por lo que no se consideró necesario extender los tratamientos a tiempos mayores.



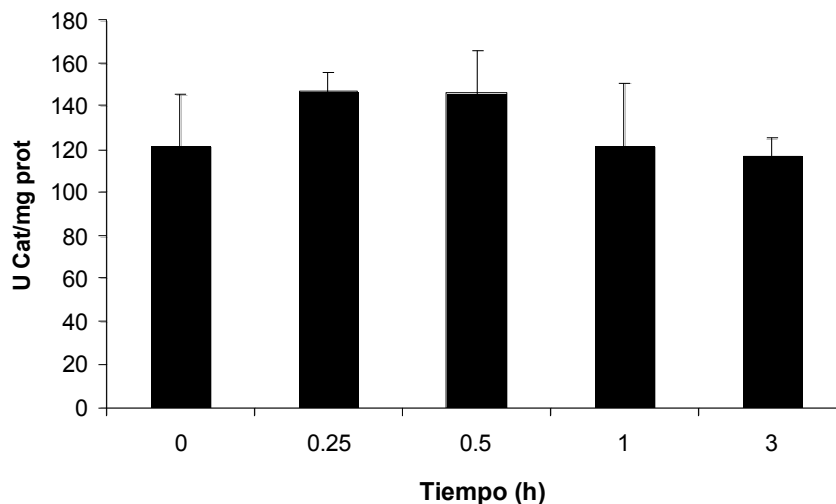
Graf 9. Actividad de la glutatión peroxidasa en células HepG2 tratadas con Ac 80 μ M. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos (15 min-6h). La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.



Graf 10. Actividad de la glutatión peroxidasa en Hp de cultivo primario de rata tratados con Ac 80 μ M. Las células fueron sometidas al tratamiento con Ac durante diferentes tiempos 15 min-6h. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Catalasa.

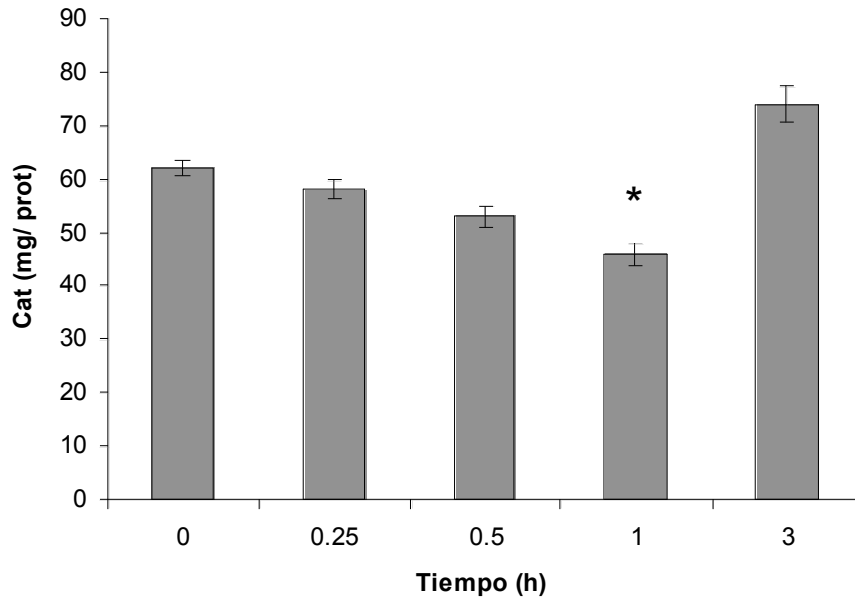
La actividad de la Cat en células HepG2 se muestra en la gráfica 11. Pudo observarse que en oposición a lo observado con la GPx el Ac no modificó de manera significativa la actividad de la Cat durante el tiempo que duró el tratamiento.



Graf. 11. Actividad de la Catalasa en células HepG2 tratadas con Ac 80 µM. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos (15 min-3h). Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

El Ac, después de un tratamiento de 1 h sobre los Hp de cultivo primario de rata, provocó una disminución sobre la actividad de la enzima Cat, disminución que fue estadísticamente significativa (Graf 12). La actividad de la enzima disminuyó en un 26% del valor de la actividad basal después de 1h de tratamiento, sin

embargo a las 3 h de tratamiento la actividad ya se había recuperado por completo e incluso mostró una tendencia a aumentar la actividad.



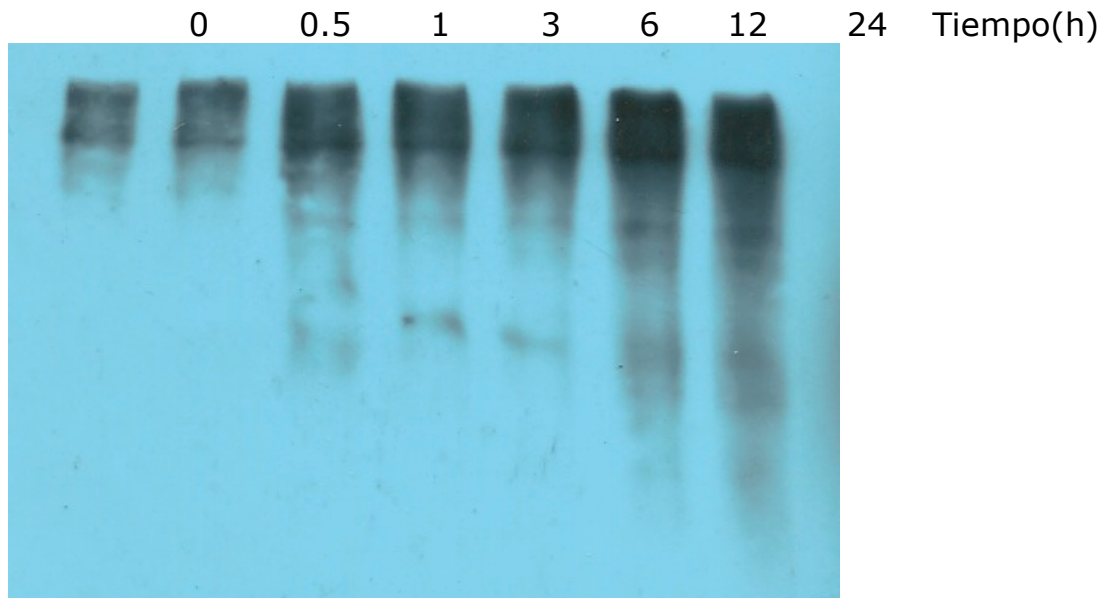
Graf 12. Actividad de la Catalasa en Hp de cultivo primario de rata tratados con Ac 80 μ M. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos 15 min-3h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Alteraciones en el estado redox celular.

El siguiente paso consistió en evaluar si el Ac inducía algún cambio en el estado redox de las células hepáticas (HepG2 y Hp) para ello se evaluaron los siguientes parámetros: la oxidación de proteínas, el nivel de lipoperoxidación, el cociente GSH/GSSG y la generación de peróxido de hidrógeno.

Determinación de la oxidación de proteínas.

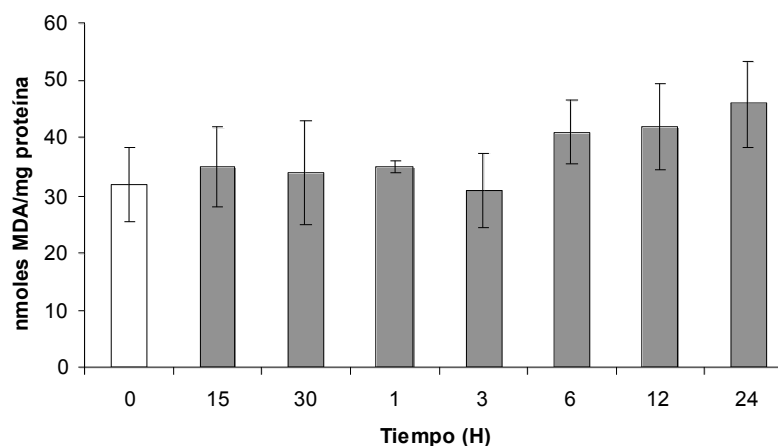
Con el fin de estudiar si existía daño oxidativo en las proteínas de los Hp expuestos a Ac 80 μ M se realizaron experimentos de Oxiblot en Hp de rata. Pudo observarse (gráfica 13) que existió una oxidación de proteínas de manera dependiente del tiempo.



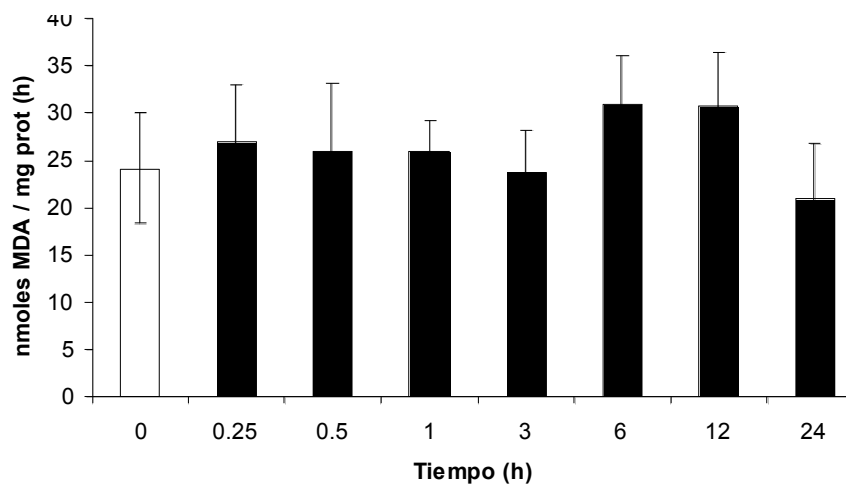
Graf 13. Oxidación de Proteínas en Hp de rata tratados con Ac 80 μ M. Las células se trataron con Ac durante diferentes tiempos (0.5-24 h). El ensayo se repitió 3 veces de manera independiente, se muestra una imagen representativa.

Determinación de la lipoperoxidación.

Con el fin de estudiar si se presentaba daño lipoperoxidativo como resultado de la exposición aguda a Ac se determinaron los niveles de MDA en ambos tipos celulares (Graf 14 y 15). Nuestros datos mostraron que no existían diferencias significativas con respecto al control durante las 24 h que duró el estudio.



Graf 14. Lipoperoxidación en Hp de rata tratados con Ac tratadas con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos. Se reportan los datos en porcentaje con respecto al control. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S.

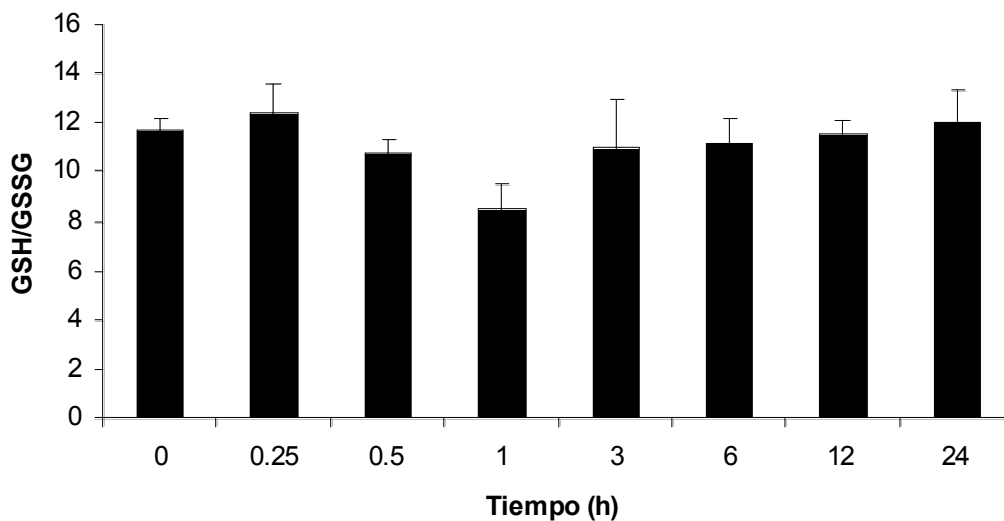


Graf 15. Lipoperoxidación en células HepG2 tratadas con Ac tratadas con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos. Se reportan los

datos en porcentaje con respecto al control. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S.

GSH/GSSG.

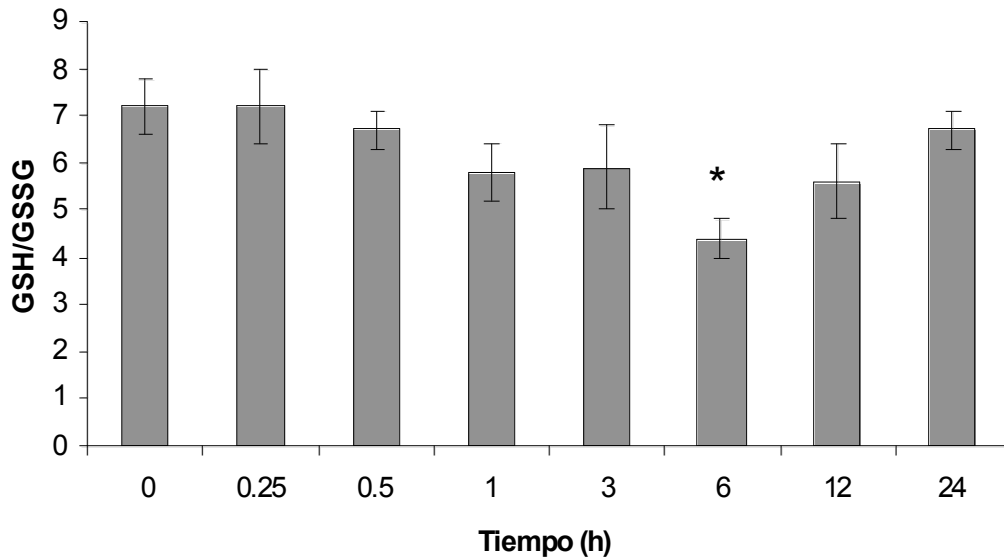
Para evaluar si el Ac provocaba algún cambio en el estado redox de las células HepG2 se determinó el cociente GSH/GSSG. En la gráfica 16 se observa que el Ac no produjo cambios estadísticamente significativos en el valor de este parámetro, por lo menos durante las 24h que duró tratamiento.



