

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Inducción de IL 8 mediada por acetaldehído y LPS en
células HepG2 pretratadas con LPS: participación del
TNF α y del estrés oxidativo”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA

Biol. Exp. Blanca Eugenia Farfan Labonne

Tutor

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

ASESORES

M. en B.E. Luis Enrique Gómez Quiroz
Dr. David Kershenovich
Dra. Victoria Chagoya Haza

México, D.F.
Octubre 2002

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, de la 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, y con la asesoría del M. en B.E. Luis Enrique Gómez Quiroz del mismo departamento. Asimismo se contó con la asesoría de la Dra. Victoria Chagoya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y del Dr. David Kershenovich del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

La Maestría 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.

ABREVIATURAS

A	Adenina
Ach	Acetaldehído
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
ADNc	Acido Desoxiribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de Varianza
AP1	Proteína Activadora 1
ARNasas	Acido Ribonucleicasas
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina Sérica Bovina
C	Citosina
CAT	Catalasa
Cit P450	Citocromo P 450
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
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
g	Gramo
Gd Cl ₃	Cloruro de Gadolinio
GSH	Glutación Reducido
GSHpx	Glutación Peroxidasa
GSHRd	Glutación Reductasa
GSSG	Glutación Oxidasa
h	Horas
HepG2	Línea celular derivada de hepatoblastoma humano
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
IL 8RA	Receptor tipo A de IL 8
IL 8RB	Receptor tipo B de IL 8
Kd	Kilodalton
LB	Buffer de carga
LBP	Proteína Unidora a LPS
LPO	Lipoperoxidación
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MEOS	Sistema Microsomal Etanol-Oxidante
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido

NFκB	Factor nuclearκB
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Buffer de Fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PL	Pretratamiento con LPS
PT	Pretratamiento con TNFα
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retro-transcripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
-SH	Grupo tilo
SOD	Super óxido dismutasa
T	Timina
TCA	Acido tricloroacético
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

1 INTRODUCCIÓN

En México la ingesta de alcohol (Etanol, EtOH) constituye uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de enfermedades hepáticas ya que el 60% de la población adulta es consumidora de bebidas alcohólicas.

Las enfermedades hepáticas representan la quinta causa de mortalidad en México y al menos la mitad de estas muertes está relacionada con el consumo de etanol. Por ello, la cirrosis alcohólica, la principal complicación del alcoholismo, es uno de los problemas de salud pública más severos en el país (DGEISS, 2001; Campollo, 1997).

1.1 METABOLISMO DEL ETANOL.

Una vez que el EtOH es ingerido comienza su absorción inmediatamente por la mucosa del epitelio bucal y, como vapor, en los alvéolos pulmonares; sin embargo, la cantidad de EtOH absorbida por ambas rutas es insignificante, por ello puede considerarse que prácticamente todo el EtOH ingerido arriba al estómago. Una vez en este órgano se absorbe entre un 20 y 30% por el epitelio gástrico vía difusión simple.

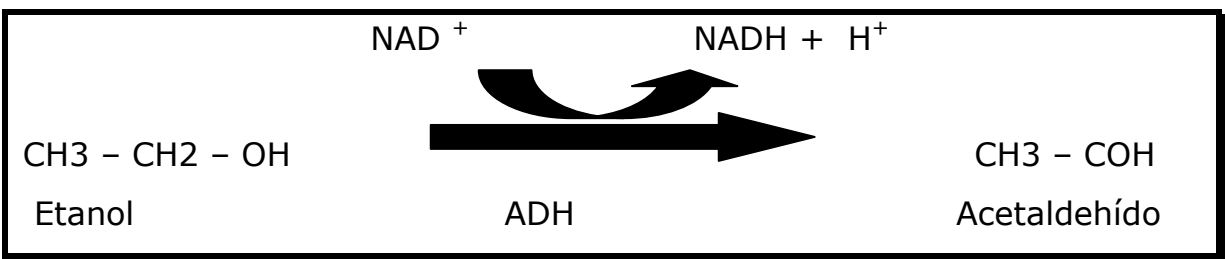
En el estómago inicia el metabolismo del EtOH por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) particular de este órgano y que se encuentra presente en la mucosa gástrica (Riveros-Rosas, 1997). Durante esta fase del metabolismo el EtOH es oxidado a acetaldehído y se sugiere que los bajos niveles de esta enzima gástrica en las mujeres es causa del incremento en la susceptibilidad de desarrollar una enfermedad hepática alcohólica (Arias, 1984).

El resto del EtOH es canalizado hacia el intestino delgado donde es absorbido principalmente en el duodeno y el yeyuno, de donde pasa a la vena porta y continúa al hígado para ser metabolizado (Riveros-Rosas, 1997).

El EtOH se metaboliza principalmente en los hepatocitos, tipo celular más abundante en el hígado. Existen tres sistemas enzimáticos en el hepatocito encargados del catabolismo del etanol: el sistema de la ADH, el sistema oxidativo microsomal (MEOS) y la catalasa.

El sistema de la ADH es la principal vía de la oxidación del etanol, y se localiza en el citoplasma celular. Este sistema oxida cerca del 90% del etanol ingerido. La ADH humana existe en por lo menos 20 isoformas diferentes codificadas por 7 genes independientes.

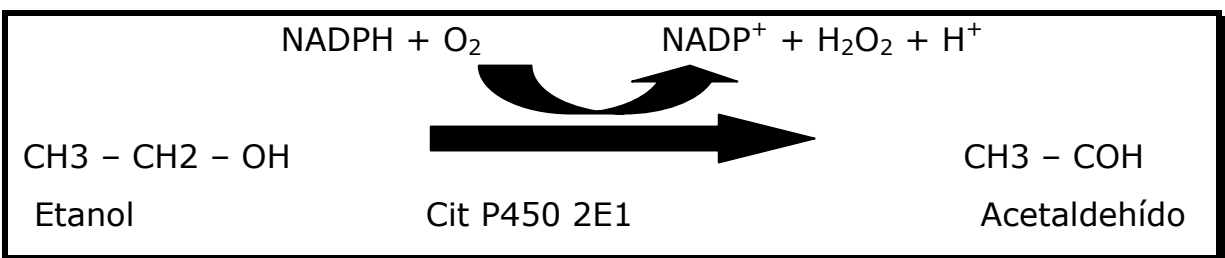
En este sistema el etanol es transformado en acetaldehído (Ach), por la ADH para lo cual necesita como aceptor de protones una molécula de nicotín-adenín dinucleótido oxidado (NAD^+) para dar lugar a Ach, NAD en su forma reducida (NADH) y un protón según se muestra en la siguiente reacción



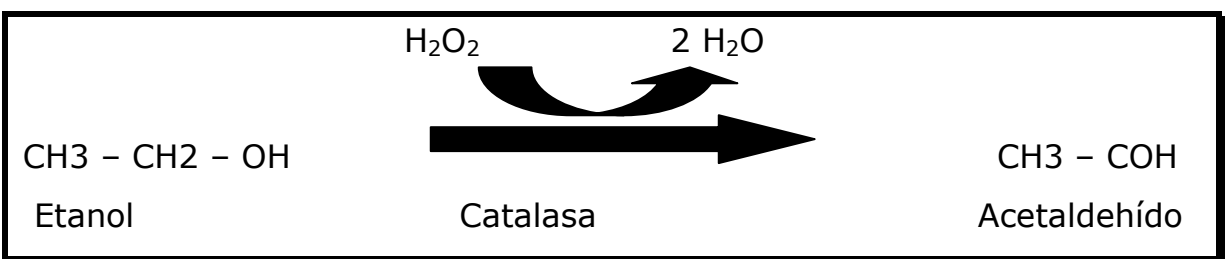
Si bien el sistema de la ADH es la vía principal de destoxificación del etanol, se ha visto que en la ingesta crónica de éste, la actividad de la enzima disminuye (Arias, 1984). Se ha propuesto que es el MEOS de los microsomas el encargado de la oxidación del etanol en la ingesta

crónica. El Citocromo específico para metabolizar el etanol es el P450 2E1, el cual es inducible por el etanol (Lieber, 1984; Nomura, 1983).

El sistema MEOS cataliza la oxidación del etanol en presencia de oxígeno y nicotín-adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) resultando Ach, NADP^+ y peróxido de hidrógeno (Riveros-Rosas, 1997).



La tercer ruta para la oxidación enzimática del etanol es la catalasa presente en los peroxisomas. En este sistema el etanol es oxidado utilizando peróxido de hidrógeno y se obtienen como productos Ach y agua.



Lieber reporta que la contribución de esta ruta en el metabolismo del EtOH ingerido es de menos del 2%, por lo que se considera que contribuye en forma mínima.

Finalmente, existen además otras rutas no enzimáticas para el metabolismo del etanol donde por medio del fierro y utilizando al peróxido de hidrógeno como agente oxidante el etanol es transformado

a Ach, pero la oxidación por estos sistemas contribuyen de forma insignificante al metabolismo del etanol.

1.2 TOXICIDAD DEL ETANOL.

La toxicidad del etanol puede deberse a varios factores, por un lado, la deficiencia en el metabolismo de lípidos, la inducción de citocinas, la generación de radicales libres (RL), la disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH) entre otros. La mayor parte de estos mecanismos de daño están mediados por su principal metabolito, el acetaldehído, el cual resulta ser más tóxico que el etanol mismo (Klots, 1998).

1.2.1 Toxicidad del acetaldehído

El acetaldehído es altamente reactivo, para su destoxificación el Ach es metabolizado principalmente por la acetaldehído deshidrogenasa localizada en el citosol la cual lo transforma en acetato (Yoshida, 1998).

El acetaldehído puede formar aductos con proteínas, glicoproteínas y fosfolípidos de membranas, principalmente con residuos de lisina por medio de una base de Schiff, aunque también se forman aductos con residuos de tirosina y cisteína. El resultado de este proceso es un desajuste en algunas funciones celulares, por ejemplo, la cadena respiratoria mantiene una actividad superior a la basal; esto conlleva a la formación de radicales libres. Por otro lado, los aductos formados con las proteínas actúan como neoantígenos y esto genera un daño indirecto ya que se promueve la activación del complemento. Ya que la formación de dichos complejos Ach-proteína se incrementan con el

consumo crónico de etanol este es uno de los mecanismos de generación del daño inducido por etanol (Hill, 1998).

Ha sido posible detectar Ach en sangre e hígado después del consumo de EtOH. Algunos estudios demuestran que el Ach se une covalentemente a la membrana de los hepatocitos, a proteínas citosólicas, al Cit. P450, a la tubulina, a la actina, a la albúmina, a la hemoglobina y a las ARNasas, lo que altera su estructura e impide el funcionamiento normal de estas proteínas (Niemelä, 1999).

Ahora bien, muchas enzimas se ven afectadas por el cambio en el estado redox de las células ya que existe un cociente NADH/NAD^+ superior y esto tiene un efecto sobre el metabolismo.

Por otro lado, el metabolismo vía MEOS del Ach incrementa el estrés oxidativo por que promueve la formación de peróxido de hidrógeno así como la lipoperoxidación (LPO); además, el Ach incrementa el estrés oxidativo ya que disminuye los niveles de GSH, ya que puede formar aductos con los aminoácidos precursores de este tripéptido.

1.3 ENFERMEDAD HEPATICA ALCOHOLICA.

Por lo que se ha mencionado anteriormente podemos afirmar que el etanol y sus metabolitos resultan ser altamente tóxicos para el hígado. La ingesta crónica del etanol conduce a un estado patológico denominado como Enfermedad Hepática Alcohólica (EHA).

En los últimos años han habido grandes avances en la comprensión del mecanismo de daño en la EHA. Se sabe que es un proceso muy complejo en el que intervienen prácticamente todos los tipos celulares

hepáticos incluyendo a los hepatocitos, células de Kupffer, células estelares, células endoteliales. Estas células despliegan una red de comunicación mediada por citocinas, factores de crecimiento, radicales libres (RL) y eicosanoides; estos mediadores de comunicación celular se encuentran presentes siempre en el tejido y cumplen con una función en el órgano sano, además, interactúan entre ellos creándose una intrincada red que permite mantener la homeostasis celular y tisular (figura 1).

Los cambios en la abundancia y función de los diferentes tipos celulares, así como el desbalance en la red de comunicación celular nos conduce a la patología crónica progresiva. El consumo crónico de alcohol es el factor iniciador de este desbalance y, aunque no se conoce con detalle el proceso por el que este ocurre, se han realizado estudios en los que se pone de manifiesto el papel crítico que juegan los diferentes mediadores de comunicación celular. Así pues, el entendimiento de estos cambios en la función celular requiere de una interpretación cuidadosa de la forma en que las señales intercelulares causan cambios lentos y acumulativos que conllevan a un estado patológico crónico y progresivo.

Los principales tipos celulares hepáticos están muy próximos entre sí en el órgano y tienen la capacidad de producir los diferentes mediadores químicos, los cuales pueden actuar de manera autocrina o paracrina induciendo a la auto perpetuación del proceso patológico. Dicho proceso incluye fenómenos como la inflamación, la necrosis, la apoptosis, la fibrosis, la isquemia y la alteración de la expresión génica.

Por todo ello resulta importante el conocimiento de las interacciones entre los diferentes mediadores de comunicación y su papel en las

distintas patologías hepáticas, ya que entre mejor conozcamos su participación tendremos mayor oportunidad de mejores tratamientos.

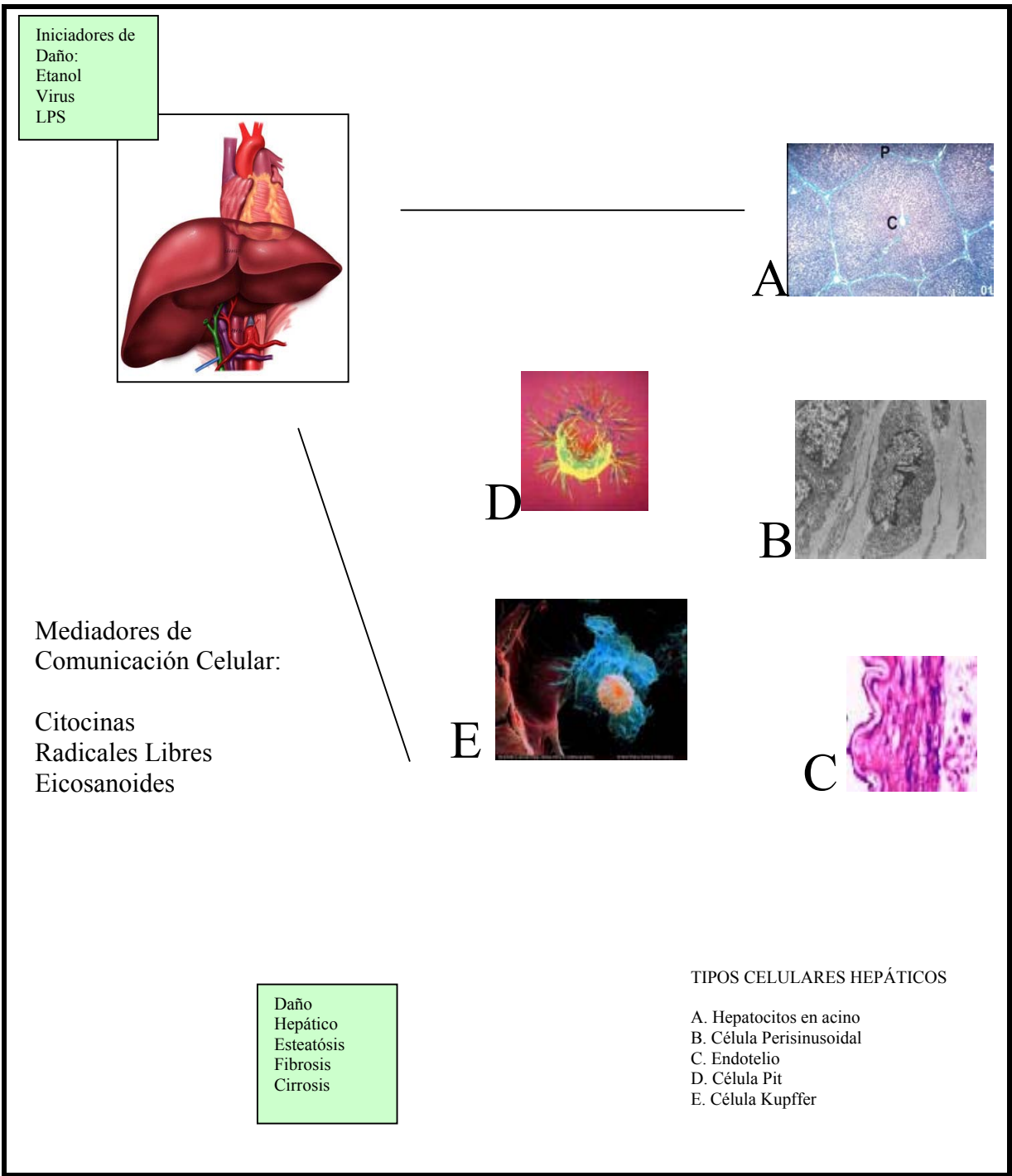


Figura 1. Intrerrelación celular y mediadores importantes durante la progresión del daño hepático.

1.4 ENDOTOXEMIA

1.4.1 Endotoxina

Gradualmente, se ha acumulado evidencia que demuestra que numerosos factores como el tipo de dieta, el sexo y las características genéticas pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EHA.

Entre estos factores asociados al consumo de alcohol se encuentra la endotoxemia (altos niveles de endotoxina); este aspecto ha cobrado gran importancia en la actualidad, ya que se ha comprobado que el abuso del alcohol favorece su desarrollo (Lands, 1995).

La endotoxina (Lipopolisacárido, LPS) es un componente de la pared externa de las bacterias Gram(-), se compone de una parte polisacárida altamente variable y otra, el lípido A, el cual representa la región antigénica del LPS (Raetz, 1990) (figura 2).

La translocación del LPS desde el lumen intestinal hasta la circulación es un paso importante para comprender la participación de esta molécula en el inicio y progreso del daño hepático (Nolan, 1989, Bode, 1992). A este respecto se han realizado estudios en los que se demuestra que el consumo de alcohol puede llevar al aumento de la concentración plasmática de LPS tanto en modelos animales como en pacientes con cirrosis alcohólica (Schäfer, 1997, Adachi, 1995, Mathurin, 2000). Por otro lado, la esterilización del lumen intestinal de ratas o bien, el empleo de anticuerpos anti TNF α en ratas a las que se administra alcohol reduce el daño observado por el consumo del etanol (Eguchi, 1991, McCuskey, 1995).