Graf. 16. Cociente GSH/GSSG en células HepG2. Las células fueron sometidas a un tratamiento con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos 15 min-6h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S.

El siguiente paso fue determinar si el Ac alteraba el cociente GSH/GSSG en Hp de rata (Graf 17). Los resultados mostraron que después de 6 h de tratamiento se indujo una disminución del 39% en el valor de este parámetro. A partir de las 12 h de tratamiento con Ac los valores del cociente GSG/GSSG presentaron valores similares al basal.

Este dato denota que la respuesta a la agresión por Ac es diferente en ambos tipos celulares y parece indicar que las células derivadas de hepatoblastoma presentaban una mayor resistencia a la generación de estrés oxidativo y a la modificación de la actividad de enzimas antioxidantes.



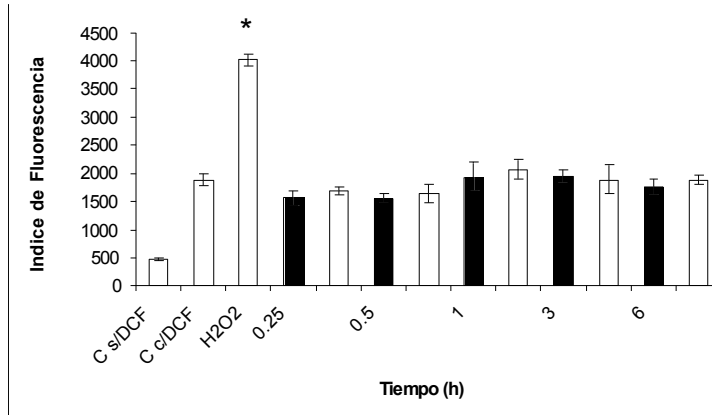
Graf 17. Cociente GSH/GSSG en Hp de cultivo primario de rata tratados con Ac 80 μ M durante diferentes tiempos 15 min-6h. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Generación de H_2O_2 .

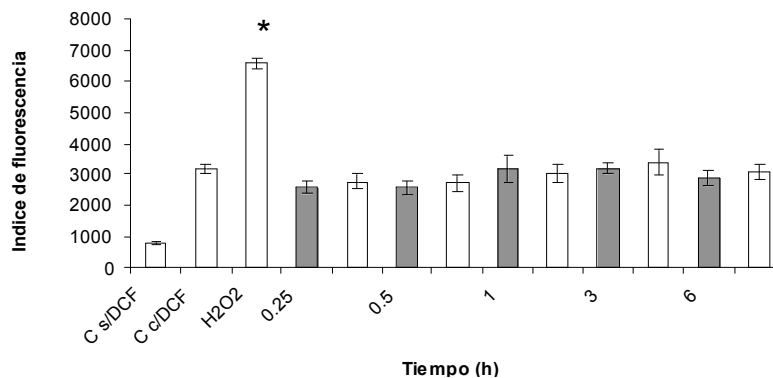
Para determinar si la modificación en el cociente GSH/GSSG y la disminución en la actividad de la catalasa y la GPx pudieran estar asociadas a un incremento en la generación de peróxido de hidrógeno se determinó por citometría de flujo la generación de este producto tanto en células HepG2 como en Hp de cultivo primario de rata (Graf 18 y 19 respectivamente).

Como control positivo se sometió a ambos tipos celulares a un tratamiento con 30 μ M de H_2O_2 y como control negativo se consideró la fluorescencia natural de las células sin diclorofluoresceína (DCF) (control s/DCF). Las células fueron

sometidas a un tratamiento con Ac 80 μM durante diferentes tiempos, desde 15 min hasta 6h y la respuesta en ambos tipos celulares fue similar ya que no se observaron diferencias en la producción de H_2O_2 como resultado de la exposición al Ac.



Graf 18. Generación de H_2O_2 en células HepG2 tratadas con Ac 80 μM durante diferentes tiempos, desde 15 min hasta 6h. Se representan los resultados obtenidos con las células control en barras blancas mientras que los resultados de las células tratadas con Ac se muestran como barras negras. Se incluyeron un control negativo sin DCF y un control positivo tratado con peróxido de hidrógeno. Se muestra en la gráfica el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.



Graf 19. Generación de H_2O_2 en Hp de cultivo primario de rata tratadas con Ac 80 μM durante diferentes tiempos, desde 15 min hasta 6h. Se representan los resultados obtenidos con las células control en barras blancas mientras que los resultados de los Hp tratados con Ac se muestran como barras grises. Se incluyeron un control negativo sin DCF y un control positivo con peróxido de hidrógeno. Se muestra en la gráfica el promedio de al menos 3

experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Recuperación de la actividad de SOD2.

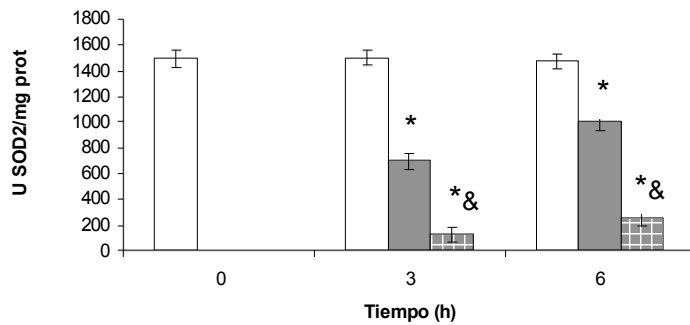
El efecto del Ac sobre la actividad de las enzimas antioxidantes mostró que existen diferencias en ambos tipos celulares. La actividad de la SOD2 de Hp de rata mostró el cambio más relevante pues alcanzó una disminución de hasta el 90% de la actividad basal aunque se recuperó parcialmente a las 12 h; es por ello que se considero importante estudiar el proceso de recuperación de la actividad de esta enzima.

A continuación se evaluaron algunos parámetros para determinar los mecanismos involucrados en el proceso de recuperación de la actividad de la SOD2. Primero se determinó si la recuperación requería de síntesis de novo de proteínas. Para ello se empleó un pretratamiento con 40 mM de cicloheximida durante 1 h antes del tratamiento con Ac. La actividad de la enzima se evaluó a 3 y 6 h de tratamiento con Ac ya que a estos tiempos se había iniciado el proceso de recuperación.

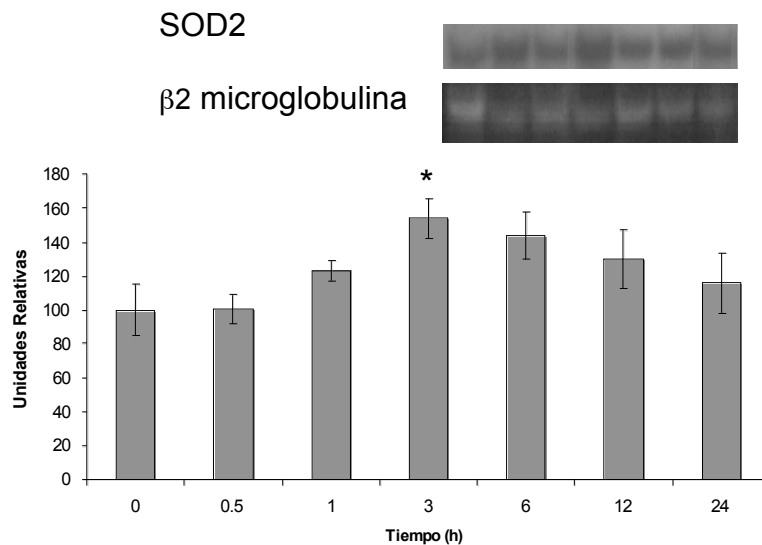
Los resultados se muestran en la gráfica 20. Pudo determinarse que los tratamientos con cicloheximida inhibieron el proceso de recuperación por lo que podría afirmarse que para que la actividad de la SOD2 se recupere es necesaria la síntesis de novo proteínas.

Expresión de SOD2.

Para confirmar si el proceso de recuperación de la actividad de la SOD2 que se presentó a partir de 3 h de tratamiento con Ac pudiera deberse específicamente a la síntesis de novo de esta enzima se evaluó la expresión del ARNm de esta enzima en Hp de cultivo primario de rata a diferentes tiempos (Graf 21).



Graf 20. Efecto de la cicloheximida en el proceso de recuperación de la actividad de SOD2. Los Hp de cultivo primario fueron sometidos a un pretratamiento de 1h con cicloheximida 40 mM (barras cuadriculadas) para luego ser sometidos a un tratamiento con Ac 80 μ M (barras grises), los controles se muestran en blanco. Se representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.005$ con respecto al control al tiempo 0. & $p < 0.05$ con respecto al tratamiento con Ac al tiempo respectivo.



Graf 21. Expresión de SOD2 en Hp de cultivo primario de rata tratados con Ac 80 μ M. Se muestra el cociente de la expresión de las células tratadas con Ac 80 μ M entre la expresión de las células controles al tiempo respectivo. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Fue posible observar que a partir de 1 h con tratamiento con Ac 80 μ M se presentaba una tendencia a aumentar la expresión de SOD2 que adquirió significancia estadística a las 3 h de tratamiento.

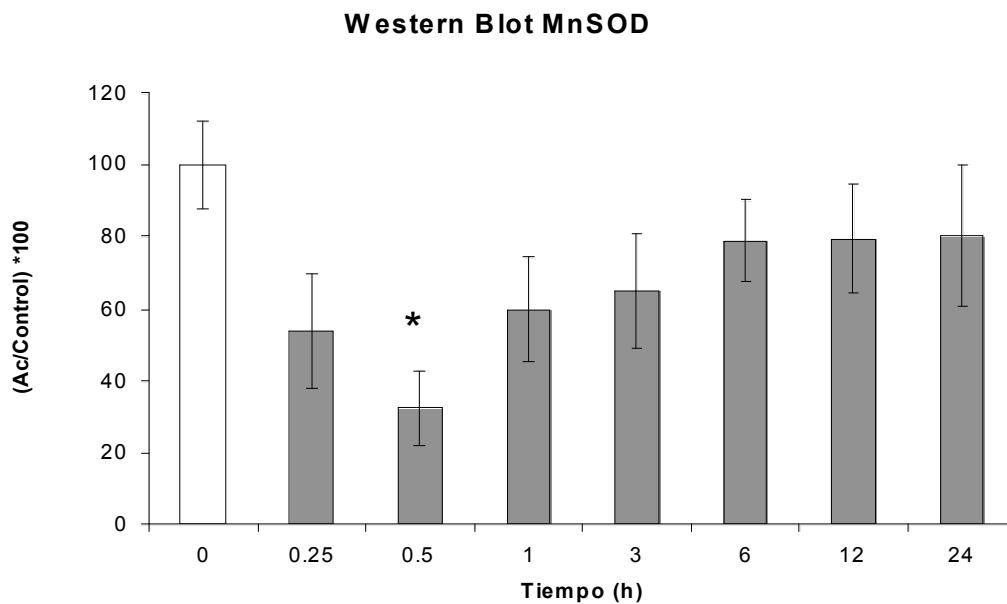
Sin embargo, dado que la expresión se encontró aumentada solo moderadamente fue necesario evaluar la cantidad de enzima SOD2 que existe en las células durante el proceso de recuperación de la actividad.

Cantidad de SOD2.

Ha continuación se evaluó por Western Blot la cantidad de SOD2 presente en las células para documentar si existía una relación entre los cambios de actividad que se presentaron en presencia del Ac y la cantidad de proteína (Graf 22).

Pudo observarse que desde los 15 min de tratamiento con Ac 80 μ M la cantidad total de la enzima comenzó a disminuir y este efecto fue estadísticamente significativo a los 30 min de tratamiento. La disminución en la actividad enzimática pudiera estar relacionada con este efecto en la cantidad de proteína.

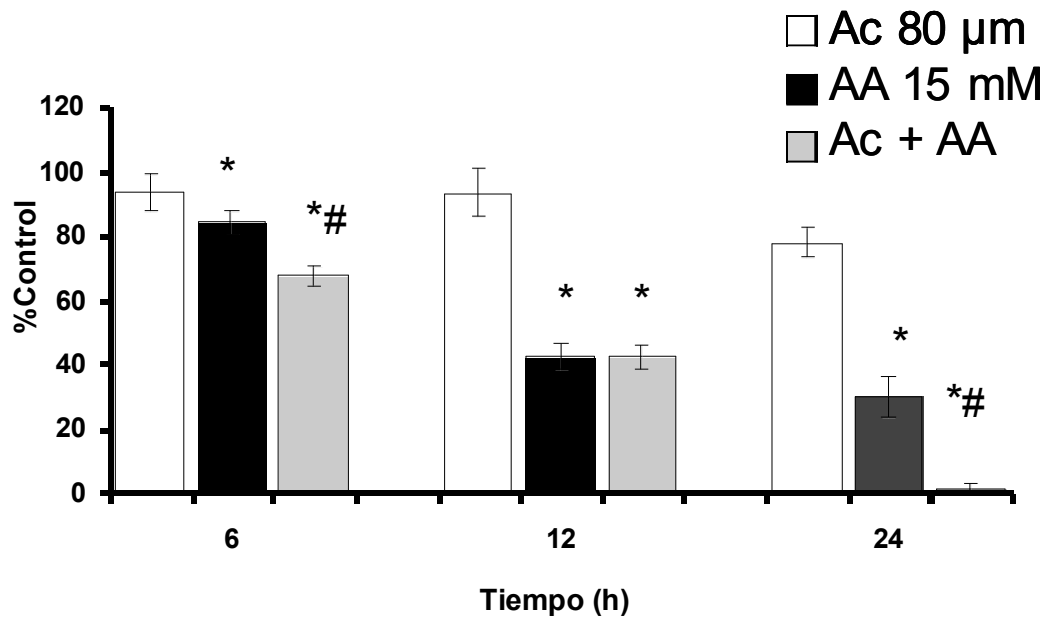
En cuanto al proceso de recuperación de la actividad se evidenció una tendencia a incrementar la cantidad de proteína después de 1h de tratamiento con Ac, con ello puede decirse que existe una tendencia a normalizar los niveles de la enzima. La recuperación de la cantidad de proteína llega a un máximo de 80% a las 12 h lo que mostró una correspondencia con la recuperación de la actividad de la enzima que también fue de 87% a las 12 horas (comparada con el control al tiempo respectivo).



Graf 22. Contenido de SOD2 en Hp de cultivo primario de rata sometidos a un tratamiento con Ac 80 μ M. Se muestra el cociente entre la cantidad de proteína de las células tratadas con Ac entre la cantidad de proteína del control al tiempo correspondiente. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p < 0.05$ con respecto al control al tiempo 0.

Sensibilización al daño como resultado de la exposición al acetaldehído.

Con el objeto de estudiar si las alteraciones observadas como resultado de la acción del acetaldehído limitaban la respuesta de la célula a una nueva agresión oxidativa se realizó un experimento en el que el Ac se empleó como pretratamiento durante 1h para posteriormente adicionar al medio de cultivo Antimicina A (AA) 40 mM (Graf. 23).



Graf 23. Viabilidad Celular. Se empleó un pretratamiento de Ac 80uM durante 1h para posteriormente adicionar AA durante diferentes tiempos (6, 12 y 24 h). Se realizaron determinaciones de Rojo Neutro. Se muestra el cociente entre la cantidad de proteína de las células tratadas con Ac entre la cantidad de proteína del control al tiempo correspondiente. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ E.S. * $p<0.05$ con respecto al control al tiempo respectivo, # $p<0.05$ con respecto al tratamiento con acetaldehído al tiempo respectivo.

El tratamiento con Ac indujo una disminución en la viabilidad de aproximadamente 25 % lo que correlacionó con la disminución de la funcionalidad descrita al inicio de este trabajo con la prueba de MTT. La AA produjo una disminución de la viabilidad desde las 6 h lo que se atribuye a su propiedad de inducir estrés oxidativo. Cuando se emplearon ambos agentes la viabilidad se redujo en un 93% lo que indicó que el pretratamiento con Ac ciertamente sensibilizó a los Hp a un nuevo reto de tipo oxidativo.

DISCUSION

En la actualidad existe evidencia de que existe una relación entre el daño hepático y la funcionalidad mitocondrial; en particular el grupo de Lieber (2000) expuso que macacos con esteatosis hepática, resultado de un consumo crónico de EtOH, mostraron alteraciones en la funcionalidad mitocondrial hepática. Así mismo ha sido reportado que en este modelo animal, en el que se presenta daño fibrótico, era posible observar una disminución en la funcionalidad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

En otro estudio realizado en ratas sometidas a una dieta del 20% v/v de EtOH durante de 3 meses se encontró una disminución significativa en la respiración mitocondrial hepática (Quintanilla ME, Tampier L. 1992).

Otro aspecto importante es que la mitocondria es una de las principales fuentes celulares de radicales libres y algunos estudios como los del grupo de Fernández-Checa (2005) han mostrado que la exposición crónica al Ac promueve la generación de radicales libres e induce estrés oxidativo celular mediante la disminución de los niveles de GSH mitocondrial debido al daño en el transportador de este agente.

Con esto queda asentado que el EtOH, probablemente a través de su metabolito, aplicado en un esquema crónico puede llevar a daños en la funcionalidad mitocondrial; esto resulta de suma importancia pues conllevaría a alteraciones en los niveles energéticos de la célula.

A pesar de la importancia de esta evidencia a la fecha no se habían elaborado trabajos en los que se estudiara el efecto temprano del Ac sobre la funcionalidad mitocondrial. Por ello en el presente estudio se evaluó si el tratamiento a corto plazo (menor a 24 h de exposición) con este agente ejerce un efecto tóxico en la mitocondria.

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con Ac ciertamente tuvo un efecto que pudiera ser desacoplante sobre la cadena respiratoria mitocondrial y produjo además cambios en la maquinaria antioxidante celular así como una leve modificación del estado redox celular a tiempos de exposición menores a 24 h.

Se demostró que el tratamiento a tiempos cortos con Ac modifica la funcionalidad de la mitocondria e indujo la liberación de citocromo C aunque el efecto del Ac logra ser controlado a nivel celular y no conllevó a la muerte celular. Esto nos lleva a pensar que el efecto descrito en otros estudios realizados en mitocondrias para los tratamientos agudos con EtOH pudieran estar mediados directamente por el Ac.

En particular resultó importante denotar que el efecto encontrado en la funcionalidad mitocondrial y del complejo V mitocondrial (dato no mostrado) que, sumado a la actividad que los Hp desarrollaron con el fin de contrarrestar el efecto tóxico, tuvieron como resultado una disminución temporal del contenido de ATP. Esta disminución no puso en riesgo la sobrevivencia de los Hp pero si podría ser un factor limitante para la respuesta celular ante agresiones que ocurran simultánea o posteriormente. Este hecho

adquiere importancia si se considera que este fenómeno podría determinar la respuesta celular en condiciones en las que el metabolismo del EtOH vía Cyp 2E1 generan estrés oxidativo.

En lo que respecta a la actividad de la SOD2 en los Hp cultivados, esta se vio severamente afectada por la presencia del Ac desde los 15 min y aunque el proceso de recuperación de la actividad comenzó a las 3 h no fue sino hasta las 12 h que los valores de porcentaje de actividad con respecto al control dejaron de ser significativamente diferentes.

Existen estudios en los que se ha descrito que el consumo de EtOH disminuyó la actividad de SOD en hígados de ratas tratadas con EtOH en una dosis única (Scott, 2000). Nuestros resultados mostraron que este efecto en la disminución de SOD puede estar directamente asociada a la producción del Ac y su efecto podría deberse específicamente a la disminución de SOD2.

Se ha demostrado que el Ac ejerce parte de su efecto tóxico por la formación de aductos que modifican la actividad de diversas enzimas, por ello fue considerada la realización del ensayo-libre de células en el que se demostró que la disminución de la actividad de SOD2 no fue un efecto directo del Ac sobre la enzima. Con ello quedó abierta la posibilidad de generar una hipótesis sobre los mecanismos por los cuales este fenómeno estaba ocurriendo. Nos preguntamos si sería el efecto tóxico sobre la mitocondria lo que pudiera estar asociado a la disminución de la actividad de la SOD2 y por ello se evaluó el efecto del tratamiento a tiempos cortos con Ac a diferentes concentraciones sobre una fracción de las

mitocondrias aisladas de hígado de rata. Nuestros resultados expusieron que existía una marcada tendencia a la disminución de la actividad de la SOD2 desde los 15 min, esta se volvió significativa a los 30 min y se mantuvo abatida a una hora de tratamiento. Dado que el Ac afectó la actividad de la SOD2 esto pudiera resultar un indicativo de que el efecto tóxico sobre la mitocondria puede estar asociado a un daño sobre la enzima antioxidante SOD2. Es importante esta consideración ya que este efecto puede facilitar la aparición de estrés oxidativo pues esta enzima esta encargada de eliminar los aniones superóxido que se producen en la mitocondria. Existen algunos reportes al respecto, se sabe que el EtOH tanto crónico como agudo induce la formación de ROS en las células hepáticas (Hoek JB, Pastorino JG, Cahill A, 2002) y de hecho la generación de radicales libres está asociada a las alteraciones en la cadena respiratoria (Cunningham CC, Bailey SM, 2001).

La disminución de la actividad en mitocondrias aisladas no resultó tan drástica como se mostró en los Hp completos por lo que se puede plantear la posibilidad de que dentro de las vías por las que el Ac provocó la disminución de la enzima estuvieran involucrados eventos tóxicos a nivel celular. Existe otro trabajo en el que se demostró que un proceso citosólico puede inducir modificaciones en la actividad de SOD2, fue realizado en miocardiocitos en los que se encontró que una sobreexpresión de HSP 72, una proteína citosólica, favorece un aumento en la actividad de la SOD2 durante evento isquémico aunque aún no existe evidencia que pueda plantear como estos eventos están relacionados (Suzuki K. et al, 2002; Li W, 2004). Lo que resultó claro fue que el efecto sobre la actividad de la enzima resulta indirectamente de la acción del Ac

sobre la mitocondria; este fenómeno podría deberse a alteraciones en la cadena respiratoria o a mecanismos que no es posible identificar en este momento pero que pudieran estar asociados a la capacidad del Ac a unirse a la membrana externa de la mitocondria.

En cuanto al daño mitocondrial se presume que la alteración de la cadena respiratoria podría ser la inductora de la modificación de la actividad de la SOD2. Recientemente algunos artículos describieron la relación que existe entre los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y la enzima. Una deficiencia en el complejo I induce una sobreexpresión de SOD2, aunque no está descrito el mecanismo por el que esto ocurre. En base a nuestros resultados podríamos sugerir que la afección de la cadena respiratoria mediada por el Ac pudiera estar asociada con la disminución de la actividad de SOD2 descrita en este trabajo (Paradies G, 2002; Forman HJ, 1982).

Resulta de interés para nuestro estudio la evidencia publicada por el grupo de Kokoszka que muestra que las mitocondrias aisladas de hígado de los ratones knock-out que tienen una deficiencia completa de SOD2 muestran una inhibición sustancial de la respiración a pesar de lo cual resulta una rápida acumulación de daño oxidativo mitocondrial (Kokoszka JE et al, 2001). Además se ha demostrado que en ratones heterocigotos Knock-out para SOD2 que la función mitocondrial esta alterada (Van Remmen H, et al 2001). Por lo que parecería que la relación SOD2-cadena respiratoria pudiera ser bidireccional.

Toda esta evidencia plantea la posibilidad de proponer que el efecto del Ac en la SOD2 involucra procesos tanto celulares como mitocondriales y más específicamente, que existe una relación entre el daño a la cadena respiratoria mitocondrial y la SOD2.

En los estudios que se realizaron para abordar el efecto del Ac sobre la actividad de SOD2 en células HepG2 se pretendía estudiar si estos hallazgos pudieran ser generalizables a células parenquimatosas hepáticas sin depender del tipo celular empleado. En cuanto al efecto del tratamiento con Ac en la actividad de la enzima SOD2 en células HepG2 se observó un comportamiento complejo (inicialmente un aumento de la actividad seguido de una disminución pronunciada de esta) que requerirá de más estudios tanto para entender los mecanismos por los que ocurre como la relevancia de estos cambios en la fisiología celular.

En términos generales podría proponerse que el Ac ocasionó una condición que favorece la aparición de estrés oxidativo en la célula ya que modifica la funcionalidad mitocondrial y disminuye la actividad de SOD2, por ello nos preguntamos si el Ac pudiera tener un efecto en enzimas antioxidantes como la GPx y la Cat por lo que se evaluaron estos parámetros en células de cultivo primario de rata (Hp) y en células derivadas de un hepatoblastoma humano (HepG2).

Aunque el grupo de Pivetta y colaboradores (2006) encontró que el Ac no tiene ningún efecto directo en las actividades de la GPx en hígados de ratón, nuestros resultados mostraron que este tóxico indujo una ligera disminución de la GPx en ambos tipos celulares a

tiempos cortos de exposición (15 min) aunque este efecto se revirtió después de 1 h, estas diferencias pueden atribuirse al modelo de estudio empleado. El efecto observado antes de 30 minutos puede atribuirse directamente a la toxicidad del Ac, sin embargo, el monto del efecto y la rápida recuperación (1 hora) indican que la trascendencia de estos cambios en la fisiología celular podría no ser importante.

La catalasa no se ve afectada en las células HepG2 y en los Hp el Ac tuvo como efecto una disminución significativa de la actividad (20%) que se recobró rápidamente. De nuevo las diferencias observadas pueden atribuirse al origen del tipo celular, y las células HepG2 parecen ser más resistentes al efecto tóxico del Ac lo que podría asociarse al hecho de que en estas células se encuentran aumentados los mecanismos antiapoptóticos y de sobrevivencia dado su origen transformado.

Ante los hallazgos del efecto del Ac en la funcionalidad mitocondrial y la actividad de la SOD2, surgió la siguiente pregunta: ¿se inducen modificaciones en el estado redox celular?.

Para responder a esta pregunta es que se determinó el cociente GSH/GSSG en las Hp por medio de HPLC. Nuestros resultados mostraron que después de 6 h de tratamiento con Ac se produjo una disminución en los valores de este parámetro lo que indicó que este tratamiento fue capaz de generar cambios en el estado redox celular de manera transitoria.

Estos experimentos se realizaron también en células HepG2 dadas las alteraciones que ocurren en la actividad de la SOD2 y no se encontró ninguna modificación en los valores de este cociente, esto parece tener una mayor resistencia a la generación de estrés oxidativo. Otro aspecto importante es que en éstas células la actividad de SOD2 mostraba una dinámica diferente en presencia del Ac, inicialmente se observó un aumento en la actividad seguido de una disminución de esta, diferencia que podría explicar que no se observe una variación en el cociente GSH/GSSG.