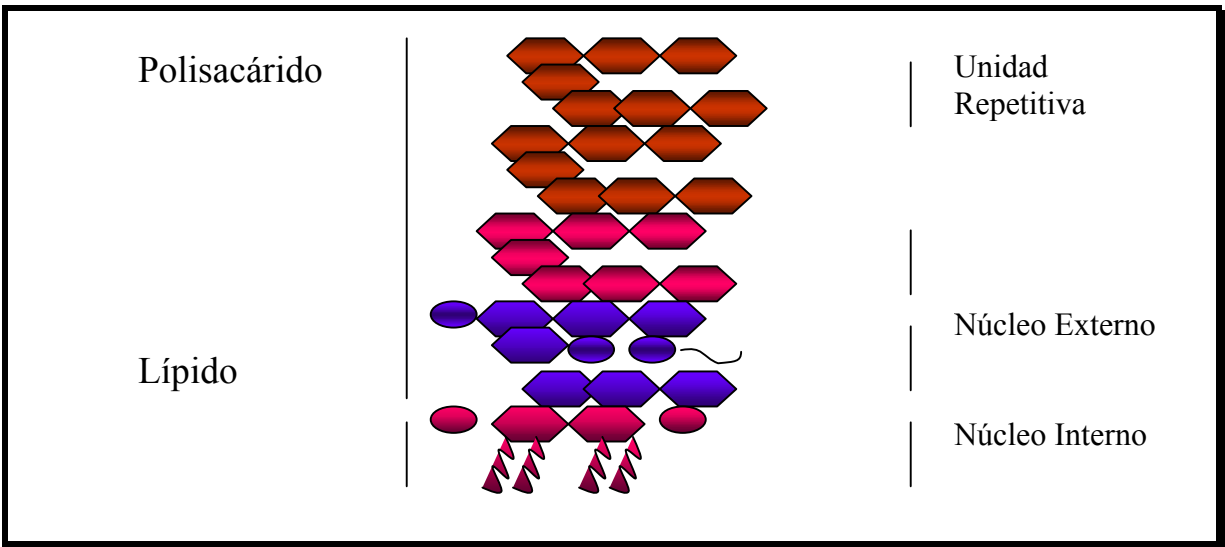


Figura 2. Estructura general de las endotoxinas.

Uno de los efectos centrales de la endotoxina, una vez que ha ingresado a la circulación, es la estimulación de monocitos y macrófagos así como la inducción de la liberación de citocinas proinflamatorias tales como el $\text{TNF}\alpha$ y la IL 6 (Harry, 1999, Mathurin, 2000). Así pues la endotoxemia como inductora del aumento en las concentraciones de citocinas proinflamatorias puede contribuir al inicio y agravamiento de la EHA.

Por otro lado, diversos autores reportan que el LPS es capaz de inducir la secreción de diferentes mediadores de daño en algunos tipos celulares del hígado como hepatocitos o células de Kupffer (Lands, 1995; Wang, 1995, Kaoru, 1997; Gutiérrez-Ruiz, 1999, Olivares, 1997); esto resulta de suma importancia ya que son estos mediadores los que promueven la auto perpetuación del daño.

1.5 Importancia clínica de la endotoxemia.

La importancia del LPS en el daño hepático inducido por ingesta de etanol se ha estudiado desde hace varios años y se han aportado

evidencias experimentales acerca de la presencia del LPS entre los que se pueden señalar las siguientes:

- ❑ Títulos elevados de IgA anti-lípido A en 35 de 41 pacientes con EHA (Nolan, 1986).
- ❑ Hepatitis necrosante en ratas sometidas a dietas con etanol y LPS (Bhagwandeem, 1997).
- ❑ Lesiones necrosantes focales inducidas por LPS (Shibayama, 1991).
- ❑ Disminución del daño hepático cuando se disminuye la endotoxemia (Adachi, 1995).

Se ha demostrado que un incremento en la permeabilidad de la mucosa intestinal al LPS inducida por el etanol es un factor que favorece la endotoxemia en modelo de alcohólicos, además la reducción de la capacidad de las células de Kupffer para detoxificar al LPS, así como el incremento de bacterias Gram (-) en la biota intestinal promueven el desarrollo de esta patología (Schenker, 1995)

Para su acción el LPS necesita al menos dos glicoproteínas, una proteína unidora de LPS (LBP) y un receptor al complejo LPS-LBP, conocida como CD14. Ambas proteínas son sintetizadas por los hepatocitos en condiciones normales (Schumann, 1990). Se ha demostrado que puede inducirse su producción en ratas que fueron alimentadas con etanol y grasas insaturadas, lo que provocó el daño hepático con respecto a los animales control. (Fukui, 1994; Su, 1998).

La proteína que une al LPS es una glicoproteína de 60kD que funge como acarreador del LPS. Esta proteína es sintetizada por los hepatocitos y en condiciones normales se encuentra en suero a una

concentración menor a los 0.5 g/ml (Schumann, 1990). El LBP se une con alta afinidad al lípido A, y el complejo LPS-LBP activa a la célula a través del receptor membranal CD14, este último es una glicoproteína de 55kd que está unida a membrana por un puente de fosfatidilinositol glicano (Wright, 1990).

No se conoce con exactitud como participa el LPS en la iniciación de la EHA, sin embargo, Schenker y col. (1995) especulan que el LPS activa a las células de Kupffer, las que responden secretando diferentes citocinas y, por otro lado, se incrementa el metabolismo del etanol lo que ocasiona una generación de Ach con los efectos tóxicos ya referidos.

1.6 MEDIADORES DE COMUNICACIÓN CELULAR

Los diferentes factores que inducen daño hepático actúan inicialmente sobre una o más células blanco para iniciar el daño a través de los diferentes mediadores de comunicación celular como pueden ser citocinas, quimiocinas, eicosanoides, especies reactivas de oxígeno (ROS) entre otros.

1.6.1 Especies Reactivas de Oxígeno.

Un radical libre se define como cualquier especie atómica o molecular con uno o más electrones desapareados, esto los hace sumamente reactivos y pueden propiciar reacciones en cadena. El desbalance entre la producción de RL y el sistema antioxidante existente en las células origina un exceso de oxidantes que puede tener serias repercusiones en el estado fisiológico celular.

Uno de los principales radicales libres presentes en las células es el radical superóxido ($O_2^{\bullet}$). Este radical se forma de manera natural en todas las células aeróbicas ya que si bien la mitocondria es sumamente eficiente, alrededor del 3% de las moléculas de O_2 no llegan a formar agua y forman superóxido.

El radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) también se puede generar en reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, y por los procesos de destoxificación del Cit.P450. Este radical puede formar peróxido de hidrógeno vía la enzima superóxido dismutasa (SOD) como mecanismo de defensa antioxidante. Posteriormente el rompimiento homolítico del enlace O-O del peróxido produce dos radicales hidroxilo ($\bullet OH$) con la participación de metales de transición como el hierro y el cobre por medio de reacciones como las de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 3). En estas reacciones se genera al radical a partir del H_2O_2 , interviniendo el Fe^{2+} como donador de electrones (Halliwell, 1984).

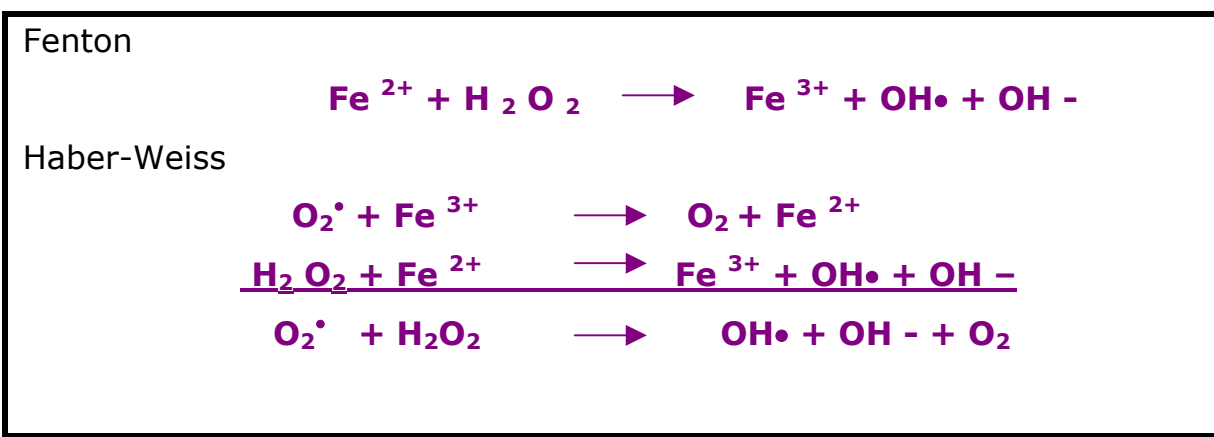


Fig 3. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

El radical hidroxilo es altamente reactivo e inestable. Reacciona con cualquier molécula que se encuentre cerca de él sin preferencias, la

principal defensa contra él es evitar su formación por la destoxificación del radical superóxido, del peróxido de hidrógeno y del Fe^{2+} .

Los RL 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. Los ácidos grasos de las membranas celulares son los principales blancos del $\bullet\text{OH}$. La LPO inicia cuando es sustraído un protón por un RL de un ácido graso insaturado generando un radical lipídico, el cual se reconfigura en un dieno conjugado, éste reacciona con el oxígeno para dar origen al radical peroxi, que puede sustraer otro protón de otro ácido graso formando un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical de ácido graso, el cual continúa la reacción en cadena. El peróxido lipídico, puede liberar otros compuestos como alcanos (etano, pentano) y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal), por medio de una ruptura catalizada por Fe^{2+} .

La cadena respiratoria mitocondrial no es el único sitio donde se producen RL de manera natural en el organismo. En el transporte de electrones en el retículo endoplásmico, por medio del sistema oxidativo microsomal, en donde la NADPH citocromo P 450 reductasa cataliza la transferencia de electrones al O_2 para formar $\text{O}_2^\bullet$ entre otros.

1.6.1.1 Sistemas Antioxidantes.

La célula para contrarrestar la presencia de RL posee un sistema de defensa el cual contiene componentes enzimáticos entre los que se encuentran la SOD, la glutatión peroxidasa (GSHPx) y la catalasa; por

otro lado, la célula cuenta con componentes no enzimáticos para evitar el efecto de los RL tales como el GSH y las vitaminas A, C y E.

La SOD es la primer enzima que actúa en la destoxificación de RL, ella se encarga de la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno. Esta enzima se localiza en la mitocondria, sitio principal de la generación de RL, y se denomina Mn SOD ya que requiere de manganeso como cofactor; también existe una CuZn SOD pero esta enzima se encuentra en el citosol.

La GSHPx 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 GSSG se regenera por medio de la glutatión reductasa (GSHRd) en presencia de NADPH.

Finalmente la catalasa, enzima confinada a los peroxisomas transforma también al peróxido de hidrógeno en agua por dismutación (figura 4).

El glutatión (GSH) es un tripéptido (glutamato-cisteína-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.

Para la síntesis del GSH se requiere realizar dos reacciones secuenciales dependientes de adenosin trifosfato (ATP), mismas que catalizan las enzimas glutamylcisteína sintetasa y la GSH sintetasa (Fernández-Checa, 1998a).

El GSH es el principal agente hepatoprotector ya que neutraliza RL por medio de su grupo sulfhidrilo, además de servir como sustrato para la destoxificación del H_2O_2 por la GSH peroxidasa.

Se sabe que en gran medida, el daño producido por los RL, 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 reduce durante la ingesta de etanol ya que el acetaldehído interactúa con aminoácidos precursores formando aductos.

1.6.1.2 Radicales Libres y expresión génica

Por otro lado, los radicales libre pueden influir en la expresión génica ya que algunos factores de transcripción como el factor nuclear κB (NF κB), así como AP1 son activados por estas entidades; esto resulta de particular importancia ya que se ha establecido que estos factores de transcripción están involucrados en la inducción de diversas citocinas y factores de crecimiento.

En la EHA, se ha descrito que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante como mediador de daño, ya que es capaz de estimular la producción de citocinas por hepatocitos probablemente por la activación de factores nucleares de transcripción, del tal modo que al ser estimulados, los hepatocitos secretan diversas citocinas y factores de crecimiento así como quimiocinas tales como la IL 8.

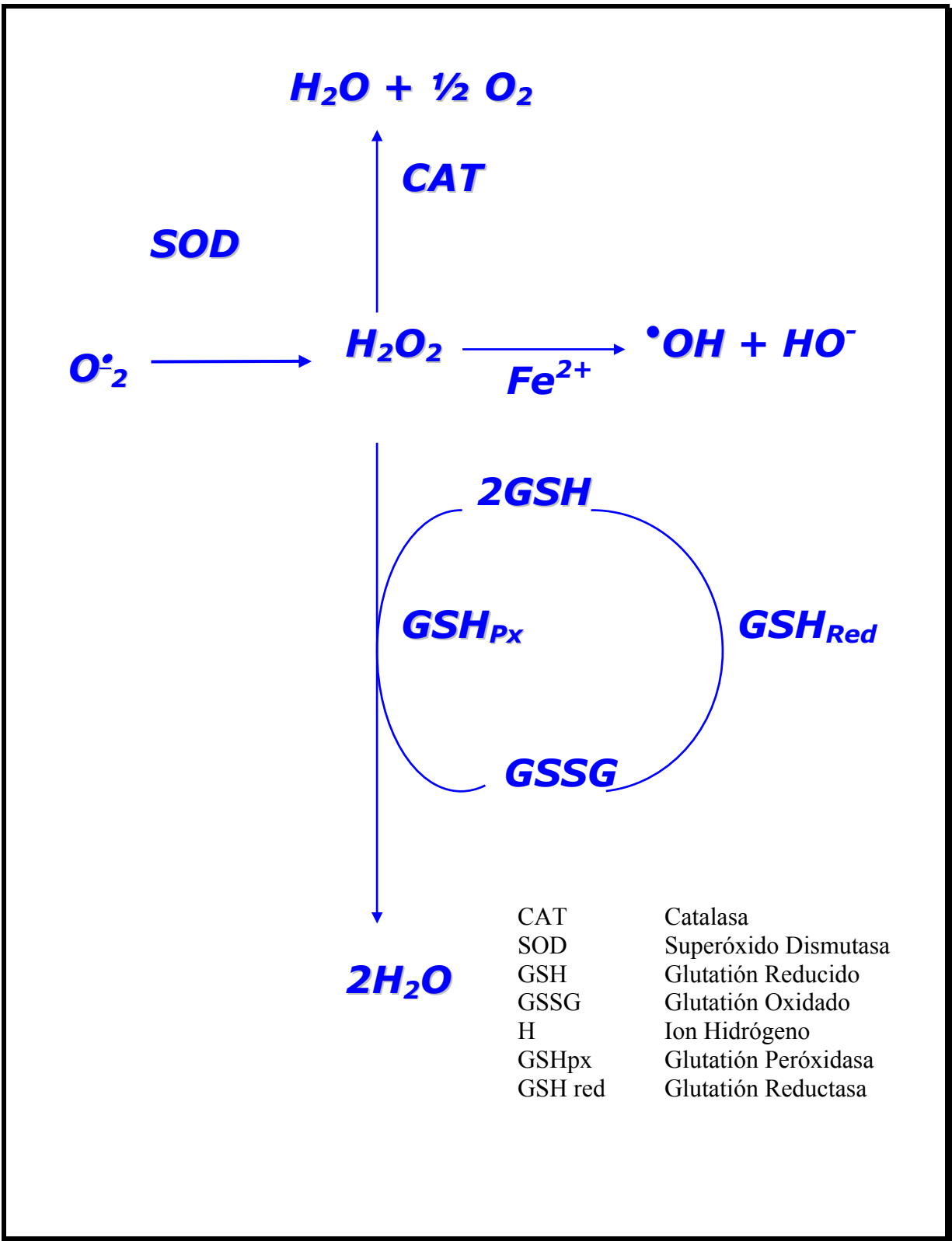


Fig. 4. Esquema de los sistemas de detoxificación de RL.

1.6.2 Citocinas.

Las citocinas son proteínas (péptidos o glicoproteínas) regulatorias, de aproximadamente 30Kd, que son secretadas normalmente por diversos tipos celulares en muy bajas cantidades. Históricamente el término interleucina (IL) fue propuesto para describir a las proteínas producidas por los linfocitos que actúan sobre otros linfocitos; sin embargo, en la actualidad se sabe que las fuentes celulares de estas proteínas no se restringe a las células del sistema inmune, sino que estos mediadores son producidos por una gran variedad de células (Simpson, 1997). Su rango de acción es corto, de tipo autocrino o paracrino. Las citocinas se unen a receptores específicos que se encuentran en la superficie celular y generalmente alteran la expresión de los genes de las células blanco, modificando así sus funciones y diferenciación.

Una de las clasificaciones mejor aceptadas es aquella que las agrupa según su función en: proinflamatorias, antiinflamatorias y quimiotácticas; sin embargo, debe considerarse que esta clasificación aun resulta muy arbitraria ya que en general los efectos de las citocinas son pleiotrópicos.

Las citocinas normalmente realizan sus diversas funciones de manera que mantienen la homeostasis celular y tisular. Las interacciones entre ellas juegan un papel fundamental en los eventos normales y patológicos de la respuesta inmunológica, reacciones inflamatorias, remodelación de tejidos, angiogénesis y transformaciones neoplásicas. Una desregulación o desbalance, ya sea en la producción o en la acción de las citocinas, puede manifestarse de una manera mucho mayor puesto que las citocinas forman intrincadas redes donde unas dependen de otras para su buen funcionamiento.

1.7 Interleucina 8.

La IL 8 es una quimiocina porque promueve la activación, la acumulación y la quimiotaxis de los neutrófilos al sitio donde es producida, generalmente una zona dañada (Lindley, 1998; Damme, 1994, Baggiolini, 1989).

La IL 8 es producida por varios tipos celulares bajo una estimulación apropiada como con el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), IL 1, IL 6 y LPS entre otros, mientras que su síntesis es inhibida por citocinas de carácter antiinflamatorio como IL 10 y con agentes antioxidantes (Sheron, 1992, Thornton, 1990).

La identificación de la IL 8 se realizó en 1987, como un factor soluble presente en el sobrenadante de monocitos tratados con LPS (Locati, 1999). Esta quimiocina pertenece al grupo clasificado como CXC, el cual agrupa a varias quimiocinas que presentan en su estructura un aminoácido cualquiera entre los dos primeros residuos de cisteína.

La IL 8 humana está codificada por un solo ARNm de aproximadamente 1.8 kb. El gene de IL 8 se localiza en el cromosoma 4 y consta de 4 exones y 3 intrones. La quimiocina madura se produce como una proteína de 99 aa; sin embargo, la forma activa varía en tamaño dependiendo del tipo celular del que proceda, por ejemplo, la forma activa de la IL 8 de hepatocitos es de 77 aa mientras que la forma activa de monocitos es de 72 (Lindley, 1998).

En lo que respecta a la estructura del gene, existen en la región promotora dos sitios de unión para dos factores nucleares que responden a estrés oxidativo, el $\text{NF}\kappa\text{B}$ y la proteína activadora 1 (AP1).

Se ha observado que la activación del NF κ B esta mediado selectivamente por peróxidos. Por otro lado, AP1 es activado principalmente por O₂[•] ya que se ha observado que la inducción de este factor nuclear es bloqueada por la adición de la SOD y no por la catalasa.

La IL 8 ejerce su actividad por medio de receptores glicosilados designados como IL 8RA e IL 8RB. IL 8 se une con alta afinidad a ambos receptores aunque solo el receptor tipo A es específico, ya que el receptor tipo B se une también otras quimiocinas (Locati, 1999).