Ya que el Ac en los Hp mostró un efecto desacoplante de la cadena respiratoria y afectó la actividad de la SOD2 resultó necesario estudiar si estas alteraciones fisiológicas serían capaces de generar daño a nivel oxidativo a nivel celular, de aquí la conveniencia de que se realizaran determinaciones como lipoperoxidación y oxidación de proteínas. Además, estudios recientes mostraron que la modificación oxidativa y la inactivación de proteínas mitocondriales podría ser un mecanismo mediante el cual el EtOH contribuye a la patología observada en el hígado de personas alcohólicas a través de modificaciones en la funcionalidad mitocondrial (Cahill y cols., 2002). Existe evidencia previa que muestra que en un esquema crónico, el Ac a través de su interacción con proteínas y lípidos, puede llevar a la formación de radicales y a daño celular (Wu D et al, 2003).

Nuestros resultados mostraron que hasta las 24 horas que duró en ensayo no hubo LPO en ninguno de los modelos estudiados. En cuanto al estudio de la oxidación de proteína en estos se pudo observar que existe un daño oxidativo progresivo hasta las 24 h

que duró el estudio. Podría asumirse que al existir daño oxidativo a proteínas debería asimismo existir daño lipoperoxidativo, sin embargo existen publicaciones en los que se demuestra que estas dos alteraciones no necesariamente están correlacionadas. Así, el grupo de Llurba (2004) encontró en su estudio sobre el estrés oxidativo en tejido uterino en embarazos normales y con preclampsia que los lipo-hidroperóxidos están aumentados en plasma mientras que no existieron cambios en el daño oxidativo a proteínas; otro ejemplo es el de un estudio sobre los efectos en el estado oxidativo de pacientes hemodializados tratados con ácido fólico, en este estudio se describe que la lipoperoxidación fue reducida por el tratamiento mientras que la oxidación de las proteínas no mostró cambios (Odetti P, 1996). En otro estudio sobre la modulación de la actividad de SOD en glándulas submandibulares se encontraron resultados similares a los descritos (Barroso AS, 2003). Finalmente, un estudio con pacientes sometidos a transplante renal demostró que ocurre daño oxidativo a proteínas mientras que no hay daño de este tipo en lípidos. Esto sugiere que puede ocurrir daño oxidativo a un tipo de molécula sin que eso involucre necesariamente daños oxidativos de otros tipos (Odetti P et al, 1996). Lo que implica que el proceso por el que se genera el daño oxidativo no involucra un efecto deletéreo a nivel celular sino que es un fenómeno de una alta complejidad que depende de la especie reactiva, la localización y las moléculas involucradas.

En otro trabajo se mostró que en levaduras deficientes de *sod1* y *sod2* se indujo un incremento en la carbonilación de proteínas mitocondriales, estos resultados sugieren que ambas enzimas

tienen la función de proteger las proteínas mitocondriales del daño oxidativo; este trabajo nos sugiere que la disminución de SOD2 observada en nuestro trabajo pudiera estar relacionada al daño oxidativo observado en las proteínas (O'Brien KM, et al, 2004).

Así pues los resultados revelaron que el Ac induce daño celular oxidativo a las proteínas a tiempos cortos de exposición y puede sugerirse que este proceso esta relacionado a la disminución de la actividad de SOD2 aunque se requerirían más estudios para corroborar esta hipótesis. Este resultado correlaciona con otro trabajo en el que se muestra que la disminución de SOD incrementa los niveles de daño oxidativo a proteínas en un modelo diferente (Zhao Y. et al, 2002).

A continuación se estudio la generación de peróxido de hidrógeno que se realizó pues en ambos tipos celulares se encontró una modificación significativa de la actividad de la SOD2 y GPx, no hubo modificación alguna en el valor de este parámetro en ninguno de los modelos. El daño oxidativo observado en proteínas fue por lo tanto independiente de la formación de peróxido de hidrógeno por lo que otra especie reactiva pudiera ser responsable de estas modificaciones.

De estos resultados se pudo observar que en términos generales las células derivadas de hepatoblastoma fueron mas resistentes a los efectos tóxicos del Ac en cuanto a su relación con las enzimas antioxidantes mientras que en el cultivo primario de Hp cultivados el efecto del Ac se reflejó principalmente en una drástica disminución de la SOD2. Esto indica que el efecto del Ac es

dependiente del origen celular; en los dos modelos estudiados en este trabajo, las diferencias de origen (por un lado humano-rata) y la naturaleza del tipo celular (hepatoblastoma-cultivo primario), pudieran ser determinantes en los diferentes comportamiento observados en los experimentos.

Ahora quedaba la cuestión de estudiar los mecanismos involucrados en la recuperación de la actividad de SOD2, la primer pregunta que nos hicimos a este respecto fue si esta recuperación requería de la síntesis de novo de proteína. Con los tratamientos con cicloheximida seguidos de Ac fue posible constatar que para que ocurra la recuperación de la enzima era necesaria la síntesis de novo de proteína. La duración del tratamiento con Ac se eligió tomando en cuenta la hora de inicio del proceso de recuperación que es a las 3h. A continuación evaluamos si la recuperación de la enzima se debía concretamente a la generación de enzima nueva, y se determinó que la expresión de la SOD2 se incrementó significativamente a las 3h.

Además se determinó la cantidad de proteína por Western Blot y se encontró que a 1 h de tratamiento con Ac existió una disminución en la cantidad total de proteína por lo que los cambios de la actividad pudiera estar asociada con la degradación de la proteína, el proceso de recuperación puede observarse como un aumento en la cantidad de proteína que pudiera relacionarse con el aumento en la actividad que ya se ha descrito. Todo esto demuestra que si bien el Ac afecta la fisiología celular, este efecto no establece un estado de daño tal que no permita llevar a cabo acciones que favorezcan la

sobrevivencia celular como la síntesis de proteínas, en particular de la enzima antioxidante SOD2.

A partir de los datos generados en el presente trabajo puede proponerse que como resultado de la exposición de Ac por menos de 24h ocurren modificaciones en la fisiología mitocondrial tales como los efectos sobre la cadena respiratoria mitocondrial y la disminución de la capacidad antioxidante celular lo que promueve modificaciones en el estado redox y daño oxidativo a las proteínas.

En cuanto a los mecanismos por los que esto ocurre no existe evidencia previa que permita plantear una ruta de acción, sin embargo si existen reportes que indican que la oxidación del Ac ocurre principalmente en la mitocondria y está asociada a la cadena respiratoria (Quintanilla ME, Tampier L, 1990) por lo que más estudios se requieren para definir si el metabolismo del Ac en la mitocondria y su efecto en la cadena respiratoria fueran los responsables de los efectos descritos en este trabajo, es decir, estudiar que papel juega el metabolismo del Ac en los efectos observados en una exposición a tiempos cortos.

Algunos estudios previos sugieren que los mecanismos por los cuales los Hp son sensibilizados a agresores externos están aun pobremente entendidos pero pueden involucrar daño en la función mitocondrial y los mecanismos de defensa oxidativa, la activación de vías de señalización entre otras (Hoek JB, Pastorino JG, 2004); nuestros resultados muestran que estos efectos pueden estar relacionados al efecto del Ac.

Se demostró que el Ac indujo una condición oxidativa que generó un daño moderado que no puso en riesgo la sobrevivencia de la célula y que en términos generales fue controlada antes de 24 h, sin embargo, era importante evaluar si este efecto del Ac sobre la fisiología de la célula pudiera tener un efecto en la capacidad de respuesta a nuevas agresiones de tipo oxidativo. La AA ha sido descrita como una molécula capaz de generar estrés oxidativo de manera importante en la célula; empleando el Ac como pre-tratamiento fue posible demostrar que la capacidad de respuesta de los Hp se encontraba abatida. Estos hallazgos pueden sentar la base para comprender las diferencias observadas entre los tratamientos crónicos con los observados a tiempos cortos y exposiciones agudas.

Otro aspecto interesante descrito en el presente trabajo fue que el efecto del Ac parece ser dependiente de la naturaleza del tipo celular como puede estudiarse al comparar los resultados obtenidos con las células HepG2 que provienen de un hepatoblastoma.

Es importante señalar que existen reportes previos en los que se asocia la modificación de la actividad de SOD2 con la malignidad de algunos tipos de cáncer. Se sabe que la desregulación de los niveles de SOD2 puede resultar en un patrón anormal de expresión genética; además, el reemplazo de la SOD reduce la proliferación y restituye la susceptibilidad a la inducción de la apoptosis por la dexametasona en algunas líneas celulares cancerosas (Sodge DR, 2005); asimismo se ha descrito que ratones heterocigotos para el gen *sod2* (*Sod2* +/-) muestran una actividad de SOD2 reducida (50%) lo que induce un aumento en el daño oxidativo a DNA y un

100% de asociación con la incidencia de tumores en los ratones (Van Remmen H, 2003). En el presente trabajo se describió que las células HepG2 expuestas a Ac no mostraron una disminución en la actividad de la SOD2 similar a la que se presenta en los Hp, esto puede ser resultado de su origen canceroso y puede ser una modificación del metabolismo celular que se asocie con su menor susceptibilidad al daño oxidativo. Trabajos similares muestran que la expresión de la SOD2 protege contra el daño oxidativo y suprime el fenotipo maligno de células cancerosas humanas, en este mismo trabajo se muestra que varias líneas celulares cancerosas tienen mutaciones en la región promotora del gen *sod2* lo que lleva a un aumento en los sitios de unión de AP-1 y por lo tanto es probable que la producción de esta proteína este modificada (Xu Y, et al, 2002).

Comprender los mecanismos por los cuales la enzima SOD2 está asociada a la promoción de la carcinogénesis es importante si se considera que los hepatoblastomas son el tipo de cáncer que se presenta con mayor frecuencia en algunos países y la aparición de esta condición esta asociada al consumo de EtOH y por lo tanto, el estudio del papel que el Ac puede estar jugando en este fenómeno debe ser estudiado con más detenimiento.

Dadas las diferencias observadas en las células HepG2 en la actividad de SOD2 podría proponerse como un buen modelo de estudio para estudiar este fenómeno.

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió comprender que si bien el Ac en tiempos cortos de exposición no induce estrés oxidativo de manera directa si promueve una serie de modificaciones en la funcionalidad de la célula, particularmente a nivel mitocondrial, que limita la respuesta celular a agresiones de tipo oxidativo; este fenómeno no había sido descrito anteriormente y brindó nueva información sobre el proceso de daño inicial asociado al consumo de etanol.

Bibliografía

1. Abe J, Kusuvara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem.* 271(28):16586-90.
2. Antunes F, Cadenas E. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentration of H₂O₂. *Free Radical. Biol. Med.* 30:1008-1018.
3. Arai M, Leo MA, Nakano M, Gordon ER, Lieber CS. (1984). Biochemical and morphological alteration of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption. *Hepatology.* 4 (2): 165-74.
4. Bailey, S.M., Cunningham, C.C. (1998). Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreased viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology;* 28:5 1318-1326.
5. Bailey, S.M., Patel, V.B., Young, T.A., Asayama, K., Cunningham, C.C. (2001) Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res;* 25:5 726-733.
6. Barroso AS, Quissell DO, Colepicolo P. (2003). Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. *Arch Oral Biol.* 48(2):133-9.
7. Beers RF, Sizer IW. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 195(1):133-40.
8. Berlett BS, Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272 (33):20313-6.
9. Boveris A, Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* Jul;134(3):707-16.
10. Buege J. A. y Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
11. Cahill A, Cunningham CC, Adachi M, Ishii H, Bailey SM, Fromenty B, Davies A. (2002). Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res.* 26(6):907-15.

12. Campollo O, Valencia-Salinas JJ, Berumen-Arellano A, Perez-Aranda MA, Panduro-Cerda A, Segura-Ortega J. (1997). Epidemiological characteristics of liver cirrhosis at the Hospital Civil of Guadalajara. *Salud Publica Mex.* 39(3):195-200.
13. Cederbaum AI, Lieber CS, Beattie DS, Rubin E. (1975) Effect of chronic ethanol ingestion on fatty acid oxidation by hepatic mitochondria. *J Biol Chem* 10; 250 (13):5122-9.
14. Cunningham CC, Bailey SM.(2001). Ethanol consumption and liver mitochondria function. *Biol Signals Recept*; 10:271-82.
15. Chiarello PG, Vannucchi MT, Moyses Neto M, Vannucchi H. (2003). Hyperhomocysteinemia and oxidative stress in hemodialysis: effects of supplementation with folic acid. *Int J Vitam Nutr Res* 73(6):431-8.
16. Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15(3):532-4, 536-7.
17. DiLuzio NR, Costales F. (1965). Inhibition Of The Ethanol And Carbon Tetrachloride Induced Fatty Liver By Antioxidants. *Exp Mol Pathol.* Apr;28:141-54. DiLuzio 1973
18. Duthie SJ, Melvin WT, Burke MD. (1994). Bromobenzene detoxification in the human liver-derived HepG2 cell line. *Xenobiotica*. 24(3):265-79.
19. Fernandez-Checa JC. (2003). Alcohol induced liver disease: when fat and oxidative stress met. *Ann Hepatol*. 2(2):69-75.
20. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Colell A, Garcia-Ruiz C. (1997). Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res World* 21(4):321-4.
21. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1):G7-17.
22. Fernandez-Checa, J.C., Hirano, T., Tsukamoto, H., Kaplowitz, N. (1993). Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol*; 10:6 469-475.