Por el hecho de que IL 8 atrae neutrófilos a la zona de daño, resulta de suma importancia estudiar su relación con el estrés oxidativo, ya que se ha visto que IL 8 se secreta como una respuesta celular a este fenómeno. Por otro lado, los neutrófilos atraídos por ella incrementan a su vez el estado predominantemente oxidante.

Se ha propuesto que la IL 8 tiene una participación trascendental, ya que se han encontrado niveles altos de la interleucina en plasma de pacientes cirróticos (Li, 1996), así como en líquido ascítico en el mismo tipo de pacientes (Martínez-Brú, 1999).

Un estudio llevado a cabo por Sheron y cols. (1993), reveló que en personas sanas no se detectaban niveles circulantes de IL 8, mientras que en pacientes con hepatitis alcohólica se hallaron niveles del orden de 400-600 ng/ml, particularmente en aquellos que murieron, esto se correlacionó con indicadores bioquímicos de daño hepático severo (bilirrubina, creatinina, TNF α , entre otros).

Estudios *in vitro* han revelado que la IL 8 es secretada por hepatocitos tratados con metales (Dong, 1998 a) , LPS (Dong, 1998 b) y con EtOH (efecto que podría deberse a la presencia del Ach resultado del metabolismo del EtOH) (Shiratori, 1993); sin embargo, no se conoce aun el mecanismo por el cual estos tóxicos estimulan la secreción de la quimiocina. Se sabe que el $TNF\alpha$ esta involucrado en dicha secreción, así como de la posible participación del estrés oxidativo o de productos de la LPO (Jayatilleke, 1998).

Se ha propuesto que el $TNF\alpha$ juega un papel crítico en el desarrollo de la EHA, ya que niveles altos de esta citocina se han reportado en pacientes con hepatitis alcohólica aguda y con EHA crónica (Colell, 1998). Si bien esta citocina estimula la secreción de otros mediadores de daño, tal como la IL 8, por si sola ejerce daño citotóxico en hepatocitos de la línea celular HepG2 (Hill, 1995). Parte de este efecto se realiza a través de un mecanismo intracelular que aun se desconoce el cual bloquea el funcionamiento del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Este bloqueo permite el incremento del $O_2^{\bullet}$ producido por la auto oxidación del radical ubisemiquinona acumulado.

En el caso particular del hígado, las células de Kupffer pueden producir y liberar una gran cantidad de citocinas. Se ha reportado que secretan interleucina 1 (IL 1), y $TNF\alpha$ que tienen un papel proinflamatorio, así como interleucina 10 (IL 10) que es antiinflamatoria; también se ha evidenciado la presencia de interleucina 8 (IL 8) e interleucina 6 (IL 6).

1.8 Células de Kupffer.

Los efectos tóxicos del EtOH han sido ampliamente descritos; sin embargo, el mecanismo responsable de su hepatotoxicidad no ha sido

completamente caracterizado. En la actualidad es conocido que la ingesta crónica de EtOH estimula el consumo hepático de oxígeno, causa esteatosis, fibrosis y cirrosis entre otras patologías. Nueva evidencia ha emergido implicando a las células de Kupffer en varios aspectos de esta patofisiología (Thurman, 2000).

Después del consumo de EtOH ocurren alteraciones significativas en el mecanismo de defensa del individuo, estas incluyen cambios en la función reticuloendotelial así como un cambio en la funcionalidad de plaquetas, linfocitos, granulocitos e inmunidad (Adams, 1984; Tabakoff, 1988). La atención se ha enfocado también en el efecto del EtOH sobre las células de Kupffer (Decker, 1989). Estas células han sido estimuladas con LPS y se ha demostrado que están involucradas en la progresión del daño hepático mediado por etanol (Nolan, 1980).

Otras observaciones que sostienen la hipótesis de que las células de Kupffer están involucradas en el daño hepático inducido por alcohol son las siguientes: primero, Adachi (1995) ha demostrado que cuando se inactiva a estas células con cloruro de gadolinio ($GdCl_3$) en ratas a las que se administró EtOH por vía enteral, el valor de diversos parámetros de daño como enzimas plasmáticas, inflamación y necrosis disminuyen significativamente. Por otro lado, el etanol afecta a las células de Kupffer modificando diversas de sus funciones, entre ellas la producción de citocinas como el $TNF\ \alpha$ (Yamada, 1991).

En particular el $TNF\ \alpha$ se encuentra incrementado en sueros de pacientes alcohólicos lo cual es congruente con la idea de que las células de Kupffer se han activado (Stahnke, 1991).

Además se ha propuesto que las células de Kupffer son capaces de secretar mediadores que son tóxicos a las células hepáticas o bien, que sirven como quimioatrayentes para neutrófilos citotóxicos provocando de esta manera la progresión del daño. El $\text{TNF } \alpha$ y la IL 1 son directamente citotóxicos para varios tipos celulares. Algunos estudios en los que se administra EtOH a ratas que son inyectadas con anticuerpos anti- $\text{TNF}\alpha$ muestran un daño menor que aquellas ratas que no fueron tratadas con los anticuerpos (Iimuro, 1997). Más aún, tanto el $\text{TNF } \alpha$ y la IL 1 estimulan la migración de neutrófilos así como su activación; además, también inducen la liberación de proteasas y RL aumentando con ello el daño en el tejido.(Thiele, 1989).

Muchos de los estudios realizados a la fecha tienen como objetivo el evaluar la inducción y secreción de las citocinas proinflamatorias por diversos agentes actuando de manera independiente. Por otro lado, en numerosos estudios se ha demostrado no solo la presencia de endotoxinas, sino su participación activa en los procesos inflamatorios que se producen en el tejido hepático en pacientes con cirrosis. Por todo ello resulta importante que se realicen nuevas investigaciones que permitan conocer como las endotoxinas de manera conjunta con el etanol y sus metabolitos están alterando los patrones de síntesis y secreción de citocinas así como su relación con el daño generado por estrés oxidativo.

1.9 Modelo Celular.

La evaluación directa de los efectos que produce un agente químico son difíciles de evaluar en un modelo animal, esto es debido a que la presencia del sistema homeostático no nos permiten una evaluación directa. Es por ello que la evaluación de los efectos del etanol se

facilita en sistemas de cultivo celular de hepatocitos *in vitro*. Entre ellos las líneas celulares han ofrecido grandes ventajas como modelo alternativo para evaluar algunos mecanismos de toxicidad (Dierick, 1989). 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, 1992).

Entre las líneas de origen hepático se encuentran las células HepG2. Esta línea fue obtenida de un hepatoblastoma humano, establecida por Aden en 1979. y exhibe muchas de las características de un hepatocito normal. Así, sus características morfológicas y formas celulares epiteliales son compatibles con las células de parénquima hepático. Además presenta la síntesis de diversas proteínas hepáticas, como la albúmina, la transferrina, lipoproteínas, fibrinógeno y algunos factores de coagulación (Kelly, 1989).

Las líneas celulares humanas derivadas de hepatoblastomas han sido propuestas como alternativa para los modelos celulares de cultivo primario de hepatocitos *in vitro* en el estudio de metabolismo de xenobióticos. Las ventajas potenciales de las líneas celulares hepáticas son: se obtienen poblaciones celulares en grandes cantidades, su mantenimiento es sencillo, pueden ser crioconservadas exitosamente. Respecto al metabolismo de ciertos fármacos, la actividad de las enzimas no disminuye durante el cultivo, como pasa con cultivos primarios de hepatocitos humanos (Duthie, 1994).

Las células HepG2 han sido extensamente utilizadas para estudiar funciones hepáticas que incluyen la síntesis de lípidos (Wang, 1988), el metabolismo del grupo hemo (Visser, 1991; Krijf, 1993). Así como el

estudio de metabolismo de agentes xenobióticos (Sormenan, 1993, Roe, 1993).

Por estas razones se considera a la línea celular HepG2 como un modelo adecuado para el estudio de la toxicología hepática.

2 HIPÓTESIS

Los hepatocitos como resultado de una agresión pueden sintetizar citocinas que tienen un papel activo en la inflamación hepática. Las citocinas pueden inducirse en presencia de daño por estrés oxidativo. Existen numerosos reportes sobre la presencia de endotoxemia en individuos con daño hepático, así como su participación en la inducción de diversas citocinas proinflamatorias, como el $\text{TNF}\alpha$ y la IL 8, en la EHA. Por ello esperamos que el pretratamiento con LPS actúe como un promotor de la respuesta inflamatoria inducida por el acetaldehído y el propio LPS en términos de una mayor de una mayor secreción de la IL 8. Esperamos demostrar que el efecto del pretratamiento con LPS sobre la producción de IL 8 está mediado por el $\text{TNF}\alpha$. Esperamos además, que los hepatocitos sujetos al pretratamiento con LPS presenten una mayor susceptibilidad al daño por el estrés oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto producido por el pretratamiento con LPS sobre la secreción de IL 8 inducida por Ach y LPS y su relación con el estrés oxidativo en células HepG2.

3.2 Objetivos Particulares.

- Determinar la inducción y secreción de IL 8 como respuesta al daño inducido por acetaldehído y LPS en células HepG2 pretratadas con endotoxinas de *Salmonella typhimurium*.
- Determinar la participación que el TNF α tiene en el efecto del pretratamiento con endotoxina sobre la inducción y secreción de IL 8 en células HepG2 tratadas con acetaldehído y endotoxina.
- Evaluar la generación de estrés oxidativo por medio de la disminución de los niveles de glutatión citosólico y mitocondrial en presencia de acetaldehído y endotoxina en células HepG2 pretratadas con endotoxina.

4 MATERIAL Y METODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

Las células HepG2 (línea celular de un hepatoblastoma humano), se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC No. HB 8065; Maryland, USA) en el pasaje número 81, se cultivaron en medio William's (Gibco BRL), el cual se suplementó con 10 % suero fetal bovino (Hy-Clone), 100 U/ml de ampicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Microlab). En adelante el medio así preparado se le llamará medio completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Costar). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución 1:2 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25%, (Sigma) previo lavado con PBS-EDTA 1%. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5 % CO₂ y 90% de humedad con una temperatura de 37 °C.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se sembraron 10⁷ células en cajas de cultivo de 75 cm² (Costar) con medio completo. Se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Posteriormente se cambió el medio por uno que contenía LPS de *Salmonella typhimurium* 1µg/ml en medio William's sin suero, a este tratamiento se le denominará pretratamiento con LPS (PT) y tuvo una duración de 24 h. Posteriormente se adicionaron a este mismo medio los otros tóxicos como se señalan a continuación: los tratamientos que se aplicaron fueron Ach 175 µM (Backer) y LPS de *Salmonella typhimurium* 1 µg/ml (Sigma), todos adicionados al medio William's sin suero del pretratamiento con LPS. Los tratamientos fueron 24 h para

los estudios de secreción o contenido de glutatión y de 1 h para los estudios de expresión del RNAm. Las botellas de cultivo con los tratamientos de Ach fueron selladas con parafilm para evitar la evaporización del tóxico.

Terminado el tiempo del tratamiento los medios fueron recolectados, centrifugados a 4,000 rpm y el sobrenadante fue congelado a -70C para la determinación de citocinas o bien, las células se rasparon con un gendarme de goma y se emplearon en las diferentes pruebas bioquímicas y para el aislamiento del ARN total.

Para la neutralización del TNF α secretado se usó un anticuerpo policlonal anti-TNF α humano (R&D systems) a una concentración final de 500 U/ml, el anticuerpo se agregó en medio sin suero 20 min previos al pretratamiento con LPS.

Para los estudios con TNF α se empleó una proteína recombinante humana (R/D Systems) que se adicionó al medio William's sin suero a una concentración de 5 ng/ml.

Todos los tratamientos se aplicaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico. Se emplearon cultivos de células HepG2 entre los pasajes 90-120.

4.3 CONTENIDO DE GLUTATION

Para la determinación del GSH total se empleó el método de Tietze (1969) con el reactivo de Ellman. El método se basa en la reducción del 5,5'-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB) en presencia de grupos tioles (-SH).

Se sembraron 3×10^6 células en botellas de cultivo de 25 cm^2 con medio completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, posteriormente se adicionaron los diferentes tratamientos, al término de la incubación con los tóxicos, se retiraron los medios y se lavaron las células con PBS para levantar las células con un gendarme de goma y se resuspendieron con 0.6 ml de PBS. A 0.5 ml de muestra se le agregó 1 ml de buffer de Tris 0.2 M -EDTA 0.02 M suplementado con SDS al 1% pH 8.2, agitando durante 15 min. Posteriormente, se agregó 1 ml ácido tricloro acético (TCA) al 5% y se agitó durante 5 min. Se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 4°C . Del sobrenadante se tomaron 0.2 ml para la determinación, a lo cual se agregaron 2.5 ml de PBS 0.05 M a pH 7.1, 800 μl de EDTA 1mM, 30 μl de DTNB. La mezcla se agitó y la absorbancia se leyó a 412 nm. La cuantificación de GSH se realizó en base a una curva estándar. Los resultados se reportan en nmol de SH / 10^6 células.

4.4 AISLAMIENTO DE ARN

El aislamiento de ARN total se llevó al cabo empleando la técnica de Chomczynski (1993) con el reactivo Trizol. Se sembraron 3×10^6 células 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 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 y se les agregó 0.5 ml de cloroformo, se agitó el tubo por 15 s y se centrifugó 10 min a 12,000 rpm a 4°C . La fase acuosa (superior) fue recuperada y se agregaron 500 μl de isopropanol, se dejó reposar por 12 min y se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. Se decantó y el precipitado, se lavó con EtOH al 70% y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm. 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 RNA por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. Usando la siguiente relación:

$$\text{Concentración de RNA} = (\text{D.O. 260}) (40) (\text{factor de dilución})$$

4.5 TRANSCRIPCION REVERSA - REACCION 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/ml de ARN total de cada tratamiento y se le agregaron 2 µl de MgCl₂ 25mM; 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 buffer para PCR 10X que contiene: 10 mM de KCl; 200 mM Tris-HCl; pH 8.8, 100 mM de (NH₄)₂ SO₄; 10% Triton X y 100 µg/ml de albumina sérica bovina. La mezcla se llevó a reacción en un termociclador (Perkin Elmer 480) y se sometió a 37 °C por 60 min seguido 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 de ADN complementario (ADNc) que se obtuvieron en la reacción de RT, se le agregaron 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 4 µl de Buffer PCR 10X ; 31.75 µl de agua estéril; 0.25 µl de DNA polimerasa (AmpliTaqDNA polimerase, Perkin Elmer) a una concentración de 5 U/l y 2.5 µl de los oligonucleótidos siguientes: para IL 8, sentido 5'-TTG GCA GCC TTC CTG ATT-3', antisentido 5'- AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG-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 la β 2-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 μ M 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, se calentaron para disolver perfectamente la agarosa, se dejó enfriar y se agregaron 4.5 μ l de una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 μ g/l. Se puso 5 μ l de ADNc con 2 μ l de buffer de carga (LB) en los pozos del gel y se corrió en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) a 100 Volts por 30 min.

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

4.6 SECRECION DE INTERLEUCINA-8

La determinación de IL 8 se realizó por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) comerciales (Quantikine, R&D systems) siguiendo el protocolo del fabricante.

4.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó al menos en tres experimentos independientes por triplicado. 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 de $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS.

5.1 Secreción de IL 8.

Con el fin de investigar el efecto del pretratamiento con LPS en la secreción de IL 8 mediada por el mismo LPS y por acetaldehído administrados independiente o conjuntamente se llevaron a cabo una serie de experimentos en los cuales se expusieron las células HepG2 durante 24 h al LPS y posteriormente se adicionó al medio acetaldehído y/o LPS. Estos resultados se muestran en la gráfica 1, donde se observan los valores de la secreción de IL 8 al medio de cultivo en los diferentes tratamientos. Como se puede observar en esta figura, en las células control la secreción basal de IL 8 es de $188 (\pm 15) \text{ pg}/10^6$ células.

Por otro lado, en las células que fueron sometidas al pretratamiento con LPS puede observarse que existe un aumento en la secreción de la IL 8 en los tres tratamientos empleados LPS, acetaldehído o ambos de manera que el incremento fue de 250%, 244% y 255% respectivamente y todos estos aumentos presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin pretratamiento. Estos incrementos son, así mismo, significativamente mayores con respecto al valor observado en el tratamiento en el cual se colocó únicamente el pretratamiento con LPS ($253 \pm 7 \text{ pg}/10^6$ células); así pues, el pretratamiento con LPS induce un incremento en la secreción de la IL 8 en células expuestas a los tóxicos, sin embargo, es importante señalar que no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos estudiados.

Existe evidencia de que el $\text{TNF}\alpha$ es el responsable de algunos de los efectos que el pretratamiento con LPS produce en hepatocitos en cultivo primario. Por otro lado, se sabe que el $\text{TNF}\alpha$ es un factor que puede incrementar la secreción de IL 8; por ello, se decidió investigar si esta citocina esta involucrada en el incremento observado en la

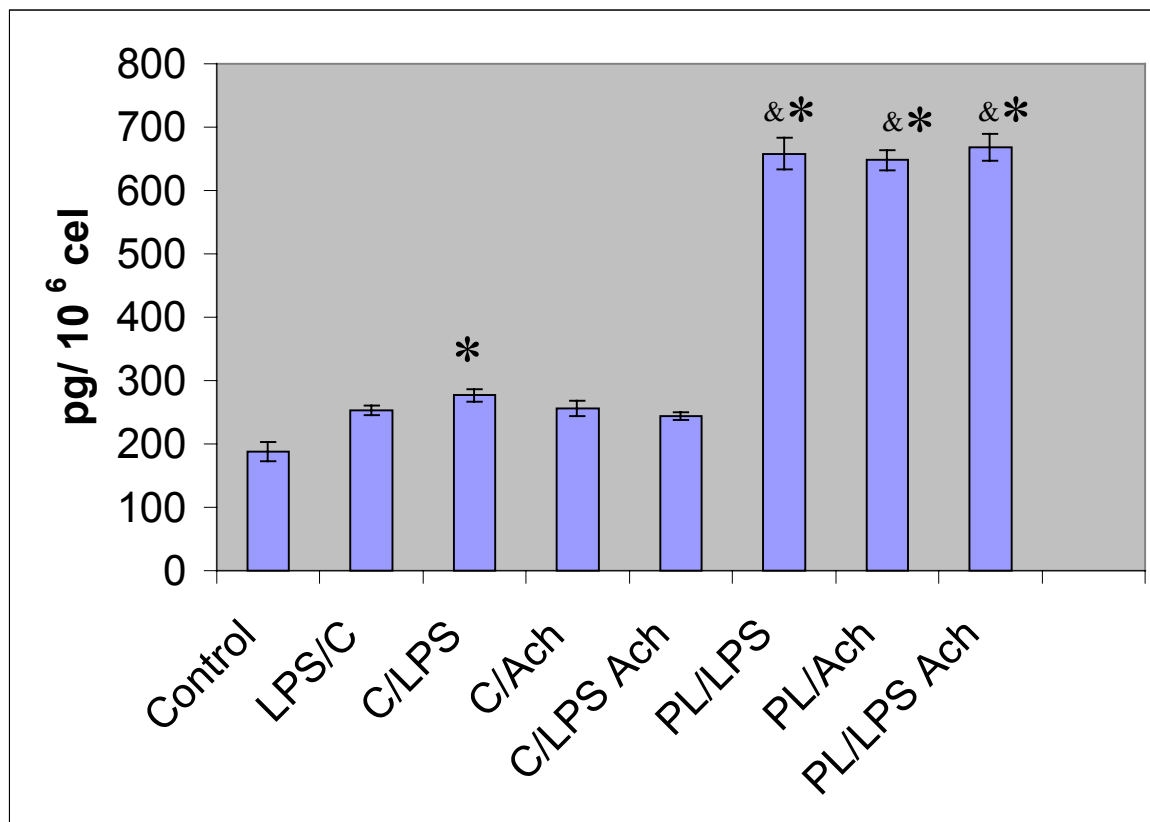


Figura 1. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 pretratadas (PL) con LPS (1ug/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control *, diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que no fueron pretratadas con LPS &. Se señala en los tratamientos si fueron sometidos o no al pretratamiento (PL) y el tóxico al que se expusieron posteriormente. Asimismo se presenta un control del pretratamiento sin exposición a ningún tóxico posteriormente (LPS/C).

secreción de IL 8 inducida por el pretratamiento con LPS en las células HepG2. Por otro lado, estos experimentos nos permitirán investigar si el mecanismo de acción por el cual los tres tratamientos empleados incrementan la secreción de la IL8 es el mismo. Por ello se procedió a realizar una serie de experimentos en los cuales se colocó un anticuerpo policlonal anti TNF α (500U/ml) 20 min antes de adicionar el LPS del pretratamiento.

En la figura 2 puede observarse que cuando se emplea un anticuerpo policlonal anti TNF α antes del pretratamiento con LPS los valores de la secreción de IL 8 en las células que se expusieron a acetaldehído o LPS disminuyen hasta el nivel basal, ya que si el valor del control es de 188 ($\pm$ 15) pg/10⁶ células para los casos de acetaldehído es de 204 ($\pm$ 3.5) pg/10⁶ células y para el LPS es de 190($\pm$ 7) pg/10⁶ células.

Por otro lado, cuando las células después del pretratamiento con LPS se exponen a acetaldehído junto con LPS el anticuerpo tiene como efecto una disminución de la secreción pero el valor observado es aun 81% mayor que el control y esta diferencia es significativamente diferente tanto al control como al valor observado en el caso en el que no se emplea el anticuerpo anti TNF α .

Ahora bien, del experimento anterior se puede decir que el TNF α es necesario para que se de el aumento en la secreción de la IL 8 cuando la segunda exposición a las que se somete a las células es o bien a acetaldehído o bien a LPS aplicados independientemente, y que en el caso de que se apliquen de manera simultanea después del pretratamiento es un factor involucrado aunque no necesario para que

se de el incremento de la secreción. A continuación se realizaron una serie de experimentos en los cuales se substituyó al pretratamiento con

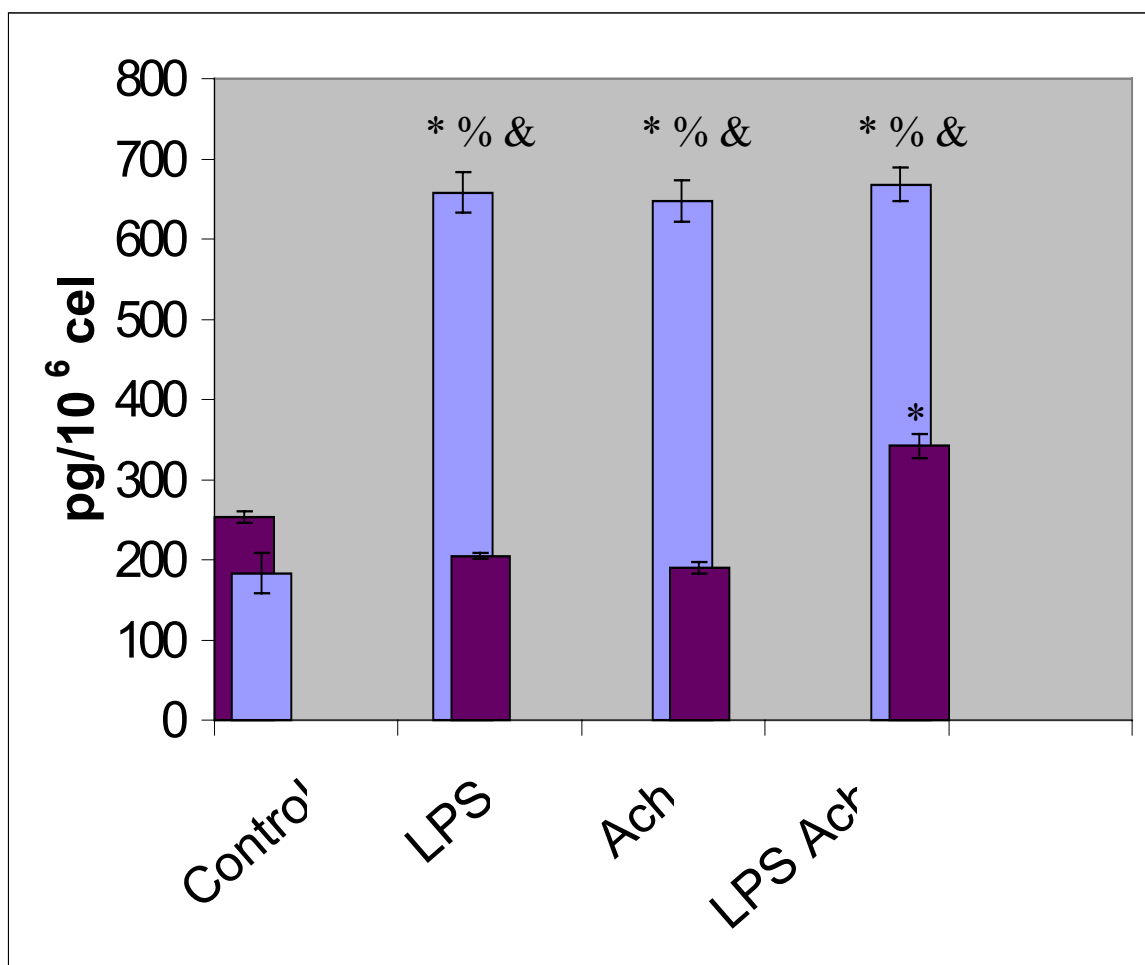


Figura 2. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 pretratadas con LPS (1ug/ml) durante 24 h y tratadas con LPS y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Se muestran los valores obtenidos con y sin anticuerpo anti TNF α colocado directamente al medio de cultivo 20 minutos antes del pretratamiento con LPS. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control *. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control con anticuerpo anti TNF α %. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que fueron tratadas con el tóxico en presencia de anticuerpo anti TNF α %.

Pretratamientos con LPS ■

Pretratamientos con LPS + anticuepos ■

LPS por un pretratamiento con TNF α recombinante humano, con ello se deseaba investigar si el TNF α era el único factor involucrado en el aumento de la secreción de la IL 8 o bien, si es un factor necesario pero no suficiente por si mismo.

En la figura 3 puede observarse que el pretratamiento con TNF α recombinante induce un incremento en la secreción de IL 8. Los valores observados son 106, 248 y 100% mayores con respecto al control para las células expuestas a LPS, acetaldehído o ambos respectivamente. Es importante notar que estos incrementos son significativamente mayores que el control ($p \leq 0.05$). Por otro lado, en el mismo gráfico podemos observar que estos incrementos en la secreción de la IL 8 no corresponden a los valores que se encontraron cuando el pretratamiento se realizó con LPS; de hecho, los valores entre los experimentos en los que se empleó LPS o TNF α en el pretratamiento son así mismo significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, debemos señalar en este punto que a diferencia de los pretratamientos con LPS en los cuales no existían diferencias significativas entre los valores obtenidos cuando se empleó LPS, acetaldehído o ambos en el caso en que el pretratamiento se realizó empleando TNF α , si se observa una diferencia significativa en el caso en que la segunda exposición es al acetaldehído, se entiende que esta diferencia es con respecto a los casos en que la segunda exposición es a LPS o LPS junto con acetaldehído.

Ahora bien, ya que los pretratamientos con LPS no mostraron un efecto diferencial en lo que respecta a la exposición aislada o conjunta de acetaldehído y LPS, se realizaron una serie de experimentos en los que se expuso a las células a diferentes concentraciones de estos

tóxicos a fin de poder analizar si existía un efecto dosis respuesta a la vez que se podría observar si las concentraciones empleadas de los tóxicos estarían involucradas en la ausencia de un efecto diferencial. En la tabla 1 puede observarse que solo se observan diferencias

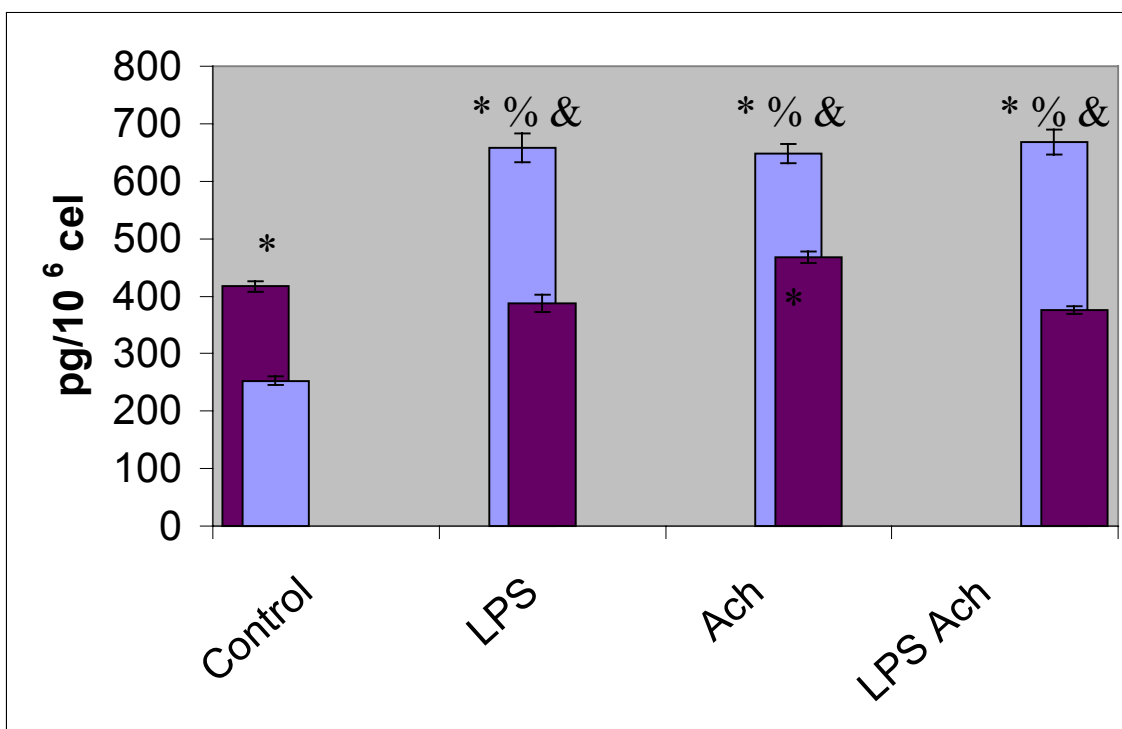


Figura 3. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 pretratadas (PT) con (5ng/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1μg/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control *. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que fueron sometidas únicamente al pretratamiento con TNFα %. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que fueron tratadas con el tóxico después del pretratamiento con TNFα &.

Pretratamientos con LPS ■

Pretratamientos con TNFα ■

significativas en dos casos, cuando se aplica acetaldehído 100 μM / LPS 25 μg/ml y cuando se aplicó acetaldehído 300 μM / LPS 1 μg/ml. Cabe señalar que las concentraciones de 300 μM de acetaldehído y 25 μg/ml

de LPS son concentraciones sumamente grandes respecto a las concentraciones que pueden considerarse fisiológicas y que fueron elegidas con la finalidad de someter al sistema a condiciones extremas. El hecho de que las únicas condiciones en las que se presenta una diferencia significativa con respecto al control sea con las concentraciones extremas indica que en las células HepG2 la secreción de IL 8 no esta medida por la presencia conjunta de estos tóxicos, es decir, que otros factores presentes en el medio tisular podrían estar regulando la secreción de esta citocina.

ACH / LPS	0	100	175	300
0	205±6	238±41	208±15	206±25
1	330±40	207±42	223±10	303±25
10	253±22	222±19	273±40	288±40
25	257±31	326±26	280±40	266±18

Tabla 1. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 expuestas durante 24 h con LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM). Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. En azul se muestran los valores que presentan una diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. En la columna de extrema izquierda se presentan las concentraciones de LPS y en el renglón superior se presentan las concentraciones de acetaldehído.

Dado que los células empleadas en este trabajo no responden de manera diferencial a los tratamientos empleados y ya que el hepatocito en el hígado dañado está expuesto a los factores secretados por otros tipos celulares, entre ellos las células Kupffer que secretan grandes cantidades de $\text{TNF}\alpha$, se decidió estudiar el efecto que esta citocina tiene sobre la secreción de la IL 8 cuando es empleada simultáneamente con el LPS, el acetaldehído o ambos.

En la figura 4, se muestran los valores observados para la secreción de la IL 8 en células HepG2 que fueron sometidas a la presencia de TNF α , acetaldehído y LPS durante 24 h. Puede observarse

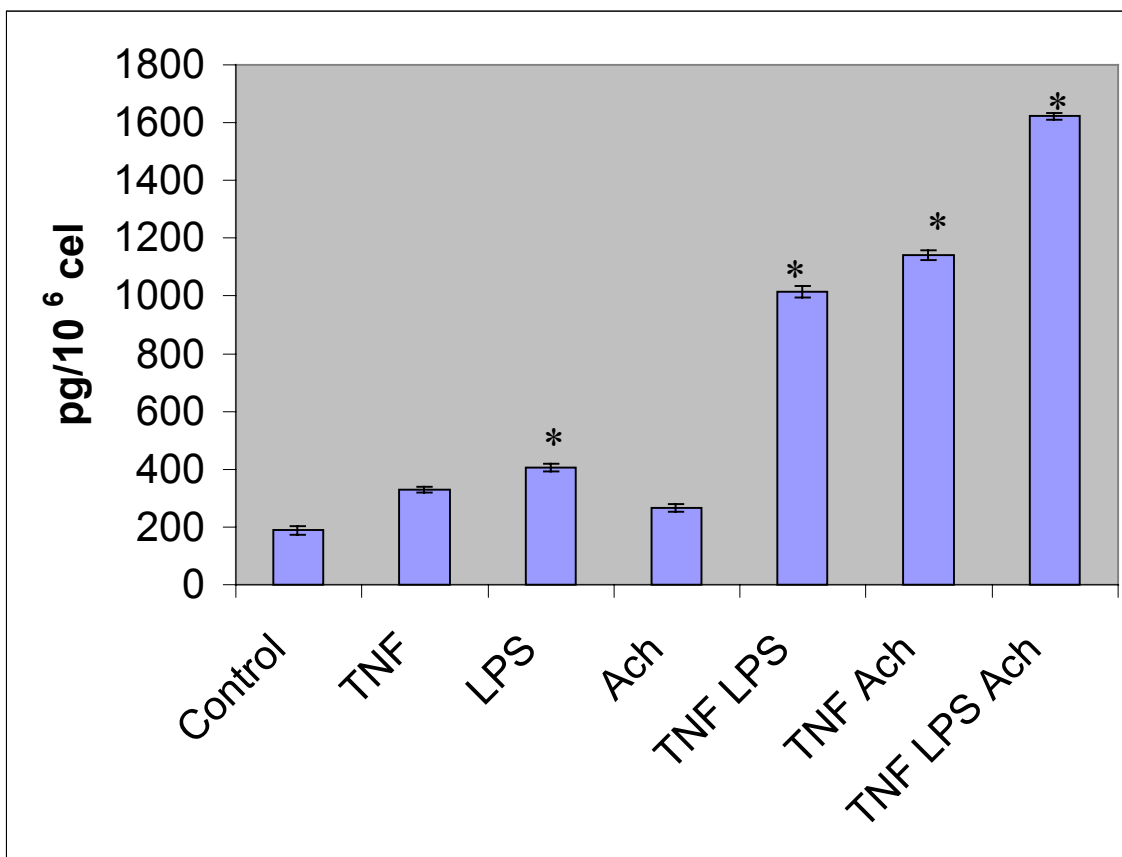


Figura 4. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 con TNF α (5ng/ml), LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control *.

que el TNF α tiene un efecto inductor por si mismo ya que la secreción aumentó hasta 330 pg / 10⁶ células (± 10). En el caso en que se aplica TNF α junto con LPS, acetaldehído o ambos, la secreción de la IL 8 aumenta 440 %, 506% y 762% respectivamente. De este hecho se obtiene que el TNF α tiene un efecto sinérgico en la secreción de IL 8 cuando se administra de manera conjunta con el acetaldehído y el LPS. Es de notarse que en este caso el aumento en la secreción si muestra un

efecto diferencial con respecto a los varios tratamientos empleados hecho que no se observó cuando se empleó un pretratamiento con LPS y que no resultaba tan notable en el caso del pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ recombinante.

En la figura 5 se muestran los resultados de la aplicación del $\text{TNF}\alpha$ de manera simultanea a los tóxicos en comparación con el caso en que el $\text{TNF}\alpha$ se aplica como pretratamiento. Puede observarse que el comportamiento es radicalmente diferente en ambos casos ya que el aumento en la secreción de la IL 8 cuando el $\text{TNF}\alpha$ se aplica simultáneamente a los tóxicos es significativamente mayor con respecto al tratamiento correspondiente cuando el $\text{TNF}\alpha$ se administró como pretratamiento. Esto muestra que el $\text{TNF}\alpha$ conjuntamente con la activación de otros factores inducidos por el LPS muestran un efecto sinérgico en la secreción de IL 8 aquí potenciado por el $\text{TNF}\alpha$ exógeno (no sintetizado por los propios hepatocitos).

5.2 Expresión de IL 8.

La secreción de IL8 muestra variaciones en respuesta a la presencia del LPS, el acetaldehído y el $\text{TNF}\alpha$; sin embargo, las vías de señalización así como los diferentes procesos de regulación por medio de los cuales estas variaciones ocurren no han sido descritos, con el fin de iniciar los estudios a este respecto se estudió la expresión de la IL 8 bajo los diferentes marcos de administración de las sustancias señaladas.

En lo que respecta al efecto del pretratamiento con LPS sobre la expresión de la IL 8 en células HepG2 expuestas a LPS y acetaldehído administrados independiente o conjuntamente, se llevaron a cabo

experimentos en los cuales se expuso las células a LPS durante 24 h pasadas las cuales se adicionaron al medio de cultivo acetaldehído, LPS o ambos durante 1 h, después de este periodo se realizó la metodología para el análisis de la expresión de la IL 8.