23. Forman HJ, Williams JJ, Nelson J, Daniele RP, Fishcer AB. (1982). Hyperoxia inhibits stimulated superoxide release by rat alveolar macrophages. *J Appl Physiol.* 53(3):685-9.
24. Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. (2000). Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J* 14(7):847-58.
25. Gopalakrishna R, Anderson WB. (1987). Susceptibility of protein kinase C to oxidative inactivation: loss of both phosphotransferase activity and phorbol diester binding. *FEBS Lett.* 10;225(1-2):233-7.
26. Gutierrez-Ruiz MC, Robles-Diaz G, Kershenovich D. (2002). Emerging Concepts in inflammation and fibrosis. *Arch Med Res* 33(6):595-9.
27. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 23;271(8):4138-42.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1;219(1):1-14.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 10;2(8411):1095.
30. Halliwell B. (1984). Oxygen is poisonous: the nature and medical importance of oxygen radicals. *Med Lab Sci.* 41(2):157-71.
31. Heffetz D, Rutter WJ, Zick Y. (1992) The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J.* 1;288 (Pt 2):631-5.
32. Hill GE, Miller JA, Baxter BT, Klassen LW, Duryee MJ, Tuma DJ, Thiele GM. (1998). Association of malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury. *141(1):107-16.*
33. Hoek JB, Pastorino JG, Cahill A. (2002). Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 122:2049-63.
34. Hoek JB, Pastorino JG. (2004). Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage *Semin Liver Dis*, 2004 24 (3):257-72.

35. Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., Somani, S.M. (2005). Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 25:2 89-97.
36. Kamata H, Hirata, H. (1999). Redox Regulation of cellular signaling. *Cell. Signal.* 23:11(1):1-14.
37. Klotz U, Ammon E. (1998). Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol.* 54(1):7-12
38. Koch O, Palazzotti B, Borrelo S, Colavitti R, Cravero A, Farre S, Galeotti T. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* 25(1-2):191-8.
39. Kokoszka JE; Coskun P, Espoisto LA, Wallace DC. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 27;98(5):2278-83.
40. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y. (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;94(21):11233-7.
41. Krijt J, van Holsteijn I, Hassing I, Vokurka M, Blaauboer BJ. (1993). Effect of diphenyl ether herbicides and oxadiazon on porphyrin biosynthesis in mouse liver, rat primary hepatocyte culture and HepG2 cells. *Arch Toxicol.* 67(4):255-61.
42. Lash LH (2006). Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact.* 163(1-2):54-67.
43. Levak-Frank S, Radner H, Walsh A, Stollberger R, Knipping G, Hoefler G, Sattler W, Weinstock PH, Breslow JL, Zechner R. (1995). Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest* 96(2):976-86.
44. Li W, Jue T, Edwards J, Wang X, Hintze TH. (2004). Changes in NO bioavailability regulate cardiac O₂ consumption: control by intramitochondrial SOD2 and intracellular myoglobin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Jan;286(1):H47-H54. Epub Aug 14.

45. Lieber CS. (2000). Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J Hepatology*, 32: 113-128.
46. Lieber CS. (1984). Alcohol and the liver. Recent developments in preclinical and clinical research. Overview. *Recent Dev Alcohol* 2:93-102.
47. Lowry OH, Rosenbrough N.J., Faar A:L., Randall R.J. (1951). Protein a mechanism with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
48. Lu Y, Cederbaum AI. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 44(5):723-38.
49. Llurba E, Gratacos E, Martin-Gallan P, Cabero L, Dominguez C. (2004). A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic Biol Med.* 15;3(4):557-70.
50. Mantena SK, King AL, Andringa KK, Landar A, Darley-Usmar V, Bailey SM (2007). Novel interactions of mitochondria and reactive oxygen/nitrogen species in alcohol mediated liver disease. *World J Gastroenterol.* 13(37):4967-73.
51. Meister A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 1;269(13):9397-400.
52. Monteiro HP, Stern A. 1996 Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic Biol Med.*;21(3):323-33.
53. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Inmuno. Method*, 65: 55-63.
54. Niemela O. (2001). Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 31(12):1533-8.
55. Niemela O, Parkkila S Koll M, Preedy VR. (2005). Generation of protein adducts with malondialdehyde and acetaldehyde in muscles with predominantly type I or II fibers in rats exposed to ethanol and acetaldehyde dehydrogenasa inhibitos cyanamide. *Alcohol Clin Exp Res* 29(7):1310-6.
56. Niemela O, Parkkila S, Pasanen M, Viitala K, Villanueva JA, Halsted CH. (1999). Induction of cytochrome P450 enzymes and generation of

- protein-aldehyde adducts are associated with sex-dependent sensitivity to alcohol-induced liver disease in micropigs. *Hepatology* 30(4):1011-7.
57. Niemela O. (1999). Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front Biosce* 1;4:D506-13.
 58. Nomura F, Pikkarainen PH, Jauhonen P, Arai M, Gordon (1983). ER, Baraona E, Lieber CS. (Effect of ethanol administration on the metabolism of ethanol in baboons. *J Pharmacol Exp Ther* 227(1):78-83.
 59. O'Brien KM, Dirmeier r, Engle M Poyton R. (2004). Mitochondrial protien oxidation in yeast mutants lacking MnSOD o CuZnSOD. *J Biol Chem*; 279(50):51817-27.
 60. Odetti P, Garabaldi S, Gurreri G, Aragno I, Dapino D, Pronzato MA, Marinari UM. (1996). Protien oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. *Metabolism* 45(11):1319-22.
 61. Oh, S.I., Kim, C.I., Chun, H.J., Park, S.C. (1998). Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J. Nutr* 128:4 758-763.
 62. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport comple I activit through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286(1):135-41.
 63. Pivetta LA, Dafre AL, Zeni G, T Rocha JB, Fairna M. (2006). Acetaldehyde does not inhibit glutathione peroxidase and glutathione reductase from mouse liver in vitro. *Chem Biol Interact Feb* 25; 159 (3): 196-204. Epub Jan.
 64. Porquet D, Appel M, Fournier T, Bertaux O, Biou D, Feger J. (1992). Evaluation of the hepatotoxicological effects of a drug in an in vivo/in vitro model. *Experientia* 15;48(3):257-61.
 65. Powis G, Gasdaska JR, Baker A. (1997). Redox signaling and the control of cell growth and death. *Adv Pharmacol* 38:329-59.
 66. Quintanilla ME, Tampier L, Valle-Prieto A, Sapag A, Israel Y. (2005). Complex I regulates mutat mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity and voluntary ethanol consumption in rats. *FASEB J* 19(1):36-42.
 67. Quintanilla ME, Tampier L. (1990). Acetaldehyde metabolism by isolated hepatic mitochondria from rats consuming different amounts of ethanol. *Toxicology* 63(1):113-21.

68. Quintanilla ME, Tampier L. (1992). Ethanol intake: effect on liver and brain mitochondrial function and acetaldehyde oxidation. *Alcohol*. 9(5):375-80.
69. Rivero-Rosas H., Julian-Sanchez A., Pina E. (1997) Enzimology of Ethanol and Acetaldehyde Metabolism in Mammals. *Archiv Med Res*, 28: 453-471.
70. Roe AL, Snawder JE, Benson RW, Roberts DW, Casciano DA. (1993). HepG2 cells: an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun* 15;190(1):15-9.
71. Roman J, Gimenez A, Lluís JM, Gasso M, Rubio M, Caballeria J, Pares A, Rodes J, Fernandez-Checa JC. (2000). Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells. *J Biol Chem*. 12;275(19):14684-90.
72. Sastre J, Serviddio G, Pereda J, Minana JB, Arduini A, Vendemiale G, Poli G, Pallardo FV, Vina J. (2007). Mitochondrial function in liver disease. *Front Biosci*. 12:1200-9.
73. Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LLP, Somani SM. (2000). Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology* 7(1):25-32.
74. Segel LD. (1984). Mitochondrial respiration after cardiac perfusion with ethanol or acetaldehyde. *Alcohol Clin Exp Res* 8(6):560-4 *Semin Liver Dis*, 2004 aus; 24 (3):257-72. Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage.
75. Seitz HK, Becker P. (2007). Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health*. 30(1):38-41,44-7.
76. Shen HM, Ding WX, Ong CN. (2002). Free Intracellular glutathione as a cofactor in methylseleninic acid-induced apoptotic cell death of human hepatoma HepG2 cells. *Radic Biol Med* 15; 33(4):552-61.
77. Sodge DR, Xiao W, Peng B, Cherry JC, Munroe DJ, Farrar WL. (2005). Enforced expression of superoxide dismutase2/manganese superoxide dismutase disrupts autocrine interleukin-6 stimulation in human multiple myeloma cells and enhances dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res* 15;65(14):6255-63.

78. Stewart S., Jones D., Day C. (2001) Alcoholic Liver Disease: new insights into mechanisms and preventive strategies. *TRENDS Mol Med*, 9: 408-413.
79. Sun Y, Colburn NH, Oberley LW. (1993). Decreased expression of manganese superoxide dismutase mRNA and protein after immortalization and transformation of mouse liver cells. . *Oncol Res*;5(3):127-32.
80. Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, Lati Najma, Jayakumar J, Smolenski RT, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Yacoub MH. (2002). Heat Shock Protein 72 Enhances Manganese Superoxide Dismutase Activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 106(Suppl I):I270-76.
81. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevinian A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 22(1-2):269-85.
82. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J., Kandefer-Szerszen, M. (2002). Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Anal. Biochem*. 28:6 1517-1524.
83. Tanikawa K, Torimura T. (2006). Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol*. 39(1):22-7.
84. Tuma DJ, Casey CA. (2003). Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res Health* 27(4):285-90.
85. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A. (2003). Life-long reduction in NmSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 16;16(1):29-37.
86. Van Remmen H, Williams MD, Guo Z, Estlack L, Yang H, Carlosn EJ, Epstein CJ, Huang TT, Richardson A. (2001). Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(3):H1422-32.
87. Vendemiale G, Grattagliano I, Signorile A, Altomare E. (1998). Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver. *Hepatol* 28(1):46-53.
88. Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee, L, Sanderson T, Kin H, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-USmar V, Bailey SM. (2004).

- Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem* 279(21):22092-101.
89. Villafuerte BC, Goldstein S, Robertson DG, Pao CI, Murphy LJ, Phillips LS. (1992). Nutrition and somatomedin XXIX. Molecular regulation of IGFBP-1 in hepatocyte primary culture. *Diabetes* 41(7):835-42.
 90. Visser O, van den Berg JW, Koole-Lesuis H, Voortman G, Wilson JH. (1991). Porphyrin synthesis by human hepatocytes and HepG2 cells--effects of enzyme inducers and delta-aminolevulinic acid. *Toxicology* 25;67(1):75-83.
 91. Wang SR, Pessah M, Infante J, Catala D, Salvat C, Infante R. (1988). Lipid and lipoprotein metabolism in Hep G2 cells. *Biochim Biophys Acta* 12;961(3):351-63.
 92. Webb C, Twedt D. (2008). Oxidative stress and liver disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38(1):125-35.
 93. Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M., Carrell R.W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 85: 337-341.
 94. Wu D, Cederbaum AI. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 27(4):277-84.
 95. Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK. (2002). Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 1;362(Pt 2):401-2.
 96. Yang SS, Huang CC, Chen JR, Chui CL, Shieh MJ, Lin SJ, Yang SC. (2005). Effects of ethanol on antioxidant capacity in isolated rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 14;11(4):7272-6.
 97. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 1;251(3):549-57.
 98. Zhao Y, Oberley TD, Chaiswing L, Lin SM, Epstein CJ, Huang TT, St CLaair D. (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene* 30:21(24):3836-40.

99. Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B. (2007). Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exp Gerontol* 41(7):653-7.
100. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. (2006). Mechanisms of liver injury. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(1):G1-7.
101. Kakkar P, Singh BK (2007). Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem.* 305(1-2):235-53.
102. Donato MT, Lahoz A, Castell IJV, Gomez-Lechon MJ. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab.* 9(1):1-11.
103. Dierick NA. (1989). Biotechnology aids to improve feed and feed digestive enzymes and fermentation. *Arch Tierernahr.* 39(3):241-61.
104. Kelly JH, Darlington GJ. (1989). Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. *In Vitro Cell Dev Biol* 25(2):217-22.
105. Adler J, Wang SF, Lardy HA. (1957). The metabolism of itaconic acid by liver mitochondria. *J Biol Chem.* 229(2):865-79.
106. Lawrence RA, Burk RF. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71(4):952-8.
107. Borenfreund E, Puerner JA. (1986). Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology.* 39(2):121-34.

El jurado designado por la División de Ciencias Básicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 15 de diciembre de 2008.

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz



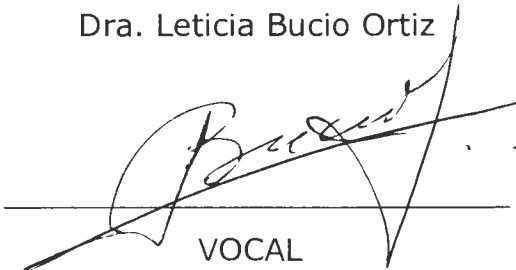
PRESIDENTE

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz



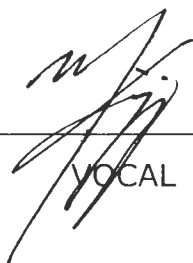
SECRETARIO

Dra. Leticia Bucio Ortiz



VOCAL

Dra. Mina Konigsberg Fainstein



VOCAL

ARTICULO ACEPTADO

1 Cell Biol Toxicol
2 DOI 10.1007/s10565-008-9115-5

4 Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes 5 hepatocytes to oxidative damage

6 Blanca Eugenia Farfán Labonne ·
7 Mario Gutiérrez · Luis Enrique Gómez-Quiroz ·
8 Mina Konigsberg Fainstein · Leticia Bucio ·
9 Verónica Souza · Oscar Flores · Victor Ortiz ·
10 Elizabeth Hernández · David Kershenobich ·
11 María Concepción Gutiérrez-Ruiz

12 Received: 12 August 2008 / Accepted: 15 December 2008
13 © Springer Science + Business Media B.V. 2008

14
15 **Abstract** Acetaldehyde (Ac), the main metabolite of
16 ethanol oxidation, is a very reactive compound involved
17 in alcohol-induced liver damage. In the present work,
18 we studied the effect of Ac in mitochondria functional-
19 ity. Mitochondria from Wistar rats were isolated and

treated with Ac. Ac decreased respiratory control by
50% which was associated with a decrease in adenosine
triphosphate content (28.5%). These results suggested
that Ac could be inducing changes in cell redox status.
We determined protein oxidation, superoxide dismutase
(SOD) activity, and glutathione ratio, indicating that Ac
induced an enhanced oxidation of proteins and a
decrease in SOD activity (90%) and glutathione/
oxidized GSH ratio (36%). The data suggested that
Ac-induced oxidative stress mediated by mitochondria
dysfunction can lead to cell sensitization and to a second
oxidative challenge. We pretreated hepatocytes with Ac
followed by treatment with antimycin A, and this
experiment revealed a noticeable decrease in cell
viability, determined by neutral red assay, in comparison
with cells treated with Ac alone. Our data demonstrate
that Ac impairs mitochondria functionality generating
oxidative stress that sensitizes cells to a second
damaging signal contributing to the development of
alcoholic liver disease.

Keywords Acetaldehyde · Mitochondria · Hepatocytes

Introduction

The mechanism of damage in the alcoholic liver disease
is not completely characterized. It is extensively reported
that chronic ethanol treatment affects mitochondria

Q1 B. E. Farfán Labonne · M. Gutiérrez ·
L. E. Gómez-Quiroz · M. Konigsberg Fainstein ·
L. Bucio · V. Souza · E. Hernández ·
M. C. Gutiérrez-Ruiz (✉)
Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Avenida San Rafael Atlixco 186,
Colonia Vicentina Iztapalapa,
Mexico City 09340, Mexico
e-mail: mcgr@xanum.uam.mx

Q1 O. Flores · D. Kershenobich
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City, Mexico

Q1 V. Ortiz
Fisiología de la Nutrición,
Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas
Salvador Zubirán,
Mexico City, Mexico

Q1 B. E. Farfán Labonne
Posgrado en Biología Experimental,
Departamento de Ciencias de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,
Mexico City, Mexico

functionality impairing oxidative phosphorylation in the liver by a direct effect on the synthesis of proteins encoded in mitochondrial DNA such as cytochrome oxidase and adenosine triphosphate (ATP) synthase (Cahill and Cunningham 2000; Cunningham et al. 1990), or inducing mitochondria oxidative stress by depleting mitochondrial levels of glutathione (GSH; Garcia-Ruiz et al. 1994); however, the direct effects of ethanol metabolites, such as acetaldehyde (Ac), are poorly understood. The potential role of Ac in the pathogenesis of the alcoholic liver disease is recognized, in addition to adducts formation with proteins and DNA (Anni and Israel 1999; Brooks and Theruvathu 2005); Ac can damage mitochondria by a process that involves oxidative stress (Olivares et al. 1997). Lluís et al. (2003) reported that Ac impairs GSH transport in the mitochondria by a mechanism that involves endoplasmic reticulum stress-mediated increase in cholesterol, decreasing mitochondrial GSH levels, which could promote oxidative stress. On the other hand, Ac metabolism induces overproduction of NADH which is oxidized by complex I in the mitochondrial respiratory chain and could eventually produce superoxide anion and oxidative stress. Although the mitochondria are the main source of free radicals, they are also one of the main targets of Ac in causing apoptosis (Colell et al. 2004; Hoek et al. 2002) or elimination of malfunctioning mitochondria by mitoptosis (Lyamzaev et al. 2008). Ac has been also implicated as one of the main factors in alcohol-related carcinogenesis, generating point mutations, sister chromatid exchanges, and gross chromosomal aberrations (Brooks and Theruvathu 2005). Since mitochondrial damage induces both reactive oxygen species (ROS) formation and decrease in antioxidant defense system, it is possible that it could provoke cell sensitization to a second challenge that leads to progression of the alcoholic liver disease. An understanding of how mitochondria functions are affected by Ac may provide important views into the mechanism associated with alcohol liver damage.

Materials and methods

Isolation of hepatocytes

The hepatocytes were isolated from male Wistar rats (200 g) by collagenase perfusion as we reported

previously (Santiago-Lomeli et al. 2005). Hepatocytes were plated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) containing L-glutamine (4 mM), penicillin/streptomycin (1%), insulin (20 mU/ml), and 10% fetal bovine serum at a density of 2.5×10^4 cells/cm² and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. After 24 h, hepatocytes were incubated with 80 µM Ac in a serum-free medium. The culture dishes were kept tightly closed and wrapped with parafilm to prevent Ac evaporation.

Culture of HepG2 cells

The HepG2 cells, a human hepatocellular carcinoma cell line, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). HepG2 cells were routinely grown in a monolayer culture in the presence of a Williams E medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 mg/ml). Cells were grown at 37°C in disposable plastic bottles (Nunc, USA) in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The medium was replaced twice a week, and cells were trypsinized and diluted every 7 days at a ratio of 1:3.

Liver mitochondria isolation

Mitochondria were isolated from Wistar male rats following the method described by Johnson (1963). Briefly, liver was homogenized in SHE-1 buffer (0.25 M sucrose, 5 mM HEPES, and 1 mM EGTA; pH 7.4) and centrifuged at 750×g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and centrifuged at 7,000×g for 10 min at 4°C, and the pellet was resuspended in SHE-1 buffer with 1% BSA and centrifuged for 10 min at the same conditions. The new pellet was resuspended in SHE-2 buffer (0.25 M sucrose, 5 mM HEPES; pH 7.4) and centrifuged at 10,700×g for 10 min at 4°C. The last pellet, containing the mitochondria fraction, was finally resuspended in 500 µl of SHE-2 buffer. Aliquots were kept at -20°C for protein determination. Mitochondria were used immediately.

Isolation of mitochondria from cell culture

Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), scraped off, and suspended in cold

133 buffer A (10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM
134 Tris, pH 7.5) for 15 min. Cells were disrupted using
135 a dounce glass homogenizer and stabilized immedi-
136 ately with uptake buffer B (70 mM sucrose, 1 mM
137 KH₂PO₄, 5 mM sodium succinate, 5 mM HEPES,
138 220 mM mannitol, 0.1 mM EDTA, pH 7.4). The
139 homogenate was centrifuged twice at 500×g for
140 5 min at 4°C. The resulting supernatant was
141 centrifuged at 13,000×g for 20 min. The mitochon-
142 drial pellet was resuspended in uptake buffer B and
143 then broken by sonication on ice, and the remaining
144 membranes were eliminated by centrifugation
145 60,000×g for 90 min at 4°C. Mitochondria were
146 used immediately.

147 Mitochondrial functionality by MTT assay

148 The mitochondria functionality was determined with
149 an 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dihenyltetrazo-
150 lium bromide (MTT) test according to Mosmann
151 (1983). The assay measures the conversion of MTT to
152 insoluble formazan by succinate dehydrogenase en-
153 zyme of the intact mitochondria of living cells.
154 Primary rat hepatocytes and HepG2 cells were seeded
155 into 24-well microplates at a semi-confluent density
156 (200,000 cells/well). After 24 h, the medium was
157 replaced by one without serum containing 80 µM Ac
158 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and allowed to be in
159 contact with cells for 24 h. The cells were washed
160 with PBS, pH 7.4, and a solution of MTT 0.5 mg/ml
161 in PBS, pH 7.5 was added. The cells were incubated
162 for 3 h at 37°C and after that, washed with PBS.
163 Then, 500 µl of 0.04 M HCl (prepared in isopropa-
164 nol) was added and maintained for 15 min to
165 solubilize the formazan produced. The solution of
166 each well was centrifuged and the optical density
167 (OD) was read at 570 nm. The data are expressed as
168 the percentage of viable cells in Ac-treated cells
169 compared to untreated cells.

170 Cytochrome c release

171 Cells treated with 80 µM Ac for different time
172 points were washed with PBS and resuspended in
173 permeabilization buffer (120 µM KCl, 10 mM
174 NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 20 µM Hepes-Tris, 1 µg/ml
175 leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 40 µg/ml digitonin,
176 pH 7.2) for 15 min at 4°C, and then cell suspension
177 was thoroughly vortexed. After this, cells were

centrifuged at 14,000×g for 10 min at 4°C. The 178
supernatant (cytosolic fraction) and the mitochondria- 179
containing pellet were aliquoted and kept at -80°C 180
until use. 181

Western blot

Proteins were separated by electrophoresis using 4– 183
20% gradient Duramide precast gels (Cambrex, 184
Rockland, ME, USA) and transferred to polyvinyli- 185
dene difluoride membranes (Invitrogen, Carlsbad, 186
CA, USA). Immunodetection was performed using 187
the primary antibody anti-cytochrome c (Santa Cruz 188
Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Secondary 189
anti-rabbit (Amersham, Pistacaway, NJ, USA) were 190
used in a dilution 1:10,000 followed by horseradish 191
peroxidase-conjugated secondary antibody anti-rabbit 192
and detection by an incubation with SuperSignal West 193
Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) and X-ray 194
Film (Kodak Co.). 195

GSH/GSSG content

GSH and oxidized GSH (GSSG) content were deter- 197
mined by high-performance liquid chromatography 198
(HPLC) following the method reported by Fariss and 199
Reed (1987) with some modifications (Gomez-Quiroz 200
et al. 2008). 201

Respiratory control assay

Respiratory rate was analyzed at 25°C in a YSI 203
5300 oxygraph fitted with a Clark-type electrode 204
(YSI Incorporated, USA) as reported previously 205
(Konigsberg et al. 2001). Briefly, 1.5 mg of 206
mitochondria protein was added to 2 ml of respira- 207
tory substrates 5 mM glutamate and 5 mM malate in 208
the respiration medium (230 mM sucrose, 10 mM 209
triethylamine, 5 mM potassium phosphate, 3 mM 210
MgCl₂; pH 7.4). State 3 respiration was induced with 211
100 µM ADP and calculated as nano atom O per 212
minute per milligram protein. Ac (20, 40, and 213
80 µM) was added before ADP directly to the 214
respiration medium. Carbonyl cyanide m-chlorophe- 215
nylhydrazine (CCCP) was used as positive control. 216
Oxygen consumption rate was calculated immedi- 217
ately after Ac was added, from the slope of the 218
straight line obtained. Data are reported as the ratio 219
[state 3 respiration]/[state 4 respiration]. 220

221	Adenosine triphosphate assay	263
222	ATP content was measured from 4×10^6 cells homog-	264
223	enized in ice-cold phosphate-buffered saline. Cell	265
224	suspensions and ATP standards were then mixed with	266
225	an ATP-dependent light-emitting luciferase reagent	267
226	(Celltiter-Glo, Promega, Madison, WI, USA), and	
227	ATP content was measured in a luminescent counter	
228	(Beckman-Coulter). To standardize the unit of ATP	
229	concentration, the protein content was determined	
230	using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit	
231	(Pierce, Rockford, IL, USA) and the unit of ATP	
232	concentration was expressed as micromole per milli-	
233	gram protein.	
234	Superoxide dismutase activity	
235	SOD activity was determined by the method of	
236	Winterbourn et al. (1975). It is based on the ability	
237	of SOD to inhibit the reduction of nitro-blue	
238	tetrazolium by superoxide anion.	
239	Protein oxidation	
240	Oxidative modification of proteins generates protein	
241	carbonyl groups which represent a hallmark of	
242	oxidation status of all proteins. Carbonyl groups were	
243	immunodetected using the Oxyblot kit (Chemicon)	
244	according to the manufacturer's instructions.	
245	Neutral red assay	
246	The neutral red assay is a cell survival and viability	
247	chemosensitivity assay, based on the ability of viable	
248	cells to incorporate and bind the weak cationic dye	
249	neutral red, which penetrates into the cells by non-	
250	ionic diffusion, accumulating in lysosomes by inter-	
251	action with anionic sites in the lysosomal matrix. The	
252	amount of dye was quantified spectrophotometrically	
253	and compared with control cultures as described by	
254	Borenfreund and Puerner (1986). Briefly, 6×10^4 cells	
255	were seeded in a four-well multichamber. After the	
256	end of treatment, the medium was changed for one	
257	containing 40 $\mu\text{g/ml}$ of neutral red. A control multi-	
258	chamber received medium without dye and served as	
259	blank. After 2 h of incubation, cultures were rapidly	
260	rinsed with a mixture containing 4% formaldehyde/	
261	1% calcium chloride to remove extracellular neutral	
262	red. Following removal of the formaldehyde mixture,	
	0.5 ml of 1% acetic acid/50% ethanol was added to	263
	each well to extract the dye from the lysosomes.	264
	Absorbencies were read at 540 nm. Results were	265
	expressed as percent of absorbance of neutral red	266
	compared to control cultures.	267
	Complex V activity	268
	ATP-hydrolase activity from complex V was deter-	269
	mined by measuring the release of inorganic phos-	270
	phate (Pi) as described by Flores-Herrera et al. (1999).	271
	Mitochondria (50 μg of protein) were sonicated and	272
	incubated in 30 mM Tris-HCl (pH 8.5), at 30°C, final	273
	volume 0.5 ml. The ATP-hydrolase reaction was	274
	started by the addition of the substrate (Mg-ATP	275
	complex) plus 1 mM of free cation (Mg^{2+}). Aliquots	276
	were withdrawn at intervals of 5 min and mixed with	277
	the malachite-molybdate-Triton X-100 mixture for Pi	278
	determination, as described by Lanzetta et al. (1979).	279
	ATP-hydrolase activity from complex V was also	280
	assayed in the presence of oligomycin (10 $\mu\text{g/mg}$	281
	protein), a specific inhibitor of F_1F_0 -ATP synthase as	282
	a control.	283
	Protein content	284
	Protein concentrations were determined using a BCA	285
	kit (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA), according	286
	to the manufacturer's instructions.	287
	Data analysis	288
	Data are reported as mean $\pm$ standard error (SE) for at	289
	least three independent experiments carried out in	290
	triplicate. The SPSS package version 10 was used to	291
	run the analysis. Comparison among groups was done	292
	by ANOVA, and Tukey's method was used for	293
	multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered as	294
	statistically significant.	295
	Results	296
	It is well known that Ac is a highly toxic compound	297
	by its capacity to form adducts with proteins and	298
	DNA (Brooks and Theruvathu 2005; Patel et al.	299
	2005), to impair GSH import into the mitochondria	300
	(Lluis et al. 2003), and to induce proinflammatory	301
	cytokines expression (Gomez-Quiroz et al. 2003).	302

303 Although some approaches have been given regarding
304 the mechanism of Ac-induced cellular damage, the
305 exact mechanism remains unexplained. In the present
306 work, we characterized the effects of Ac on some
307 parameters of mitochondrial functionality.