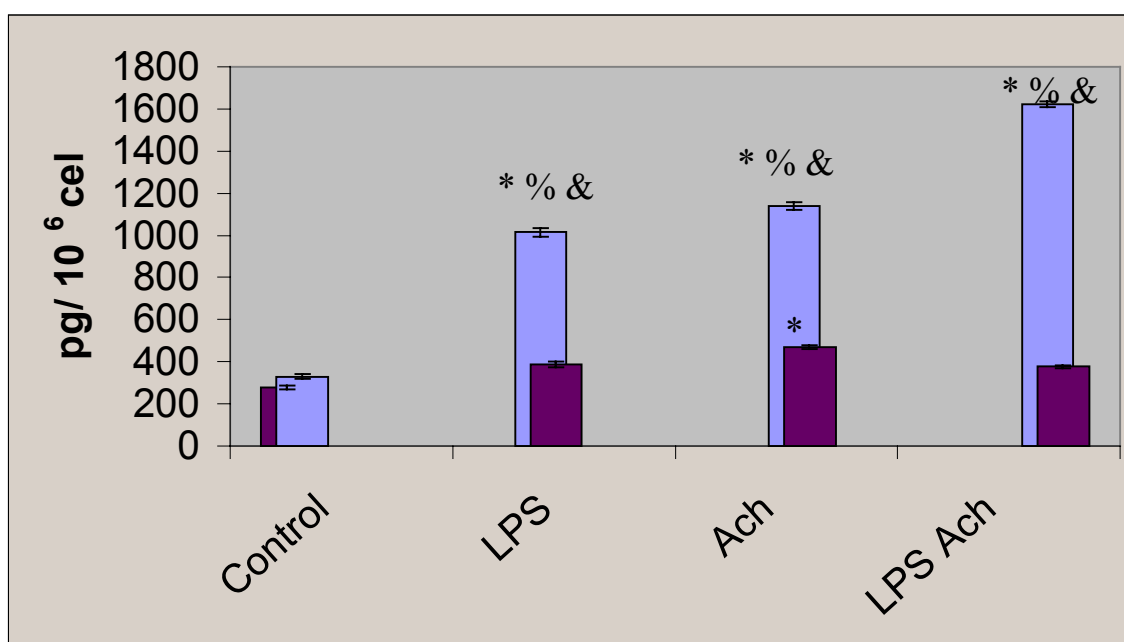


Figura 5. Secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 tratadas con TNF α (5ng/ml), LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 24 h. Se muestra también el caso en que el TNF α se administra como pretratamiento 24 h antes de aplicar el LPS (1ug/ml) y el acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control *, diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que fueron sometidas únicamente a la presencia de TNF α %, diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a las células que fueron pretratadas con TNF α &.

Cotratamiento con TNF α ■

Pretratamiento TNF α ■

Los resultados se muestran en la figura 6, en esta se observa que en las células a las que no se sometió al pretratamiento con LPS existe una diferencia significativa en la expresión de la IL 8 en aquellas células que fueron expuestas a LPS y acetaldehído de manera simultánea,

aunque debe señalarse que la diferencia es de tan solo 30% más que el control. Por otro lado, aunque no de manera significativa exposición al LPS muestra una tendencia a disminuir la expresión de esta citocina ya que solo se encontró una expresión correspondiente a un 15% menos que el control.

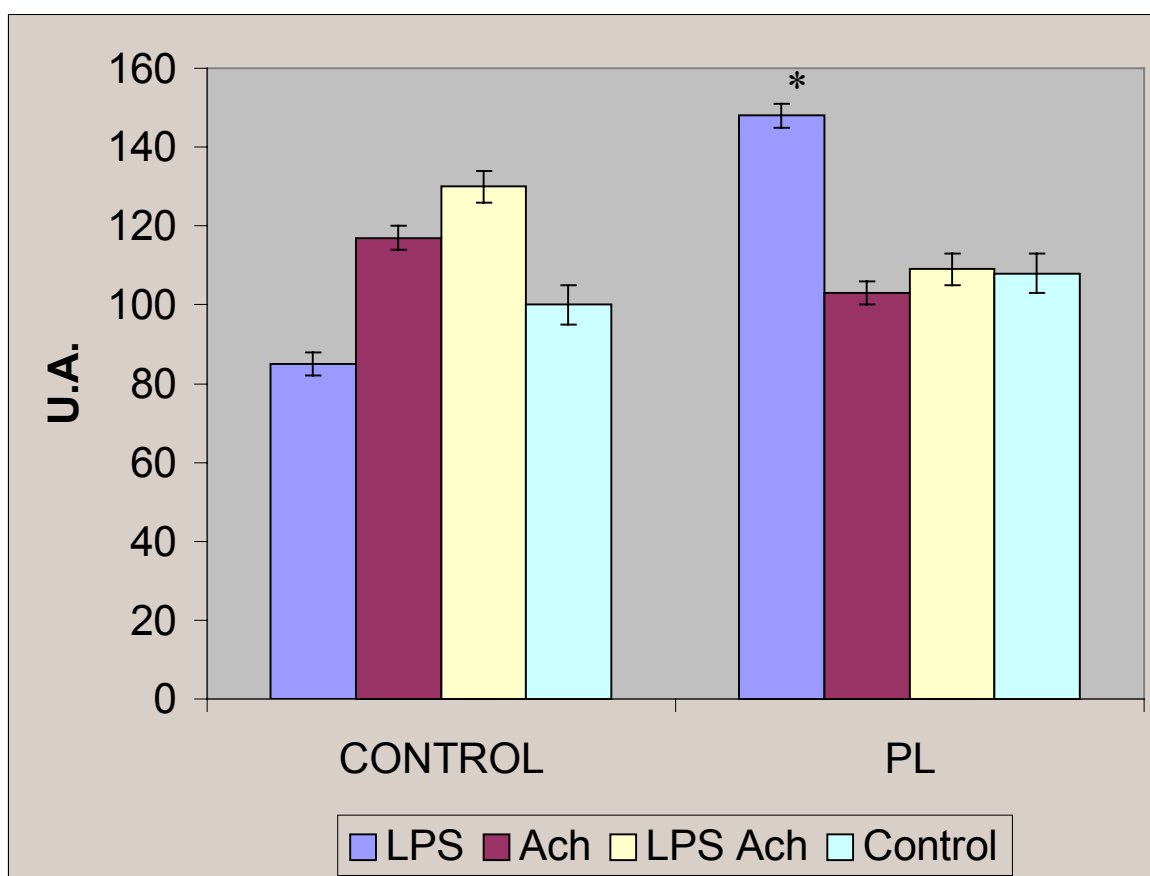


Figura 6. Inducción de ARNm de IL 8 en células HepG2 pretratadas con LPS (PL) (1ug/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 1 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. U.A. Unidades Arbitrarias.

la doble exposición al LPS muestra un aumento significativo con respecto al control de un 48%, en los otros casos la expresión de la IL 8 es semejante a la expresión basal. Por lo tanto, el único tratamiento en el que se encuentra una diferencia significativa en el efecto del

pretratamiento con LPS es en aquellas células que fueron expuestas por segunda ocasión a este tóxico ya que la expresión es mayor cuando se somete las células al pretratamiento con respecto a las células a las que no se expuso a esta condición.

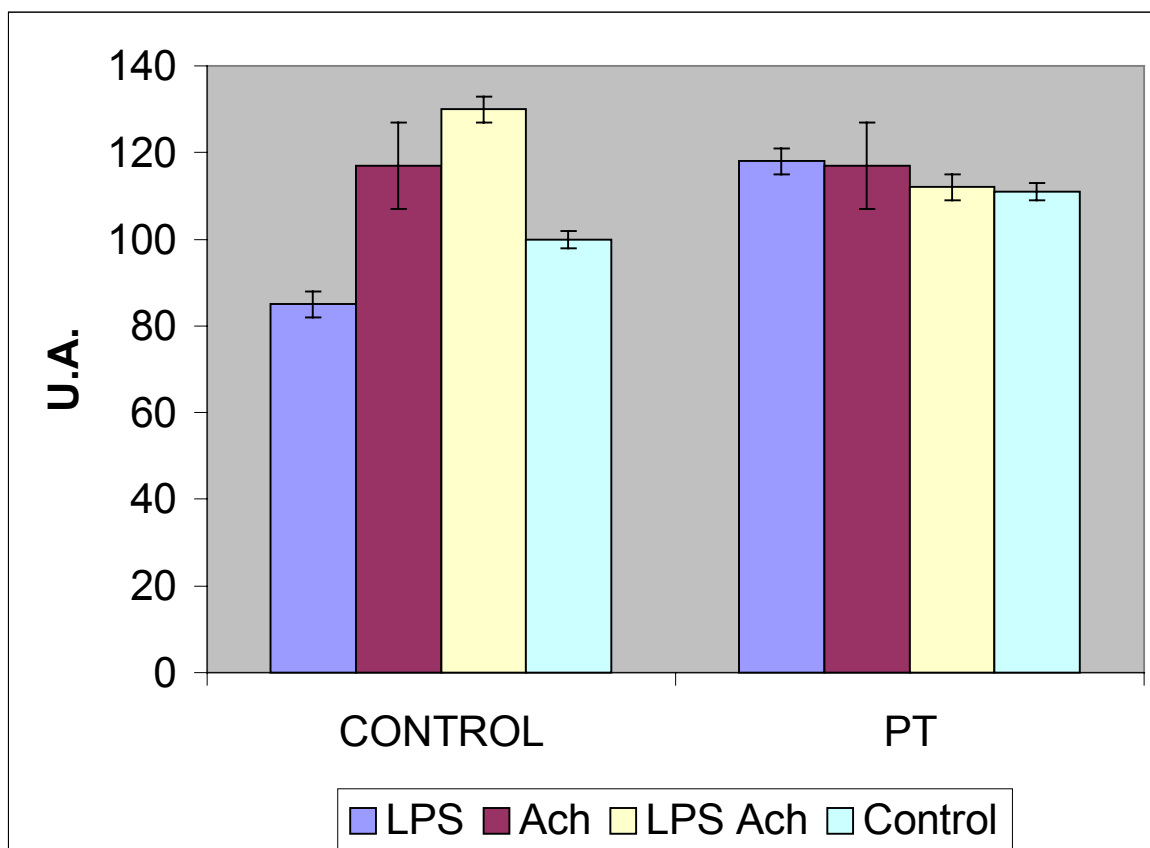


Figura 7. Inducción de ARNm de IL 8 en células HepG2 pretratadas con $\text{TNF}\alpha$ (PT) (5ng/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 1 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

Por otro lado, como se señaló con anterioridad, el $\text{TNF}\alpha$ es un factor importante en los efectos del pretratamiento con LPS, por ello también se estudió el efecto del pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ en la expresión de IL 8 en células expuestas a LPS y acetaldehído. En la figura 7 puede observarse que el pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ tiene como efecto

una tendencia a aumentar la expresión de la IL 8 en los tres casos estudiados aunque dicha tendencia no muestra diferencias significativas con respecto al control. Por otro lado, si se realiza la comparación entre las células que fueron sometidas a un pretratamiento con LPS o con $\text{TNF}\alpha$ no se observan diferencias significativas entre los tratamientos correspondientes con los tres tóxicos.

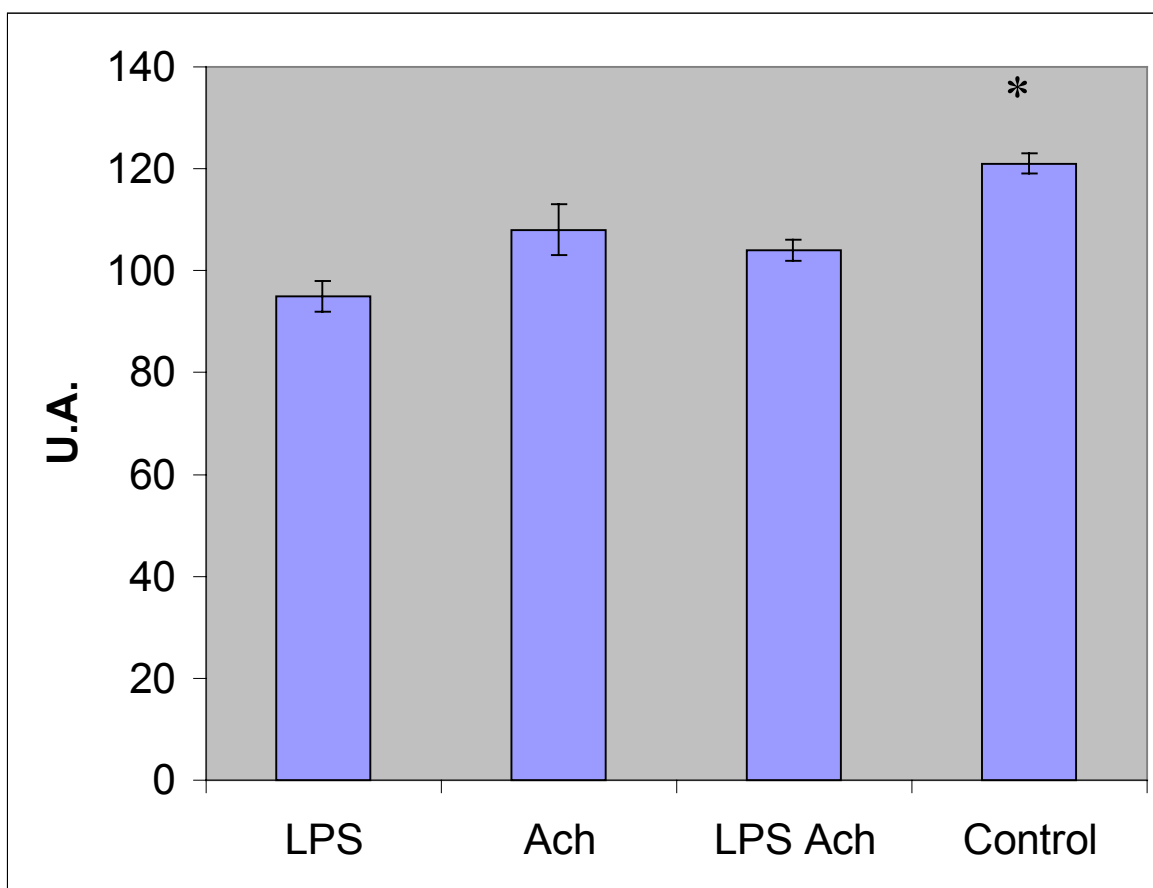


Figura 8. Efecto de la administración de $\text{TNF}\alpha$ (5ng/ml) en el efecto del LPS (1 ug/ml) y el acetaldehído (Ach, 175 uM) en células HepG2 tratadas durante 1 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. U.A. Unidades Arbitrarias.

Ahora bien, se estudió así mismo el efecto de la administración simultánea del $\text{TNF}\alpha$ en la expresión de la IL 8. La figura 8 muestra los resultados obtenidos en la inducción del mensajero de IL 8 en células

tratadas con TNF α conjuntamente con los otros tóxicos. Puede observarse que el TNF α induce un aumento en la expresión del ARNm de la citocina estadísticamente significativo aunque de poca cuantía (21% mayor con respecto al control). Por otro lado, el TNF α administrado junto con acetaldehído, LPS o ambos no muestran una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Esto contrasta con el hecho de que la secreción de IL 8 en células tratadas con,acetaldehído y LPS mostraban un efecto sinérgico cuando se administraban de manera simultánea con TNF α , fenómeno que parece ser independiente de la regulación transcripcional.

5.3 Contenido de glutatión reducido mitocondrial y citosólico.

Con el fin de investigar si los diferentes tratamientos empleados tenían un efecto en el estrés oxidativo de las células, se realizaron estudios sobre la cantidad de glutatión reducido tanto en citosol como en mitocondria como parámetro de este fenómeno.

En la gráfica 9 se muestran los valores obtenidos para el glutatión citosólico (GSHc), el nivel basal de GSHc es de 20.9 ± 0.5 nmol SH/ 10^6 células se observa que en aquellas células que no recibieron un pretratamiento con LPS el acetaldehído tuvo un efecto en los niveles de GSHc de manera que se tiene un valor significativamente menor con respecto al control (11.3 ± 1.7 nmol SH/ 10^6 células). Mientras tanto, en el caso en que las células fueron expuestas a acetaldehído y LPS también existe una disminución significativa del valor de GSHc 15 ± 0.9 nmol SH/ 10^6 células.

Por otro lado, en las células que estuvieron expuestas a LPS 24 h antes de una nueva exposición a LPS, acetaldehído o ambos, se observa

una diferencia significativa en los valores de GSH c ya que los valores observados fueron de 12 ± 0.46 , 11 ± 1.2 y 12 ± 0.5 nmol SH/ 10^6 células respectivamente. Sin embargo, es de notar que tal como ocurría en los estudios de secreción de IL 8 no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de los experimentos en los que se aplica un pretratamiento con LPS.

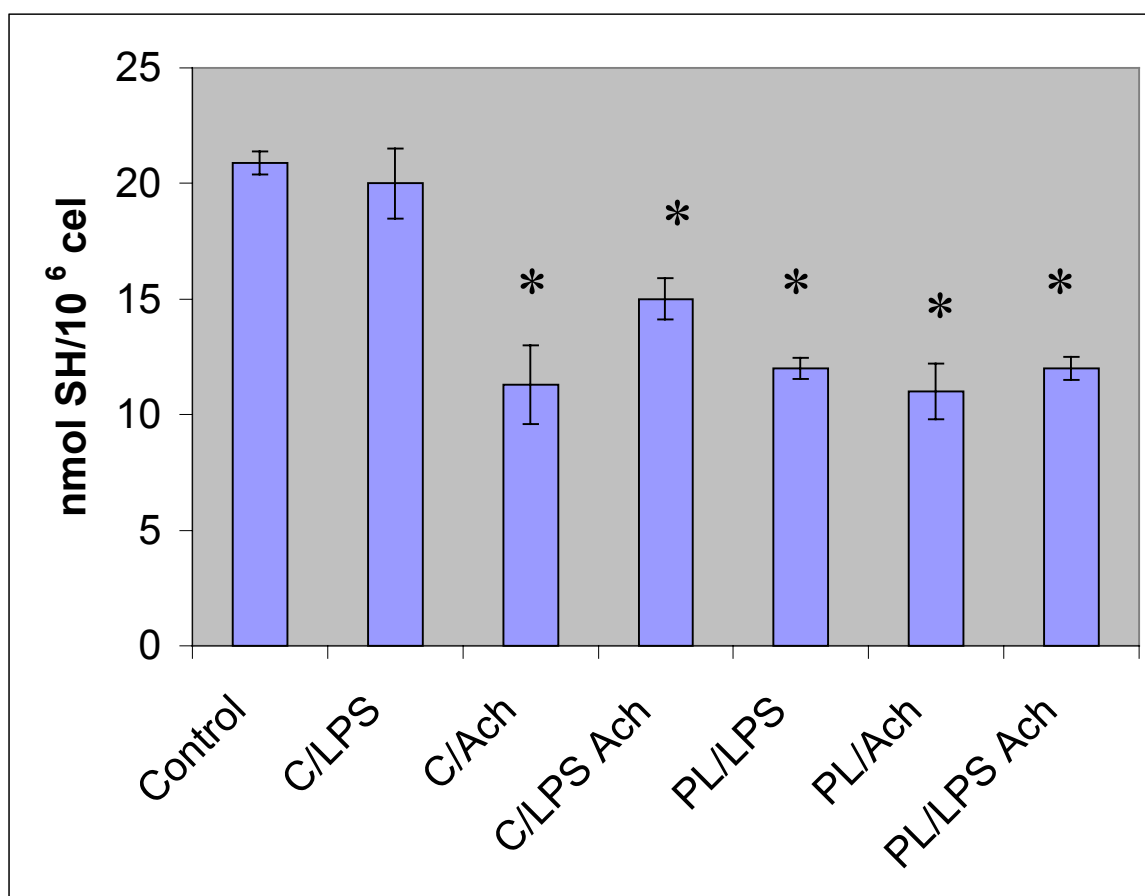


Figura 9. Contenido de glutatión reducido citosólico en células HepG2 pretratadas (PL) con LPS (1 μ g/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1 μ g/ml) y acetaldehído (Ach, 175 μ M) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control

Ahora bien, así como se analizó el contenido de glutatión citosólico se realizaron ensayos para determinar el contenido de glutatión mitocondrial (GSHm) en células expuestas a un pretratamiento

con LPS. En la figura 10 se muestran los valores observados para los contenidos de GSH m, el nivel basal es de 2.7 ± 0.2 nmol SH/ 10^6 células. En las células que únicamente fueron expuestas a acetaldehído se observa una disminución significativa con respecto al control (0.6 ± 0.09 nmol SH/ 10^6 células). Por otro lado, cuando las células fueron expuestas a un pretratamiento de LPS antes de ser expuestas a LPS, acetaldehído o ambos, se observa una disminución en los tres casos y dicho cambio es estadísticamente significativo.