308 We tested succinate dehydrogenase activity by
309 MTT assay in both HepG2 cells and primary rat
310 hepatocytes. We confirmed that Ac impairs the
311 mitochondria in both cell types, decreasing mitochon-
312 dria functionality 27% in primary rat hepatocytes and
313 18% in HepG2 cells (data not shown), and these data
314 are in agreement with previous reports published by
315 our group (Olivares et al. 1997) and others (Jung et al.
316 2006; Ni et al. 2001; Signorini-Allibe et al. 2005)
317 regarding the fact that the mitochondria is one of the
318 main targets of Ac. On the other hand, our data
319 suggest that transformed cells such as HepG2 cell line
320 are more resistant to Ac-induced damage which is out
321 of the physiological characteristic of normal hepato-
322 cytes. For this reason, we decided to continue our
323 experiments with primary rat hepatocytes.

324 In order to determine if there was a deterioration in
325 energetic metabolism due to Ac exposure, liver
326 mitochondria from Wistar rats were isolated and the
327 respiratory control index (RC), i.e., [state 3 respira-
328 tion]/[state 4 respiration], as well as the respiration
329 with glutamate–malate as substrate, was determined.
330 Table 1 illustrates the RC as a function of Ac
331 concentration. Our results indicate that there is a
332 significant difference between the RC of mitochon-
333 dria exposed to Ac against the control mitochondria.
334 Mitochondria subjected to 20 and 40 μ M Ac
335 diminished their RC almost 50% and when they were
336 exposed to 80 μ M Ac, the RC decreased fourfold,
337 suggesting an uncoupling effect. CCCP was used as a
338 positive control for uncoupling.

339 The RC result was associated with an impairment
340 in complex V activity judged by a decrease in such
341 enzyme activity (Fig. 1a) and an early decrease in
342 ATP content (28.5%) at 1 h of Ac treatment (Fig. 1b),
343 supporting the hypothesis of mitochondrial impair-
344 ment induced by Ac. These phenomena are strongly
345 related with ROS generation, so we decided to
346 analyze protein oxidation assaying protein carbonyl
347 groups which represent a hallmark of the oxidation
348 status. Ac induced a significant increase in protein
349 oxidation at 12 and 24 h of treatment (Fig. 2), which
350 supports the thought that Ac induces oxidative stress
351 by impairment in mitochondria functionality. In order

Table 1 Acetaldehyde impairs mitochondrial respiratory rate

Ac (μ M)	RC
0	4.61 $\pm$ 0.49
20	2.45 $\pm$ 0.16*
40	2.65 $\pm$ 0.51*
80	1.82 $\pm$ 0.42*
CCCP	0.97 $\pm$ 0.2*

Effects on respiratory rate induced by acetaldehyde. Mitochon-
dria (1 mg/ml) from primary rat hepatocytes were isolated and
three different Ac concentrations (20, 40, and 80 μ M) were
added to respiratory buffer containing mitochondria. Gluta-
mate–malate was used as substrate. Respiratory rate was
calculated as O₂ consumption on state 3/state 4. CCCP was
used as positive control. Values represent the mean ($\pm$ SD) of at
least three independent experiments carried out in triplicate

* $p \leq 0.05$, significantly different from not treated (NT) cells as
control

to validate these data, we decided to explore if Ac can
promote cytochrome c release into the cytosol. Hepatocytes
were treated with 80 μ M Ac for 1–24 h, and cytochrome c
release into the cytosol was evaluated by Western blot. Figure 3
shows that Ac induced the release of cytochrome c since 3 up to
24 h and peaked at 12 h. These data confirm the perturbation
of mitochondria due to Ac toxicity. One of the major antioxidant
proteins in the mitochondria is SOD2, and to address the status
of this enzyme, we explored its activity. Hepatocytes were
treated with 80 μ M for 15 and 30 min and 1, 3, 6, 12, and 24 h.
Ac induced a decrease in SOD2 activity (Fig. 4) at early time
points, 83% at 15 min and 97% at 30 min of treatment. Sur-
prisingly, the activity was partially recovered along the time
since 3 h of treatment. However, the recovery in the activity
did not reach control values remaining to be affected at 12 and
24 h (47% and 54%, respectively). These results suggest a
prominent role of SOD2 in maintaining mitochondria func-
tionality in terms of oxidative stress. To examine whether this
effect on SOD2 is due to a direct interaction of Ac with the
enzyme (adduct formation), we performed a free cell system
study. Total mitochondria proteins were isolated and treated
or not with 80 μ M for 15 and 60 min. As a control, we used
commercial SOD from *E. coli* which was subjected to the
same conditions as mitochondrial lysate: there was no effect
on SOD activity, suggesting that the effects of Ac on SOD2
are not by adduct formation (data not shown). To address if
another oxidative stress

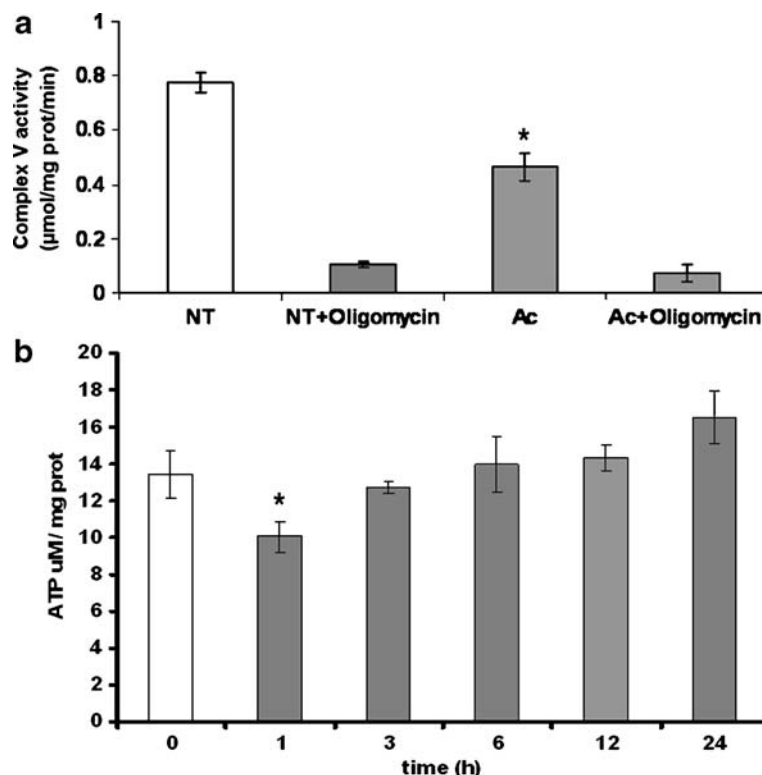


Fig. 1 Acetaldehyde effects on ATP content and complex V activity. Primary rat hepatocytes were serum-starved for 16 h and incubated with Ac 80 μM for different time points (0–24 h). **a** ATP-hydrolase activity from complex V was determined by measuring the release of inorganic phosphate (Pi) as described in “Materials and methods”. Data are

standardized by milligram of protein. **b** ATP content was analyzed by an ATP-dependent light-emitting luciferase reagent using samples of ATP with known concentration as standard curve. Values represent the mean (±SD) of at least three independent experiments carried out in triplicate. *NT* not treated cells. * $p \leq 0.05$, significantly different from not treated cells

parameter is affected by Ac, we explored GSH/GSSG ratio by HPLC analysis. Ac treatment decreased GSH/GSSG ratio by 36% (Fig. 5) regarding untreated cells at 6 h, and this fall was recovered at 12 and 24 h. GSH/GSSG recovery relates to SOD2 activity improvement, suggesting that Ac induces mitochondrial damage by impairment on the mitochondrial antioxidant system. Finally, we wondered whether Ac-induced mitochondrial damage sensitizes cells to a second oxidative challenge. We pretreated cells with Ac 80 μM for 1 h and then treated or not with antimycin A (AA) 15 μM for 0, 6, 12, and 24 h and then we proceeded to measure cell viability by the incorporation of the supravital dye neutral red into lysosomals of viable cells. Figure 6 shows that Ac-pretreated cells were more susceptible to AA treatment than Ac-untreated cells, judged by a decrease in cell viability, suggesting that Ac sensitizes cell to a second oxidative challenge.

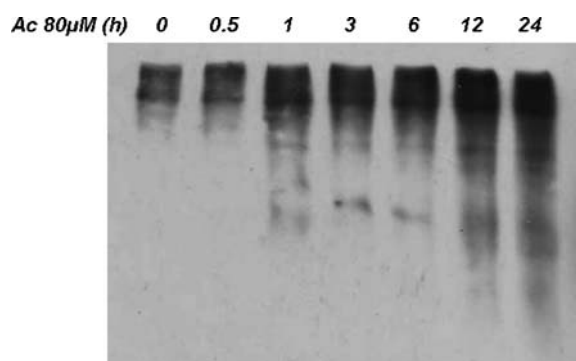


Fig. 2 Protein carbonyl groups induced by acetaldehyde. Primary rat hepatocytes were serum-starved for 16 h and incubated with Ac 80 μM for 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h. Carbonyl groups as a result of protein oxidation was determined by Western blot using the Oxyblot kit according to the manufacturer’s instructions. Image is a representative Western blot of three independent experiments

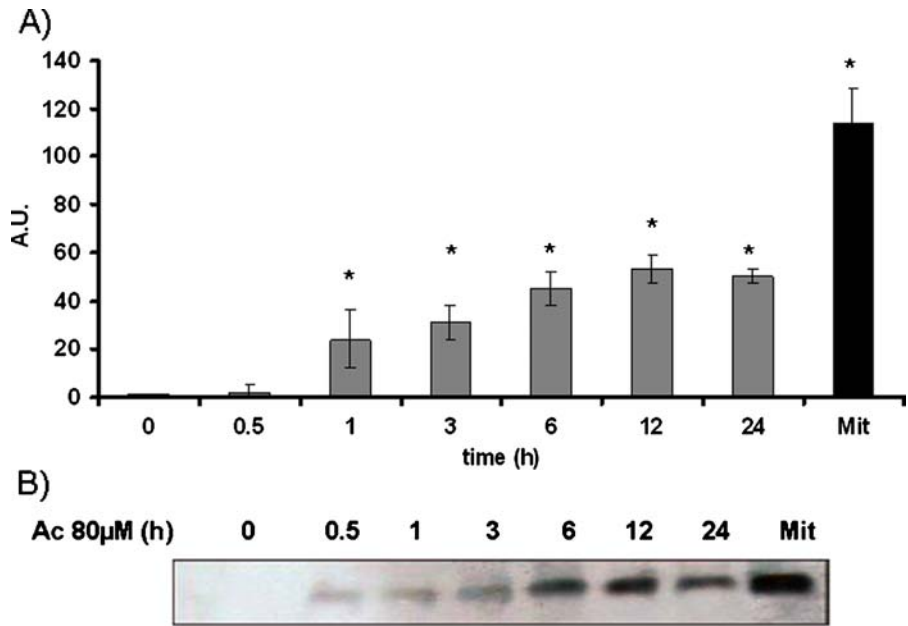


Fig. 3 Cytochrome c release. Primary rat hepatocytes were serum-starved for 16 h and incubated with Ac 80 μ M for 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h. Cytosol fractions were immunoblotted with anti-cytochrome c. Mitochondrial protein (*Mit*) was used as positive control. **a** The intensity of each band was quantified

by densitometry and expressed as densitometric arbitrary units (A.U.). **b** Representative Western blot of three experiments. Values represent the mean ($\pm$ SD) of at least three independent experiments. * $p \leq 0.05$, significantly different from not treated cells

Discussion

The present study provides evidence whereby Ac, a metabolite of the oxidative metabolism of ethanol, induces cellular damage by impairment of mitochondria functionality which sensitizes cells to oxidative challenge. Previously, our group reported that Ac induces oxidative damage (Gutierrez-Ruiz et al. 2001; Olivares

et al. 1997) and the production of proinflammatory cytokines such as IL-8 (Gomez-Quiroz et al. 2003; Gomez-Quiroz et al. 2005) that contributes to parenchyma damage. In the present study, we are characterizing the effect of Ac on some parameters of mitochondrial functionality that leads to cellular injury.

Our data confirmed that Ac generates mitochondrial dysfunction. Respiratory rate data are in agreement

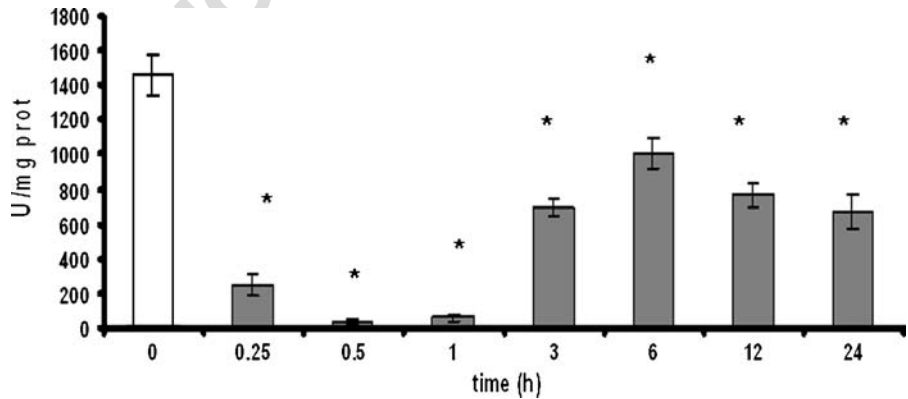


Fig. 4 Superoxide dismutase 2 activity. Primary rat hepatocytes were serum-starved for 16 h and incubated with Ac 80 μ M for 15 and 30 min and 1, 3, 6, 12, and 24 h. SOD2 activity was assayed according to the method of Winterbourn.

Values represent the mean ($\pm$ SD) of at least three independent experiments carried out in triplicate. * $p \leq 0.05$, significantly different from not treated cells

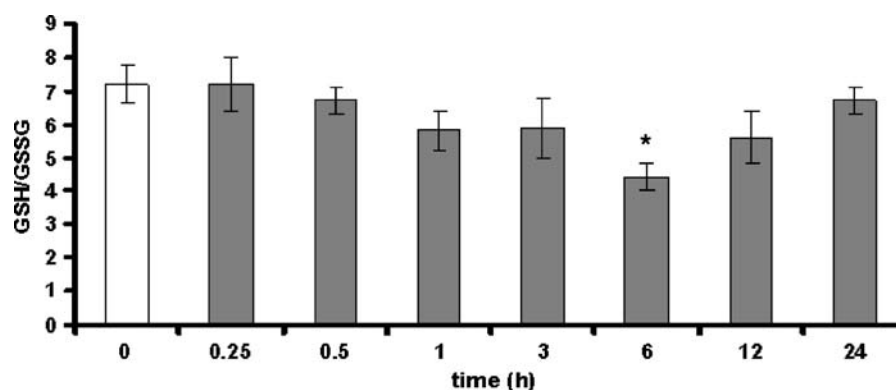


Fig. 5 GSH/GSSG content. The ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) was determined by HPLC in serum-starved primary rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with Ac (80 μ M) for 15 and 30 min and 1, 3, 6,

12, and 24 h. Each column represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, significantly different from not treated cells

with our previous work where we reported that the human fetal hepatic cell line WRL-68 treated with Ac decreased oxygen consumption. Actually, there is a slight relationship between chain respiratory and Ac. Hasumura et al. (1976) reported that Ac oxidation is linked to the respiratory chain and coupled with oxidative phosphorylation; moreover, they proved that Ac has an inhibitory effect on mitochondrial respiration. These mitochondrial events induced by Ac were associated with a transient ATP decrement at 1 h of treatment due to an impairment in complex V activity (Fig. 1a, b). In fact, redox balance in the

mitochondria is dependent on ATP levels due to the fact that GSH uptake into the mitochondria is an active, energy-dependent process that is stimulated by ATP (Lluis et al. 2003).

Our current data revealed that Ac induced cytochrome c release as early as 30 min. This result was in agreement with RC data, supporting the fact that the mitochondria are direct targets for Ac. In addition to Ac-induced cytochrome c release, Anni and Israel (1999) reported that Ac can form adducts with this mitochondrial protein. This interaction probably affects the interaction of cytochrome c with its partner

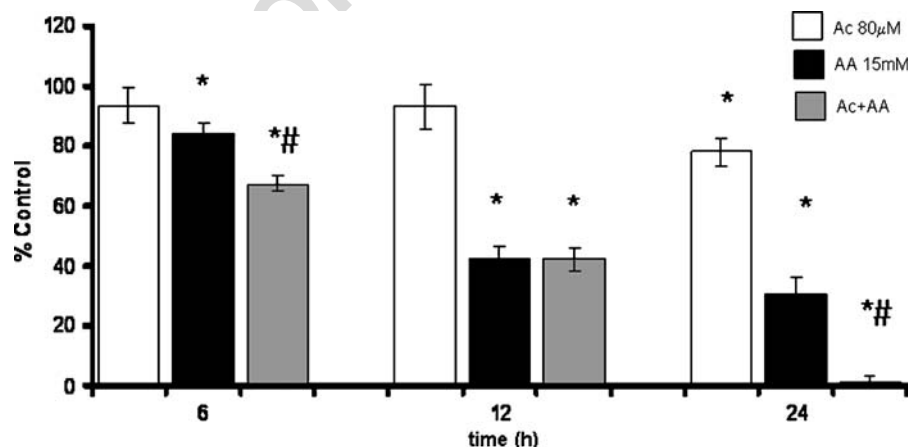


Fig. 6 Neutral red cell viability assay. Primary rat hepatocytes were serum-starved for 16 h and pretreated or not with Ac 80 μ M for 1 h following treatment with antimycin A 15 μ M for 6, 12, and 24 h. White columns represent Ac treatment alone, black columns represent antimycin A treatment alone, and gray

columns represent acetaldehyde pretreatment following antimycin A treatment. Each column represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, significantly different from not treated cells. # $p \leq 0.05$, significantly different from antimycin A alone for each time of treatment

enzymes, cytochrome reductase and oxidase, which could lead to mitochondrial dysfunction, oxidative stress damage, and apoptosis (Kroemer et al. 1998). Our data indicate that hepatocytes treated with Ac presented protein oxidation (Fig. 2), which is a clear marker of oxidative damage. The source of Ac-induced ROS is not well defined, and it is reported that ethanol metabolism-derived aldehydes can activate NADPH oxidase in a model of alcoholic liver diseases (Kono et al. 2000). Furthermore, Wenzel et al. (2008) reported that Ac induces mitochondrial oxidative stress in the aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice, suggesting that this enzyme has an indirect antioxidant property of decreasing Ac concentration. ROS production is narrowly related with modulation of some antioxidant proteins. SOD2 (Mn-SOD) in the mitochondria has a prominent role in regulating superoxide anion derived from respiratory chain or those generated by other systems (Koch et al. 2004). We hypothesized that due to Ac-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress generation, SOD2 could be affected. Our data showed that SOD2 activity is impaired by Ac treatment at early time points; however, it is partially recovered, suggesting an adaptive response of hepatocytes to deal with ROS production. Previous work of our lab (Gomez-Quiroz et al. 2003) showed that also GSH peroxidase and catalase activities are affected by Ac, indicating that although SOD2 activity is partially recovery at 24 h, catalase and GSH peroxidase are not, leading to hydrogen peroxide accumulation and oxidative cell damage. It is well known that Ac forms adducts with a wide range of proteins leading to protein impairment (Patel et al. 2005; Tuma 2002); however, free cell assay of SOD activity did not show any difference, suggesting that SOD damage is a consequence of mitochondrial failure. The effect of Ac on SOD2 was associated with GSH/GSSG ratio: Ac induced a significant decrease at 6 h and the ratio was recovered at the same time that SOD2 did it, and these data support strongly that Ac-induced mitochondria damage is a coordinated process that involves multiple failure of mitochondria functions. Data presented here suggest strongly that mitochondrial damage induced by Ac is due to a multifactorial challenge on the mitochondria. Ac induced a transient oxidative stress that could be corrected with GSH levels which, after a temporary decrease, are recovered at 12 h, similar to what the

SOD2 activity partially did. Many antioxidant proteins such as SOD, catalase, or γ -glutamylcysteine synthetase are driven by NF- κ B which could be activated by Ac and oxidative stress (Gomez-Quiroz et al. 2005; Roman et al. 1999). Previous work of our group showed that Ac is capable of activating NF- κ B and modulating gene expression. These data suggest that the recovery in SOD2 activity and GSH levels after Ac treatment could be mediated by NF- κ B activation. In alcoholic liver disease, many toxics derived from ethanol metabolism coexist with Ac such as 1-hydroxyethyl radical, malondialdehyde, or ROS (Albano 2006) which target the damaged mitochondria. Hepatocytes pretreated with Ac and then treated with AA showed a higher damage in comparison with those treated with AA alone judged by the neutral red test, suggesting that Ac sensitizes hepatocytes to a second oxidative challenge. It has been reported recently that oxidative stress sensitizes hepatocytes to cell death (Gomez-Quiroz et al. 2008) by a mechanism driven by a decrease in GSH content and the overactivation of the well-known generator of free radicals, NADPH oxidase. In conclusion, our data show that Ac has its main target the mitochondria, inducing on them dysfunction and oxidative stress that lead to sensitization and further oxidative challenge.

Acknowledgments This work was partially funded by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 45921 and 61544), Secretaría de Educación Pública (PIFI2006-35-129-346/CA 142006-35-40), and the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

References

- Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc.* 2006;65:278–90. doi:10.1079/PNS2006496.
- Anni H, Israel Y. Characterization of adducts of ethanol metabolites with cytochrome c. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23:26–37.
- Borenfreund E, Puerner JA. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology.* 1986;39:121–34. doi:10.1016/0300-483X(86)90130-7.
- Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol.* 2005;35:187–93. doi:10.1016/j.alcohol.2005.03.009.
- Cahill A, Cunningham CC. Effects of chronic ethanol feeding on the protein composition of mitochondrial ribosomes. *Electrophoresis.* 2000;21:3420–6. doi:10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3420::AID-ELPS3420>3.0.CO;2-Q.

- 541 Colell A, Garcia-Ruiz C, Mari M, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett.* 2004;560:63–8. doi:10.1016/S0014-5793(04)00071-7.
- 546 Cunningham CC, Coleman WB, Spach PI. The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. *Alcohol Alcohol.* 1990;25:127–36.
- 549 Fariss MW, Reed DJ. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol.* 1987;143:101–9. doi:10.1016/0076-6879(87)43018-8.
- 553 Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP, Rendon JL, Martinez F. A novel ATP-diphosphohydrolase from human term placental mitochondria. *Placenta.* 1999;20:475–84. doi:10.1053/plac.1999.0401.
- 557 Garcia-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:193–201. doi:10.1172/JCI117306.
- 562 Gomez-Quiroz L, Bucio L, Souza V, Escobar C, Farfan B, Hernandez E, Konigsberg M, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide. *Hepatol Res.* 2003;26:134–41. doi:10.1016/S1386-6346(03)00010-X.
- 568 Gomez-Quiroz LE, Paris R, Lluís JM, Bucio L, Souza V, Hernandez E, Gutierrez R, Santiago M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Differential modulation of interleukin 8 by interleukin 4 and interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver Int.* 2005;25:122–30. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01005.x.
- 575 Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgerisson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008;283:14581–9.
- 579 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. *Isr Med Assoc J.* 2001;3:131–6.
- 584 Hasumura Y, Teschke R, Lieber CS. Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1976;251:4908–13.
- 587 Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology.* 2002;122:2049–63. doi:10.1053/gast.2002.33613.
- 590 Johnson RM. Swelling studies on liver mitochondria from essential fatty acid deficient rats. *Exp Cell Res.* 1963;32:118–29. doi:10.1016/0014-4827(63)90073-9.
- 593 Jung TW, Lee JY, Shim WS, Kang ES, Kim JS, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. Adiponectin protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:616–23. doi:10.1016/j.bcp.2006.05.013.
- 598 Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farre S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* 2004;25:191–8. doi:10.1016/j.mam.2004.02.019.
- Konigsberg M, López-Diazguerrero N, Bucio L, Gutierrez-Ruiz M. Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from an hepatic cell line. *J Appl Toxicol.* 2001;21:323–9. doi:10.1002/jat.763.
- Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest.* 2000;106:867–72. doi:10.1172/JCI9020.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619–42. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.619.
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* 1979;100:95–7. doi:10.1016/0003-2697(79)90115-5.
- Lyamzaev KG, Nepryakhina OK, Saprunova VB, Bakeeva LE, Pletjushkina OY, Chernyak BV, Skulachev VP. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777:817–25. doi:10.1016/j.bbabi.2008.03.027.
- Lluís JM, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology.* 2003;124:708–24. doi:10.1053/gast.2003.50089.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Ni R, Leo MA, Zhao J, Lieber CS. Toxicity of beta-carotene and its exacerbation by acetaldehyde in HepG2 cells. *Alcohol Alcohol.* 2001;36:281–5. doi:10.1093/alcalc/36.4.281.
- Olivares IP, Bucio L, Souza V, Carabez A, Gutierrez-Ruiz MC. Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology.* 1997;120:133–44. doi:10.1016/S0300-483X(97)03650-0.
- Patel VB, Worrall S, Emery PW, Preedy VR. Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. *Alcohol Alcohol.* 2005;40:485–93. doi:10.1093/alcalc/agh196.
- Roman J, Colell A, Blasco C, Caballeria J, Pares A, Rodes J, Fernandez-Checa JC. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Hepatology.* 1999;30:1473–80. doi:10.1002/hep.510300623.
- Santiago-Lomeli M, Gomez-Quiroz LE, Ortiz-Ortega VM, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis. *Life Sci.* 2005;76:2569–79. doi:10.1016/j.lfs.2004.10.048.
- Signorini-Allibe N, Gonthier B, Lamarche F, Eysseric H, Barret L. Chronic consumption of ethanol leads to substantial cell damage in cultured rat astrocytes in conditions promoting acetaldehyde accumulation. *Alcohol Alcohol.* 2005;40:163–71. doi:10.1093/alcalc/agh097.

- 663 Tuma DJ. Role of malondialdehyde–acetaldehyde adducts in 669
664 liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:303–8. 670
665 doi:[10.1016/S0891-5849\(01\)00742-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00742-0). 671
666 Wenzel P, Muller J, Zurmeyer S, Schuhmacher S, Schulz E, 672
667 Oelze M, Pautz A, Kawamoto T, Wojnowski L, Kleinert 673
668 H, Munzel T, Daiber A. ALDH-2 deficiency increases 674
675 cardiovascular oxidative stress—evidence for indirect
antioxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun.*
2008;367:137–43. doi:[10.1016/j.bbrc.2007.12.089](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.089).
Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The
estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab
Clin Med.* 1975;85:337–41.

UNCORRECTED PROOF