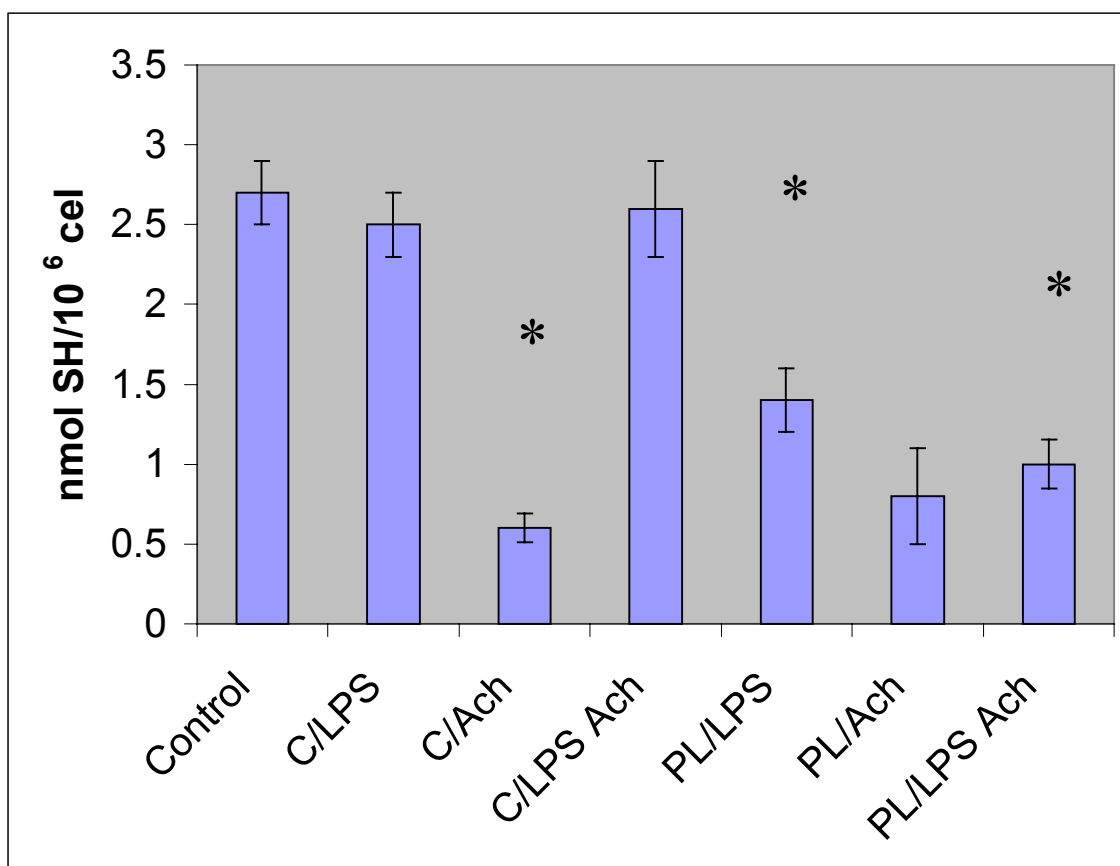


Figura 10. Contenido de glutatión reducido mitocondrial en células HepG2 pretratadas (PL) con LPS (1ug/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

En lo que respecta al efecto del pretratamiento con respecto a aquellas células a las que no se expuso a la primera exposición a LPS podemos observar en la misma gráfica que tanto en las células expuestas a LPS y acetaldehído junto con el LPS existen diferencias significativas con el correspondiente ensayo en que no se expuso al pretratamiento con LPS.

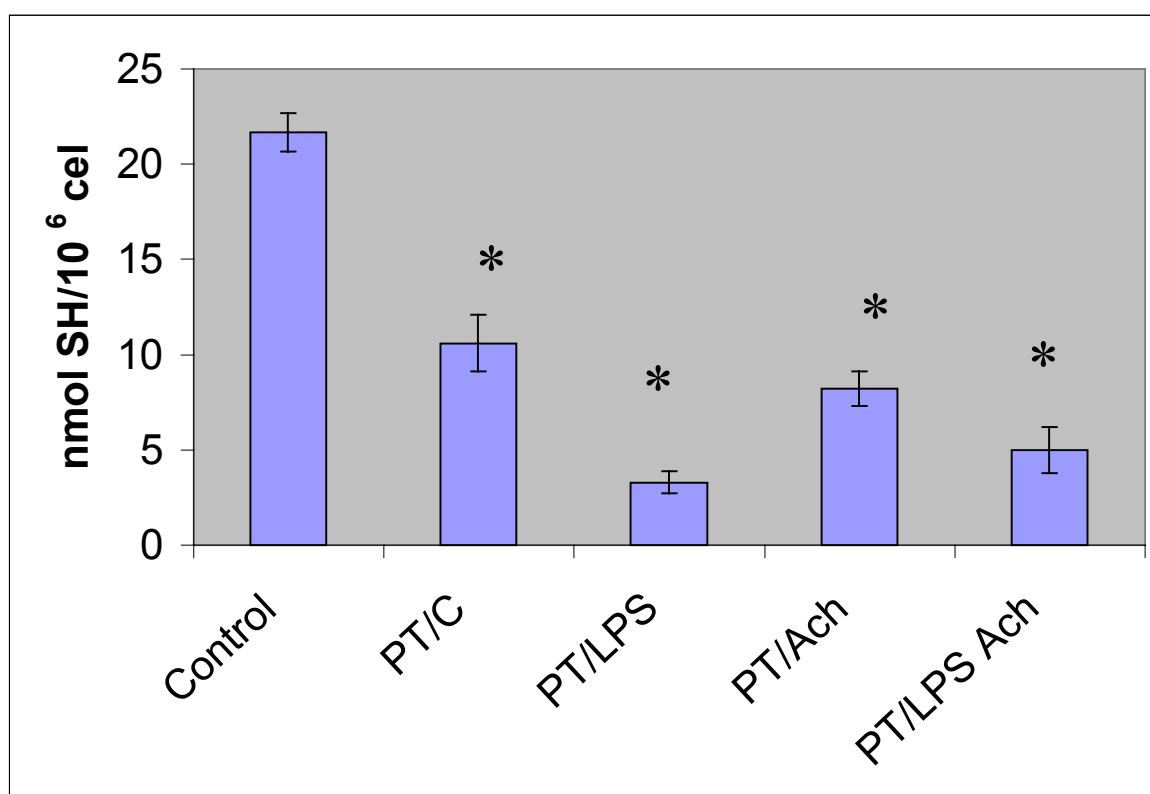


Figura 11. Contenido de glutatión citosólico en células HepG2 pretratadas (PT) con $\text{TNF}\alpha$ (5ng/ml) durante 24 h y tratadas con LPS y acetaldehído (Ach, 175 μM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

Cuando se analizó el efecto de un pretratamiento en el que se ha sustituido el LPS con $\text{TNF}\alpha$, podemos observar que el $\text{TNF}\alpha$ tiene un

efecto mayor en la disminución del contenido de GSH c (figura 11). Se puede observar en el pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ una disminución en la cantidad de GSHc de 10.6 ± 1.5 nmol SH/ 10^6 células. Por otro lado, los tres tratamientos empleados (LPS, acetaldehído o ambos) muestran una disminución en la cantidad de GSHc. En lo que respecta al contenido de GSHm, que se muestran en la figura 12, se pudo observar que el pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ induce una tendencia a la disminución en la cantidad de GSH m aunque esta no es significativa. Por otro lado, existe una clara disminución en los niveles de esta molécula en los tratamientos en los que se emplea LPS, acetaldehído o ambos con respecto al control.

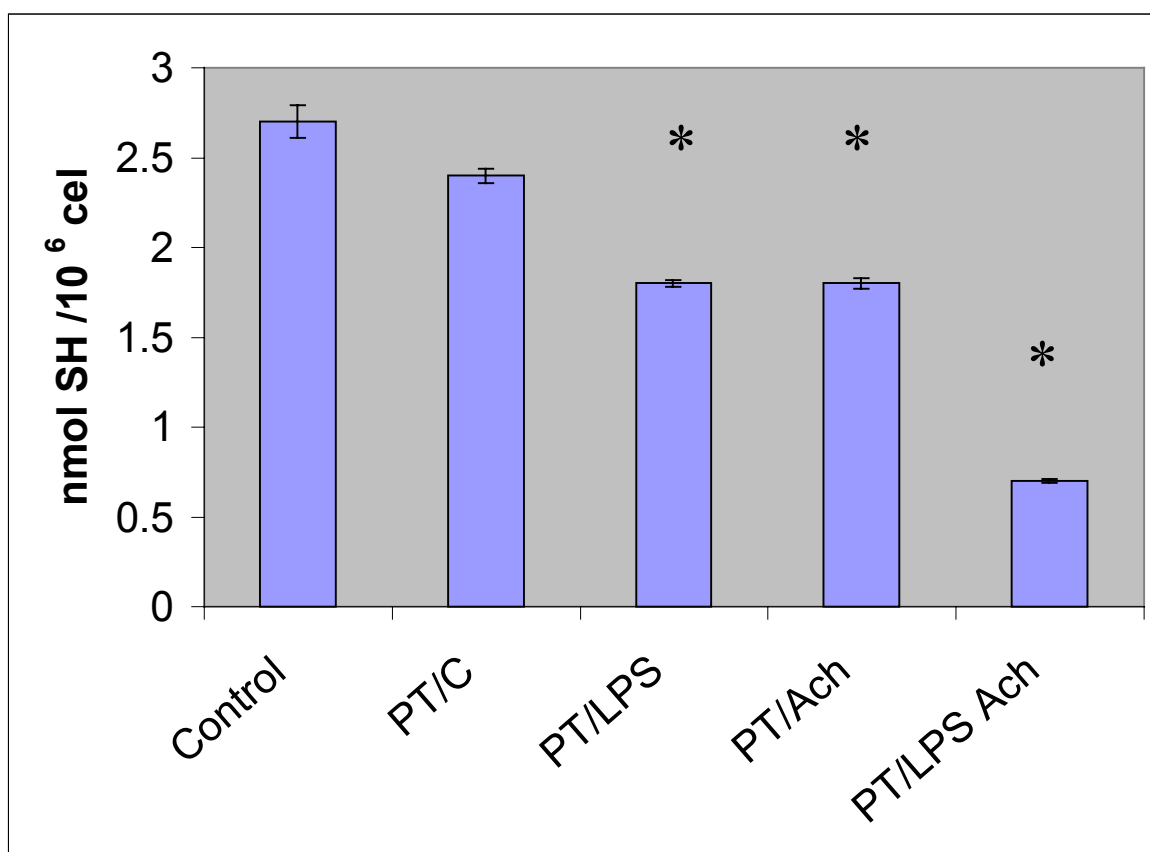


Figura 12. Concentración de GSH m en células HepG2 pretratadas (PT) con $\text{TNF}\alpha$ (5ng/ml) durante 24 h y tratadas con LPS (1ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante otras 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

Finalmente, se analizó el efecto de la administración simultánea de $\text{TNF}\alpha$ junto con los dos tóxicos. En la figura 13 pueden observarse los valores obtenidos cuando las células se expusieron a $\text{TNF}\alpha$, LPS y acetaldehído durante 24 h. En esta figura se observa que únicamente el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$, LPS y acetaldehído muestran un efecto en la concentración de GSH alcanzando valores de $12 \pm 1.3 \text{ nmol SH}/10^6 \text{ células}$.

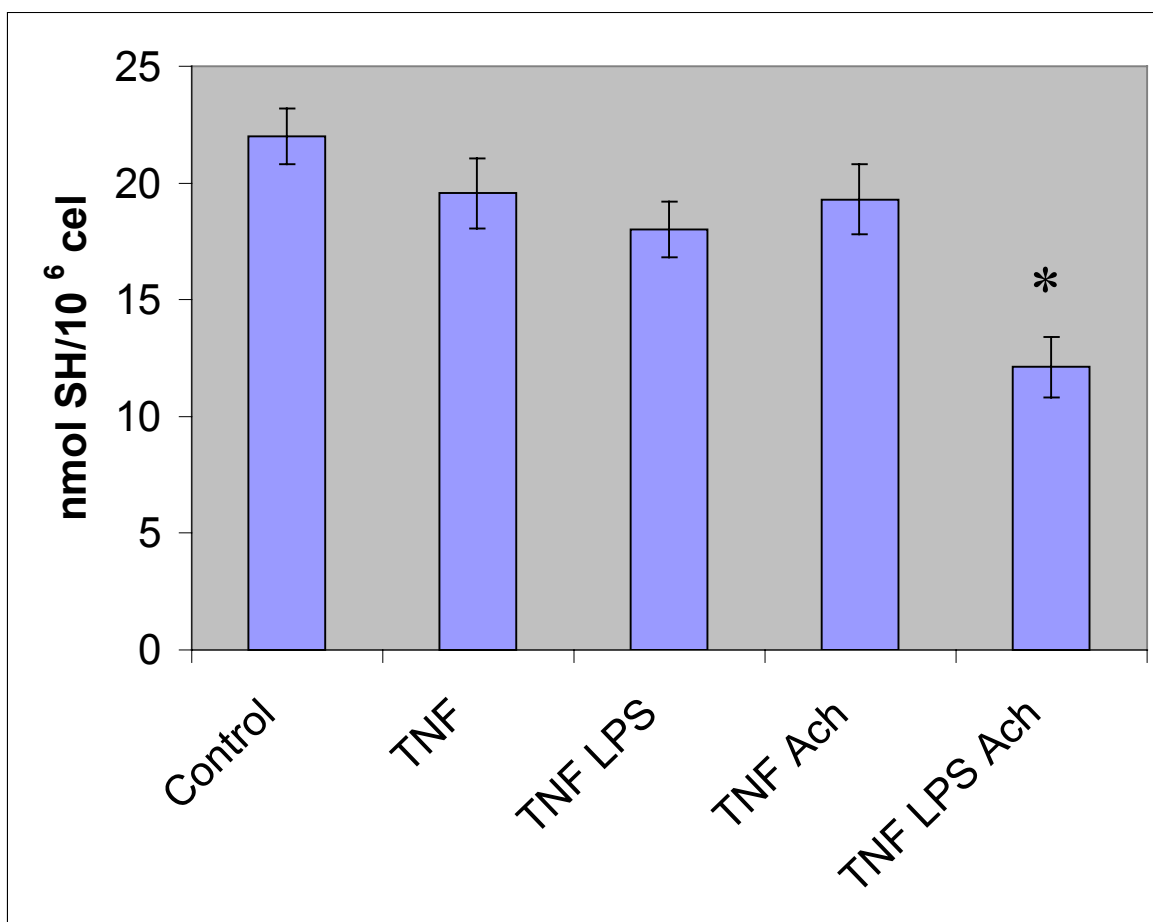


Figura 13. Concentración de glutatión reducido citosólico en células HepG2 tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (5ng/ml), LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

Cuando se estudio el efecto del cotratamiento con $\text{TNF}\alpha$ en el contenido de GSH m, lo que puede observarse es que en presencia de

LPS o acetaldehído, el $\text{TNF}\alpha$ muestra una tendencia a aumentar los niveles de GSH m aunque de manera no significativa con respecto al control. Mientras que cuando se administró $\text{TNF}\alpha$, LPS y acetaldehído conjuntamente, el contenido de GSH m disminuye significativamente con respecto al control y a los otros tratamientos (0.4 ± 0.2 nmol SH/ 10^6 células) (figura 14).

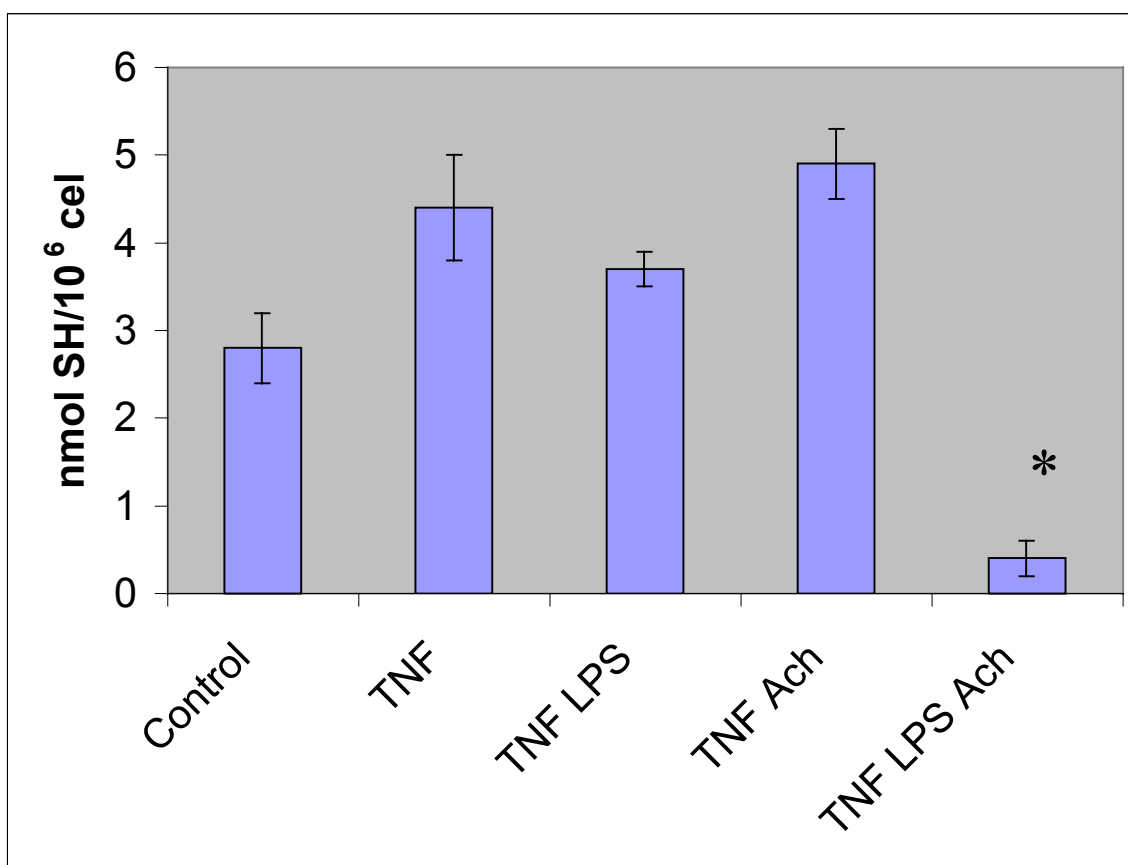


Figura 14. Concentración de glutatión reducido mitocondrial en células HepG2 tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (5ng/ml), LPS (1 ug/ml) y acetaldehído (Ach, 175 uM) durante 24 h. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos independientes $\pm$ D.E. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

6 DISCUSIÓN.

Se ha reportado que el consumo de alcohol, tanto crónico como agudo puede aumentar la permeabilidad intestinal a la endotoxina y disminuir la activación del sistema reticuloendotelial del hígado (Mendenhall,1984, Storey,1987, Pugh, 1973) . Estos factores pueden llevar a un incremento en las concentraciones plasmáticas de la endotoxina en pacientes con enfermedad hepática alcohólica (Bode, 1987). Dado que la endotoxina es un estímulo para aumentar la producción de diversas citocinas también es posible encontrar un incremento en los niveles en suero de $TNF\alpha$, IL 1 e IL 6 como consecuencia del consumo de alcohol. Además, la endotoxina y el $TNF\alpha$ pueden estimular la producción de IL 8, un quimiotáctico para neutrófilos secretado por monocitos, macrófagos, células Kupffer y hepatocitos. Entonces, la IL 8 puede mediar la infiltración de neutrófilos y el daño hepático en la EHA.

Los niveles de IL 8 han sido estudiados en pacientes con hepatitis alcohólica y se ha demostrado que estos muestran concentraciones elevadas de la quimiocina. Pacientes que mostraban niveles de IL 8 superiores a 479 pg/ml después de un seguimiento de dos años tenían el rango de mortalidad mas alto en un grupo de pacientes con hepatitis alcohólica (Huang, 1996).

La relación entre el daño hepático en la hepatitis alcohólica y los niveles de IL 8 son complejos. A pesar de los resultados obtenidos a la fecha se requieren más estudios para detectar los inductores específicos de la IL 8 durante la enfermedad.

Secreción de IL 8.

En este estudio se investigó el efecto de un pretratamiento con LPS (1ug/ml) sobre la síntesis de IL 8 inducida por el mismo LPS y por acetaldehído (175 uM); además, se investigó la participación del $\text{TNF}\alpha$ y del estrés oxidativo en dicho proceso. El modelo empleado consistió en una línea de células derivadas de un hepatoblastoma humano (HepG2).

Primeramente, se evaluó la secreción de IL 8 al medio de cultivo de células HepG2 pretratadas con LPS 24 h y tratadas posteriormente con LPS y acetaldehído, y los controles respectivos a los que no se sometió al pretratamiento con LPS.

En cuanto a la secreción de las células control que no fueron sometidas a la presencia de ningún tóxico mostraron una secreción basal de cerca de 200 pg/ml, en lo que respecta a los controles sin pretratamiento se obtuvieron valores ligeramente mayores, y solo se encontró diferencia significativa en el caso de la exposición al LPS, otros trabajos de nuestro laboratorio han confirmado que tanto el acetaldehído como el LPS inducen un aumento en la secreción de IL 8 a valores cercanos a los 250 pg/ml.

Estos resultados concuerdan con un estudio desarrollado por Dong y su grupo (1998a) en el que reportan que hepatocitos sometidos a LPS a concentraciones de 1 ug/ml muestran valores de secreción de IL 8 a valores próximos a los encontrados en este trabajo.

Secreción de IL 8 en pretratamientos con LPS.

Por lo que respecta a los resultados de las células que fueron sometidas

al pretratamiento con LPS se observó que todos los tratamientos mostraban un aumento en la secreción de la IL 8 aunque no se encontraron diferencias entre los diferentes tóxicos empleados (LPS, Ach o ambos).

De acuerdo a nuestras hipótesis de trabajo se esperaba que las células mostraran una respuesta diferencial a los tratamientos empleados ya que la presencia conjunta de ambos tóxicos podría influir sobre diferentes puntos de la regulación de la IL 8 ya que existen evidencias experimentales de que esta citocina puede regularse a varios niveles, transcripcional, post transcripcional y de traducción. Los factores que podrían participar en la inducción de la IL 8 que se han reportado son $\text{TNF } \alpha$ y radicales libres entre los más importantes (Locati, 1999).

Por ello resulta importante investigar si es el mismo mecanismo de acción por el cual se está induciendo el aumento de la IL 8 en las células que fueron sometidas a un pretratamiento, ya que eso puede brindar información acerca de los procesos que la célula esta realizando.

Existen algunos trabajos en los que se estudia a los factores que contribuyen con la hepatotoxicidad del LPS, por un lado, Wonderman (1998) muestra que el LPS puede producir $\text{TNF } \alpha$ en células HepG2; además, se sabe que el $\text{TNF } \alpha$ contribuye a la generación de daño hepático en ratas después de una exposición a LPS (Hewwett, 1993). Así mismo, Dong muestra que la secreción de IL 8 por células HepG2 tratadas con LPS puede disminuir en la presencia de un anticuerpo anti $\text{TNF } \alpha$ con lo que se corrobora que el LPS induce esta citocina y el $\text{TNF } \alpha$ puede estar mediando algunas de las respuestas celulares al LPS tales como la secreción de la quimocina IL 8.

Secreción de IL 8 en pretratamientos con $\text{TNF}\alpha$.

Por lo anterior, se decidió estudiar si el aumento de la secreción de IL8 que se encuentra en las células HepG2 pretratadas con LPS durante 24 h estaba mediado por el $\text{TNF}\alpha$. Con este fin se realizó un experimento en el que se colocó un anticuerpo anti $\text{TNF}\alpha$ 20 min antes del pretratamiento con LPS. Los resultados muestran que se presentó una disminución en la secreción de IL 8 en los tres tratamientos empleados. Estos datos corroboran los resultados obtenidos por otros grupos, en los que se presenta evidencia de que los hepatocitos pueden secretar $\text{TNF}\alpha$ como respuesta a la presencia del LPS.

Además, los resultados obtenidos cuando se empleó un anticuerpo anti $\text{TNF}\alpha$ humano muestran que el mecanismo por el cual la célula responde al acetaldehído o al LPS después del pretratamiento podría ser similar, ello en términos de que en ambos casos la presencia del $\text{TNF}\alpha$ es indispensable para la secreción de la IL 8. En contraste, cuando las células se exponen a ambos tóxicos después del pretratamiento ciertamente el $\text{TNF}\alpha$ es un factor que está mediando el incremento de la secreción de IL 8; sin embargo, los niveles de secreción no vuelven al nivel basal sino que aun permanecen 81% más elevados que el control. Ello significa que si bien el $\text{TNF}\alpha$ secretado como resultado de la exposición al LPS es importante, parecen existir otros factores involucrados.

En un experimento con células hepáticas aisladas de ratones que fue dirigido por Mawet (1995), se reporta que la producción de CINC, el equivalente de la IL 8 en roedores, aumenta en respuesta a la presencia de medios condicionados de células Kupffer tratadas con LPS. Así

mismo, este efecto se reduce por el uso de un anticuerpo contra la IL 1 β y no por anticuerpos contra el TNF α cuando estos son colocados directamente a los hepatocitos. Además de esta evidencia, otros estudios indican que la producción de IL 8 podría estar regulada por la presencia de radicales libres y peróxido de hidrógeno (Dong, 1998a, Dong, 1998b, Lakshminarayanan, 1998, Huang, 1996).

Por lo anteriormente explicado, es posible proponer que, el aumento de la secreción de IL 8 que es no dependiente de la presencia de TNF α en las células HepG2 tratadas con LPS y Ach después del pretratamiento, podría estar mediado por IL 1 β o bien como resultado del estrés oxidativo generado por la segunda exposición a los tóxicos.

Nuestros resultados demuestran que el TNF α secretado durante el pretratamiento con LPS es importante para que ocurra el aumento en la secreción de la IL 8, sin embargo, es importante señalar que esta citocina podría estar actuando en conjunción con otros factores. Con el fin de estudiar que el TNF α es el responsable del aumento de la secreción de IL 8 se sustituyó el LPS del pretratamiento con un recombinante humano de TNF α , en estos resultados podemos observar que el aumento no es tal que asemeje al observado con el pretratamiento con LPS, por ello se puede decir que el pretratamiento con LPS induce la secreción de factores como el TNF α y otros (que podrían ser incluso intracelulares) de manera que es necesaria la presencia de varios y no solo del TNF α para que la segunda exposición a los tóxicos induzca un aumento en la secreción de la IL 8.

Con los resultados anteriores podemos decir que el mecanismo de acción por el cual los tóxicos inducen la secreción de IL 8 varía en los

tres tratamientos empleados (LPS, Ach o ambos), sin embargo es importante resaltar que el TNF α está involucrado en todos ellos. Por un lado tenemos el caso en el que posterior al pretratamiento se adicionó LPS y Ach simultáneamente, bajo estas condiciones el TNF α no era esencial para el aumento de la secreción de IL 8. Por otro lado, cuando posterior al pretratamiento se adicionó LPS se observó que la presencia de TNF α es esencial para que se presente en la secreción de IL 8; además, nuestros resultados muestran que la presencia del TNF α es indispensable pero no es el único factor involucrado en el proceso pues cuando se sustituyó el pretratamiento con LPS por un pretratamiento con TNF α no se obtuvo un incremento de igual magnitud. En cuanto al Ach se observa un fenómeno muy semejante cuando la segunda dosis es de LPS.

De todo ello se obtiene que el TNF α tiene un papel importante en el proceso de incremento de la secreción de IL 8, pero la importancia de esta citocina es diferente dependiendo de los tratamientos empleados.

Resulta conveniente recalcar una diferencia que existe en los resultados obtenidos cuando después del pretratamiento con TNF α se administra LPS o Ach, en la figura 3 puede observarse que cuando la segunda exposición es de Ach se presentó un incremento de la secreción de IL 8, este aumento es de hecho diferente significativamente con respecto al control al que solo se le sometió al pretratamiento con TNF α . Este fenómeno no pudo observarse con el LPS, lo que indica que los mecanismos por los cuales ocurre el incremento de la secreción de IL 8 mediada por los tres tratamientos son diferentes en cada uno de los casos.

Esto sugiere que en las células HepG2, los mecanismos por los cuales se induce la producción de IL 8 son complejos y se plantearon dos estrategias para hacer un acercamiento al problema. Una de las posibilidades estudiadas, es que las concentraciones empleadas no fueran las adecuadas al realizar los experimentos de coadministración (LPS/Ach) en este modelo celular por lo que se procedió una serie de experimentos en los que se determinó la secreción de IL 8 en células expuestas a diferentes concentraciones de ambos tóxicos durante 24 h. Los resultados obtenidos nos muestran que la respuesta observada se mantiene a pesar de las variaciones en las concentraciones de ambos tóxicos. Por ello y por que otros grupos sugieren que factores elaborados y secretados al medio hepático por monocitos activados y células de Kupffer pueden estar relacionados con la producción de IL 8 por los hepatocitos (Thornton, 1991; Maher, 1995) se decidió estudiar el efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre la secreción de IL 8.

Se empleó una concentración de $\text{TNF}\alpha$ de 5 ng/ml ya que el grupo de Kawada (1998) reporta que células de Kupffer estimuladas con LPS pueden secretar $\text{TNF}\alpha$ en concentraciones de hasta 30 ng/ml, por otro lado, en otros estudios se emplea esta concentración.

Los resultados muestran que la aplicación de $\text{TNF}\alpha$, LPS y Ach de manera simultánea tiene un efecto sinérgico en la secreción de la IL 8. Además, en este caso si se presenta un efecto diferencial en los valores de la secreción. Este dato, nos podría indicar que los pretratamientos con $\text{TNF}\alpha$ y LPS de alguna manera restringen la respuesta celular ya que la respuesta a una segunda exposición es mucho menor que a una dosis única, y ello ocurre sin importar que las vías que activen la secreción de IL 8 sean diferentes. Algunos trabajos señalan la acción protectora del LPS a posteriores exposiciones a agentes de daño

(Fernández, 2000, Colleti, 1994), nuestros resultados indican que no se trata propiamente de un efecto protector, en tanto que la secreción de IL 8 si está aumentada, lo que involucra una mayor actividad quimioatrayente (aunque habría que considerar que IL 8 también es importante en la limpieza de las células dañadas en el tejido), sino que prepara a las células hacia un fenómeno de tolerancia, lo que limita su respuesta a la segunda exposición de los agentes tóxicos.

Con estos resultados se demuestra la importancia que podrían adquirir factores derivados de otros tipos celulares sobre la respuesta de un tipo celular específico, de manera que si en las células HepG2 no se presentan una respuesta particular, la secreción de IL 8, a la presencia de tóxicos como el Ach ó el LPS, la presencia de mediadores de comunicación derivados de otros tipos celulares modificarán este comportamiento. Por otro lado, la evidencia encontrada nos permite proponer que existen mecanismos de regulación de la respuesta celular a una nueva exposición a algún agente de daño.

Concentraciones citosólicas y mitocondriales de GSH.

El GSH se ha identificado como una de las moléculas hepatoprotectoras más importantes por su capacidad de neutralizar radicales libres. Parte del GSH es llevado a la matriz mitocondrial y requiere un acarreador membranal que en presencia del acetaldehído puede dañarse, induciéndose así una disminución en el contenido mitocondrial de GSH (Fernández-Checa, 1998b).

La mitocondria no solo es una fuente de RL sino que es un blanco para la acción de algunas citocinas como el TNF α que de hecho inducen la formación de radicales libres como parte de sus mecanismos de

señalización. Bajo estas condiciones, las limitaciones de las reservas de GSH mitocondrial (GSHm) representan un factor importante que podría sensibilizar a los hepatocitos a los efectos prooxidantes de las citocinas o de otros agentes de daño (Fernández-Checa, 1998b). Los RL generados por la disfunción mitocondrial participan y causan la iniciación y propagación del fenómeno peroxidativo asociado con la muerte celular necrótica y la regulación de genes a través de factores de transcripción que se activan por RL, incluyendo la inducción de IL 8 (Chimada, 1999).

Por lo anterior, una de las preguntas planteadas en el presente trabajo fue si el pretratamiento con LPS por inducir la secreción de $\text{TNF}\alpha$ podría estar fomentando la generación de RL lo que llevaría a una sensibilización de las células a los agentes de daño empleados en lo referente a la disminución en los niveles de GSH tanto en citosol (GSHc) como en mitocondria.

Como puede observarse en los resultados, el acetaldehído por sí mismo disminuía las concentraciones de GSHc como GSHm siendo este último el más afectado lo que coincide con lo reportado en la literatura.

GSH en los pretratamientos con LPS.

En lo referente a los pretratamientos con LPS, puede observarse que el contenido citosólico y mitocondrial de GSH se ven disminuido en todos los casos, lo que indica que durante el proceso debió haberse dado la generación de radicales libres y estrés oxidativo. Puede observarse una tendencia a disminuir los niveles de GSHc y GSHm con respecto a los controles que no fueron sometidos al pretratamiento por lo que es posible que este sensibilice a las células a la presencia de agentes tóxicos.

GSH en los pretratamientos con TNF.

Para estudiar si este efecto de sensibilización estaba mediado por $\text{TNF}\alpha$ se substituyó el LPS durante el pretratamiento por $\text{TNF}\alpha$ recombinante humano, se observó que en este caso el pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ por si mismo inducía una disminución en los niveles citosólicos de GSH mientras que en la mitocondria se observan niveles iguales a los basales, esto contrapone lo que se esperaba ya que dado que el $\text{TNF}\alpha$ induce la formación de RL en la mitocondria esta debería mostrar menores niveles de GSH, podría suponerse que el tiempo de estudio ha dado lugar a un proceso de recuperación (48 h), esto no explica los niveles bajos encontrados en el citosol. Nuevos estudios se requieren para esclarecer los mecanismos por los que este proceso ocurre.

Los pretratamientos con el $\text{TNF}\alpha$ tienen como resultado una disminución de los niveles de GSHc mayores que el pretratamiento con LPS, en lo que respecta a los niveles de GSHm los niveles de reducción son semejantes con ambos pretratamientos. Nuestros resultados sugieren que es posible que el daño oxidativo observado en los pretratamientos con LPS esté mediado por el $\text{TNF}\alpha$ aunque hacen falta más evidencia experimental que confirme estos resultados.

GSH en cotratamientos con TNF.

Cuando el $\text{TNF}\alpha$ se administra de manera simultanea al LPS o al Ach pudo observarse que no existe una disminución en los niveles de GSH tanto citosólico como mitocondrial. Estos resultados podrían indicar que las células tuvieron tiempo suficiente para recuperarse del daño generado por el estrés oxidativo. Cuando se compara con los resultados

obtenidos en los pretratamientos este tiempo no era suficiente lo que confirma que los pretratamientos sensibilizan a la segunda exposición de los agentes hepatotóxicos.

Los niveles de GSHc y GSHm mostraron una disminución cuando se administran $\text{TNF}\alpha$, LPS y Ach lo que indica que la presencia simultanea de los tóxicos lleva a condiciones oxidantes que las células no pueden contrarrestar.

Es importante señalar que aunque no existe correlación entre los niveles de secreción de IL 8 y los niveles de GSH observados en todos los tratamientos empleados, ello nos indica que ambos procesos no son en todos los casos dependientes uno del otro, como ya se ha señalado, los mecanismos por los cuales las células están induciendo la secreción podrían ser varios. En cuanto a los pretratamientos con LPS existe una relación entre el incremento de la secreción de IL 8 y la disminución de GSH tanto citosólico como mitocondrial. Además, ya que los pretratamientos con $\text{TNF}\alpha$ muestra un comportamiento semejante al anterior podría proponerse que esta citocina puede ser importante para este proceso.

Expresión de IL 8

Para analizar si los mecanismos por los cuales ocurren las variaciones en la secreción de IL 8 involucran una regulación a nivel transcripcional se realizaron estudios de la inducción del ARNm de dicha citocina. Nuestros resultados indican que en el caso de los pretratamientos con LPS únicamente la doble exposición a LPS muestra un incremento significativo en la inducción del ARNm lo que confirma que los mecanismos de acción por los cuales ocurre la producción de IL 8 son

diferentes ya que en los otros dos tratamientos dicho efecto no se observa a 1h de tratamiento con los tóxicos.

En lo que respecta a las células que no fueron sometidas al pretratamiento mostraron un aumento no significativo de los niveles de ARNm con excepción de las células expuestas a LPS en donde se encuentra una disminución de los valores de inducción de la quimocina, sin embargo otros grupos de estudio muestran evidencia de que tanto el LPS como el Ach inducen un aumento en la expresión de la IL 8. Las diferencias entre los resultados pueden deberse a las diferencias entre los modelos empleados y además al hecho de que solo se muestran los resultados para 1 h de tratamiento a la exposición que siguió al pretratamiento. El hecho de que solo uno de los tratamientos muestre diferencias indica que cuando menos la cinética de expresión varía lo que nos lleva a la necesidad de realizar estudios más finos sobre la expresión a tiempos cortos o bien al estudio de la expresión del gen de IL 8 por otras vías como PCR en tiempo real o bien por medio del estudio de la activación de los factores de transcripción importantes en la regulación de esta quimosina como el NFkB o AP1.

Se realizaron estudios de la inducción de la IL 8 en pretratamientos con $\text{TNF}\alpha$ puesto que por un lado se ha mostrado en este estudio que esta citocina está involucrada en la producción de la IL 8 y por otro lado porque está reportado que la activación del NF κ B puede llevarse a cabo por la presencia del $\text{TNF}\alpha$ a través de la generación de radicales libres. Los resultados obtenidos muestran que cuando menos al tiempo estudiado, el pretratamiento induce un ligero aumento en los niveles de ARNm para la IL 8 aunque dicho cambio no es significativo estadísticamente. Ello indica que la regulación de la IL 8 podría estar ocurriendo a un nivel post-transcripcional, con las reservas ya señaladas

en términos de la necesidad de un estudio muy fino de la cinética de expresión que podría desarrollarse por otros medios como el análisis de PCR en tiempo real.

Es importante señalar en este punto que en los resultados de inducción cuando las células solo fueron expuestas al pretratamiento con $\text{TNF}\alpha$ son iguales al nivel basal pues la inducción de la IL 8 es un proceso que ocurre a tiempos menores a 3 h, de hecho otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio corroboran este resultado pues a 24 h los niveles de inducción con $\text{TNF}\alpha$ son iguales a los basales (Gomez-Quiroz, 2000).

Por el contrario, cuando la exposición al $\text{TNF}\alpha$ tiene una duración de apenas 1 h se observa un incremento significativo de la expresión del ARNm de IL 8 como puede verse en la figura 8, en esta misma puede observarse que la inducción de las células que fueron tratadas durante 1 h con $\text{TNF}\alpha$, LPS y Ach no muestran un aumento significativo en la expresión de la quimocina estudiada cuando menos a 1 h de tratamiento.

El presente estudio presenta evidencia de que los pretratamientos con LPS incrementan la secreción de IL 8 en células HepG2 tratadas con acetaldehído y lipopolisacárido y que los mecanismos por los cuales ocurre pueden ser varios y actuar a diferentes niveles, tanto a nivel transcripcionales como post-transcripcional, además se muestra que la respuesta de los hepatocitos puede estar altamente influenciada por la interacción de estos con otros tipos celulares hepáticos y finalmente, nuestros resultados sugieren que el aumento en los niveles de producción de la IL 8 están influenciado por el estrés oxidativo que los algunos tratamientos generaron.

El conocimiento del mecanismo de acción de los tóxicos y de la respuesta celular, específicamente la secreción de citocina, permite ir avanzando en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad hepática alcohólica, esto llevará a proponer nuevas opciones para el mejoramiento de terapias ya existentes o la proposición de nuevos métodos para el control y reversión del daño.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Adachi, Y., Moore, L.E., Beadford, B.U., Gao, W., Thurman, R.G. (1995). Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. 108:218-224.
2. Adams, H., Jordan, C. (1984). Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am*. 68:179-200.
3. Arias, I., Schachter, D., Popper, H., Shafritz, D. (1984). *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press. New York, E.E.U.U. Section II.
4. Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophil. *J Clin Invest*. 84: 1045-9.
5. Bhagwande, B., Apte, M., Manwarring, L., Dickenson, J. (1997). Endotoxin induced hepatic necrosis in rats on alcoholic diet. *J Pathol*. 151:47-53.
6. Bode, C., Kugler, V., Bode, J.C. (1987). Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with an evidence of chronic liver diseases following acute alcoholic excess. *J Hepatol*. 4: 8-14.
7. Bode, J.C., Bode, C. (1992). Alcohol malnutrition and the gastrointestinal tract. En: Watson, R.R., Watzi, B. Ed. *Nutrition and Alcohol*. CRC Press. 403-28.
8. Campollo, O., Valencia-Salinas, J.J., Berumen Arellano, A., Pérez-Aranda, M.A., Panduro-Cerda, A., Segura-Ortega, J. (1997). Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el hospital civil de Guadalajara. *Salud Publica Mex*. 39: 195-200.
9. Chimada, T., Watanabe, N., Hirashi, H., Terano, A. (1999). Redox regulation of interleukin 8 expression in MKN28 cells. *Dig Dis Sci*. 44: 266-273.
10. Chomczynski, P.A. (1993). Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques*. 15: 532-6.
11. Colell, A., García-Ruiz, C., Miranda, M., Ardite, E., Marí, M., Morales, A., Corrales, F., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C. (1998). Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology*. 115: 1541-1551.
12. Colletti, L.M., Remick, D.G., Campbell, D.A. Jr. (1994). LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 57 (3): 337-343.

- 13.** Damme, J.V. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. En: The cytokine handbook, Thomson, A.W. Editor. Academic Press. pp. 185-208.
- 14.** Decker, T., Lohmann-Matthes, M., Karck, U., Peters, T., Decker, K. (1989). Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J Leukoc Biol.* 45:139-146.
- 15.** DGEISS. (2001). Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, 1999. *Salud Pública de México.* 43(1):67-73.
- 16.** Dierick, P. (1989). Partial purification and characterization of the soluble glutathione transferase isoenzymes from culture HepG2 cells. *Cell Biol Inter Rep.* 13:585-593.
- 17.** Dong, W., Simeonova, P.P., Gallucci, R., Matheson, J., Fannin, R., Montuschi, P., Flood, L., Luster, M.I. (1998a). Cytokine expression in hepatocytes: Role of oxidant stress. *J Interferon Cytokine Res.* 18:629-638.
- 18.** Dong, W., Simeonova, P.P., Gallucci, R., Matheson, J., Wang, S., Montuschi, P., Flood, L., Luster, M.I. (1998b). Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Tox Appl Pharma.* 151: 359-366.
- 19.** Duthie, S., Melvin, W., Burke, M. (1994). Bromobenzene detoxification in the human liver derived HepG2 cell line. *Xenobiótica.* 24:265-279.
- 20.** Eguchi, H., McCuskey, P.A., McCuskey, R.S. (1991). Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology.* 13:751-7.
- 21.** Fernandez, E.D., Flohe, S., Siemers, F., Nau, M., Ackermann, M., Ruwe, M., Schade, F.U. (2000). Endotoxin tolerance protects against local hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Endotoxin Res.* 6(4):321-328.
- 22.** Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz, N., Garcia-Ruiz, C., Colell, A. (1998,a). Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis.* 18(4):389-401.
- 23.** Fernandez-Checa, J.C., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Mari, M., Miranda, M., Ardite, E. (1998,b). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors.* 8(1-2):7-11.
- 24.** Fukui, H., Matsumoto, M., Tsujita, S., Takaya, A., Kojima H., Matsumura, M., Tsujii, T. (1994). Plasma endotoxin concentration and endotoxin binding capacity of plasma acute phase proteins in cirrhotics with variceal bleeding: an analysis by new methods. *J Gastroenterol Hepatol.* 9(6):582-6.

- 25.** Guti rrez-Ruiz, M.C., Quiroz, S.C., Souza, V., Bucio, L., Hern ndez, E., Olivares, I.P., Llorente, L., Vargas-Vor ckov , F., Kershenovich, D. (1999). Cytokine, growth factors and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. *Toxicology*. 134:197-207.
- 26.** Halliwell B., Gutteridge, J.M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*. Nov 10;2(8411):1095.
- 27.** Harry, D., Anand, R., Holt, S., Cavies, S., Marley, R., Fernando, B., Goodier, D., Moore, K. (1999). Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology*. 30:1198-1205.
- 28.** Hewett, J.A., Jean, P.A., Kunsel, S.L., Roth, R.A. (1993). Relationship between tumor necrosis factor alpha and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *Am J Physiol*. 256 (6 Pt 1):G1011-5.
- 29.** Hill, B., Deaciuc, I.V., Nanji, A.A., McClain, C.J. (1998). Mechanisms of hepatic injury in alcohol liver diseases. En: *Clinics in liver diseases, alcoholic liver diseases*. 2:703-721.
- 30.** Hill, B., Schmidt, J., Shedlofsky, S.I., Cohen, D.A., (1995). In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in HepG2 liver cells. *Hepatology*. 21: 1114-1119.
- 31.** Huang, Y.S., Chan, C.Y., Wu, J.C., Pai, C.H., Chao, Y., Lee, S.D. (1996). Serum levels of IL 8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol*. 24:377-384.
- 32.** Iimuro, Y., Gallucci, R., Luster, M., Kono, H., Thurman, R. (1997). Antibodies to tumor necrosis factor α attenuate hepatic necrosis and inflammation due to chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*. 26:1530-1537.
- 33.** Jayatilleke, A., Shaw, S. (1998) Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol* 16: 119-123.
- 34.** Kaoru, T., Kirikae, T., Nakano, M. (1997) Lipopolisaccharide (LPS)-induced IL-6 production by embryonic fibroblasts isolated and cloned from LPS-responsive and LPS-hyporesponsive mice. *Mol Immunol*. 34:1147-1156.
- 35.** Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and NAC on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupffer cells. *Hepatology*. 27:1265-1274.
- 36.** Kelly, H., Darlington, J. (1989). Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. *In Vitro Cell Dev Biol*. 25:217-222.

- 37.** Klotz, U., Ammon, E. (1998). Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol.* 54:7-12.
- 38.** Krijt, J., Holsteijn, I., Vokurka, M., Blaboe, J. (1993). Effect of diphenyl ether herbicides and oxadiazon on porphyrin biosynthesis in mouse liver rat primary hepatocyte culture and HepG2 cells. *Arch of Toxicol.* 67: 255-261.
- 39.** Lakshminarayanan, V., Drab-Weiss, E.A., Roebuck, K.A. (1998). H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox responsive transcription factors AP-1 and NF κ B to the IL 8 promoter in endothelial and epithelial cell. *J Biol Chem.* 273(49):32670-8.
- 40.** Lands, W. (1995) Cellular signals in alcohol-induced liver injury: A Review. *Alcoholism Clin Exp Res.* 19:928-938.
- 41.** Li, C.P., Lee, F.Y., Tsai, Y.T., Lin, H.C., Lu, R.H., Hou, M.C., Wang, S.S., Lee, S.D. (1996). Plasma interleukin-8 levels in patients with post hepatic cirrhosis: relationship to severity of liver disease, portal hypertension and hyperdynamic circulation. *J Gastroenterol Hepatology.* 11: 635-640.
- 42.** Lieber, C.S. (1984). Alcohol and the liver, update. *Hepatology.* 4:1243-1260.
- 43.** Lindley, I.J.D. (1998). Interleukin-8. En: *Cytokines*, Academic Press. pp. 126-140.
- 44.** Locati, M., Murphy, P.M. (1999). Chemokines and chemokine receptors. Biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med.* 50: 425-440.
- 45.** Maher, J. (1995). Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol. *Am J Physiol.* Oct. 269(4 Pt 1):G518-23.
- 46.** Martínez-Brú, C., Gómez, C., Cortés, M., Soriano, G., Guarner, C., Planella, T., González-Sastre, F. (1999). Ascitic fluid interleukin-8 to distinguish spontaneous bacterial peritonitis and sterile ascitis in cirrhotic patients. *Clin Chem.* 45: 2027-2028.
- 47.** Mathurin, P., Deng, Q.G., Keshavarzian, A., Choudhary, S., Holmes, E.W., Tsukamoto, H. (2000). Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology.* 32:1008-1017.
- 48.** Mawet, E., Shiratori, Y., Hikiba, T., Takada, H., Shida, H., Okano, K., Komatsu, Y., Matsumura, M., Niwa, Y., Omata, M. (1995). Cytokine-induced neutrophil chemoattractant release from hepatocytes is modulated by kupffer cells. *Hepatology.* Vol 23 (2):353-358.
- 49.** McCuskey, R.S., Nishida, F., Eguchi, H., McDonnell, D., Baker, G.I., Ekataksin, W., Krasovich, M.A., Rudi, V., Seitz, H.K.,

- Urbscheck, B., Urbschek, R.(1995). Role of endotoxin in the hepatic microvascular inflammatory response to ethanol. *J Gastroenterol Hepatol.* 10:S18-24.
50. Mendenhall, D., Anderson, S., Weesner, R.E., Goldberg, S., Crolik, K.A. (1984). Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis. Veterans Administration Cooperative Study Group on alcoholic Hepatitis. *Am J Med.* 76:211-222.
 51. Niemelä, O. (1999). Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front Biosci.* 4:d506-513.
 52. Nolan, J., Camara, D., DeLissio, M., Feind, D., Gagliardi, N. (1986). IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet.* 8474:176-179.
 53. Nolan, J., Leibowitz, A., Vladatin, A. (1980). Influence of alcohol on Kupffer cell function and possible significance in liver injury. En: *The Reticuloendothelial System and Pathogenesis of liver disease*, editado por H. Liehr y M. Green. Amsterdam: Elsevier, p.125-138.
 54. Nolan, J.P.(1989). Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury, an idea whose time has come again. *Hepatology.* 10:887-91.
 55. Nomura, f., Pikkarainen, P., Jahhonen, P., Arai, M., Gordon, R.R., Barahona, E. (1983). Effect of ethanol administration on the metabolism of ethanol in baboons. *J Pharmacol Exp Ther.* 227: 78-83.
 56. Olivares, I.P., Bucio, L., Souza, V., Carabéz, A., Gutierrez-Ruiz M.C. (1997). Comparative study of damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in human fetal hepatic cell line. *Toxicology.* 120: 133-144.
 57. Porquet, D., Appel, M., Fournier, T., Bertaux, O., Biou, D., Féger, J. (1992). Evaluation of the hepatotoxicological effects of a drug in an in vivo/in vitro model. *Experientia.* 48:257-261.
 58. Pugh, R.N.H., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., Williams, R. (1973). Transection of the esophagus for bleeding and esophageal varices. *Br J Surg.* 60: 646-9
 59. Raetz, C.R.H. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 59:129-270.
 60. Riveros-Rosas, H., Julian-Sanchez, A. and Pina, E. (1997). Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res.* 28(4):453-71.
 61. Roe, A., Snawder, J., Benson, F., Roberts, D., Casciano, D.(1993). HepG2 cells: An in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* 190:15-19.

62. Schenker, S., Bay, M.K. (1995). Alcohol and endotoxin: another path to alcoholic liver injury. *Alcoholism Clin Exp Res* 19:1364-1366.
63. Schumann, R.R., Leong, S.R., Falggs, G.W., Gray, P.W., Weight, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-1431.
64. Schäfer, C., Greiner, B., Landing, J., Feil, E., Tatjana-Schütz, E., Bode, C., Bode, J.C. (1997). Decreased endotoxin-binding capacity of whole blood in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 26:567-573.
65. Sheron, N., Bird, G., Koskinas, J., Portmann, B., Ceska, M., Lindley, I., Williams, R. (1993). Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology.* 18: 41-46
66. Sheron, N., Ceska, M., Lindley, I., Williams, R. (1992). Ethanol supresses in vitro interleukin 8 synthesis production in HepG2 cells. *J Hepatol.* 16 (suppl 1): S61.
67. Shibayama, Y., Asaka, S., Nakata, K. (1991). Endotoxin hepatotoxicity augmented by ethanol. *Exp Mol Pathol.* 55: 196-202.
68. Shiratori, Y., Takada, H., Hikiba, Y., Nakata, R., Okano, K., Komatsu, Y., Niwa, Y., Matsumura, M., Shiina, S., Omata, M., Kamii, K. (1993). Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology.* 18: 1477-82.
69. Simpson, K.S., Lukacs, N.W., Colleti, L., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. (1997). Cytokines and the liver. *J Hepatol* 27:1120-1132.
70. Sormenan, R., Eskelinen, S., Lehto, V. (1993). Bile canaliculus formation in cultures HepG2 cells. *Laboratory Invest.* 68:652-662.
71. Stahnke, L., Hill, D., Allen, J. (1991). TNF α and IL 6 in alcoholic liver disease. En: *Cells of the hepatic sinusoid*. Editado por E. Wisse, D., Knook, y R.S. McCuskey. Leiden. Noruega: Kupffer Cell Foundation, p. 472-475.
72. Storey, E.L., Anderson, G., Mack, U., Powell, L.W., Halliday, J. (1987). Desialylated transferrin as a serological marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet.* 1:1292-1293.
73. Su, G.L., Rahemtulla, A., Thomas, P., Klein, R.D., Wang, S.D., Nanji, A.A. (1998). CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol* 152:841-849.
74. Tabakoff, B., Hoffman, P., Lee, J., Saito, T., Willard, B., Leon-Jones, F. (1988). Differences in platelet enzyme activity between alcoholics and non-alcoholics. *N. Engl. J. Med.* 318:134-139.

- 75.**Thiele, D. (1989). Tumor necrosis factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology*. 9:497-499.
- 76.**Thornton, A., Strieter, R.M., Lindley, I., Baggiolini, M., Kunkel, S.L.(1990). Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/ IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol*. 144: 2609-13.
- 77.**Thornton, A., and Kunkel, S.L.. (1991). Kupffer cell—derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, IL 8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures. *Hepatology*. 14 (6):1112-1122.
- 78.**Thurman, R. (2000). Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Can J Gastroenterol*. Vol. 14 Suppl D. : 129D-135D.
- 79.**Tietze, F.(1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem*. 27: 502-522.
- 80.**Visser, O., Koole-lesuis, H., Voortman, G., Wilson, J. (1991). Porphyrin synthesis by human hepatocytes and HepG2 cells effects of enzyme inducers and delta-aminolevulinic acid. *Toxicology*. 67:75-83.
- 81.**Wang, J., Greenberg, S.S., Spitzer, J.J. (1995). Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharyde. *Alcoholism Clin Exp Res*. 19:387-393.
- 82.**Wang, S., Pessah, M., Infante, J., Catala, D., Salvat, C., Infante, R. (1988). Lipid and lipoprotein metabolism in HepG2 cells. *Bioch Biophys Acta*. 961:351-363.
- 83.**Wöndermann, M., Fandrey, J. and Jelkmann, W. (1998). Tumor necrosis factor α production by human hepatoma cell lines is resistant to drugs that are inhibitory to macrophages. *J Interferon Cytokine Res*. 18:1069-1075.
- 84.**Wright , S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complex of lipopolisaccharyde (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 249: 1431-1433.
- 85.**Yamada, S., Mochida, S., Ohno, A., Hirata, K., Ogata, I., Ohta, Y., Fujiwra K. (1991). Evidence for enhanced secretory function of hepatic macrophages after long-term ethanol feeding in rats. *Liver* 11:220-224.
- 86.**Yoshida, A., Rzhetski, A., Hsu, L.C., Chang, C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem*. 251:549-557.