

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO GENERADO POR
EL METABOLISMO DE ETANOL EN LÍNEAS CELULARES
HEPÁTICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA
BIOL. EXP. ARGELIA VALDES ARZATE

DIRECTORA:
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

ASESORAS:
DRA. MARIA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ
DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

29/NOV2006

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
lebo@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
vchagoya@ifc.unam.mx

ASESORA

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

Este trabajo de Investigación fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, con número de registro: 309-0. Pertenece al Posgrado en Biología Experimental, forma parte de los Programas de PIFOP-CONACyT, clave C/PFPN-2002-35-32.

Para la realización de la Maestría en Biología Experimental la Bióloga Experimental Argelia Valdes Arzate contó con el apoyo del CONACyT mediante la beca con No. de registro 176178, la cual fue otorgada durante el periodo 2003-2004.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Determinación del daño oxidativo generado por el metabolismo de etanol en líneas celulares hepáticas”, con fecha de examen oral el día 29 de Noviembre del 2006.

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretaria

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz por dejarme pertenecer a su Laboratorio, por sus valiosos consejos y por ser un ejemplo a seguir. Esperando corresponder algún día a la confianza y el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Leticia Bucio Ortiz y al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, por sus valiosos consejos y la ayuda incondicional que siempre me han otorgado.

A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por las valiosas aportaciones que realizo a este trabajo.

A mi Esposo José Dolores Ibarra por su incondicional apoyo, comprensión y paciencia que me ha tenido siempre, por impulsarme y animarme a seguir adelante.

A mi madre Argelia Gloria Arzate Nava por ayudarme y apoyarme en todo momento, sin pedir nada a cambio.

A mi hijo Paco, por ser alguien trascendental en mi vida, por toda la paciencia y amor que siempre me ha dado.

A mis amigos Leticia González, Haydee González, Hilda Medina, Hugo López, Armando Luna, Juan Manuel Villa por apoyarme y ofrecerme su amistad incondicional.

A mis compañeras del Laboratorio de Fisiología Celular de la UAMI. Dra. Elizabeth Hernández, Dra. Verónica Souza, M en B.E. Carmen Escobar, M en B.E. Blanca Farfán, por auxiliarme en todo momento.

ÍNDICE

	Página
Resumen	9
Abstract	11
I INTRODUCCIÓN	12
I.1 Metabolismo de etanol	12
I.2 Alcohol deshidrogenasa	13
I.3 Citocromo P450 2E1 (CYP2E1)	14
I.4 Estrés oxidativo y CYP2E1	15
I.5 Glutación y glutación peroxidasa	16
I.6 Superóxido dismutasa	17
I.7 Mitocondria y estrés oxidativo	17
II ANTECEDENTES	18
III OBJETIVOS	22
III.1 Objetivo general	22
III.2 Objetivos particulares	22
IV HIPÓTESIS	23
V MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1 Cultivo celular	23
V.2 Diseño experimental	24
V.3 Viabilidad celular	24
V.4 Producción de peróxidos	25
V.5 Contenido de glutación reducido celular	26

V.6 Contenido de glutatión reducido mitocondrial	26
V.7 Determinación de la lipoperoxidación	27
V.8 Actividad de la superóxido dismutasa total	28
V.9 Determinación de la concentración de proteína	29
V.10 Análisis estadístico	30
VI RESULTADOS	31
VI.1 Viabilidad celular	31
VI.2 Producción de especies reactivas de oxígeno	33
VI.3 Grado de lipoperoxidación	35
VI.4 Actividad de la superóxido dismutasa	37
VI.5 Contenido de glutatión reducido celular y mitocondrial	39
VII DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	48
IX REFERENCIAS	51

RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: Las enfermedades hepáticas ocupan la quinta causa de muerte en nuestro país y un 50% es debido a la ingesta crónica de etanol (EtOH) siendo un problema de salud pública, por lo que es importante conocer el daño producido por el metabolismo de etanol (EtOH). Este daño está asociado en parte a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o una disminución de los mecanismos celulares de defensa antioxidantes dando como resultado estrés oxidativo. Las ERO pueden interactuar con las proteínas, los lípidos y el ADN causando daño celular que puede incluso ocasionar la muerte celular. El EtOH es oxidado por distintos sistemas enzimáticos, la alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P450 (CYP2E1) y la catalasa, este último contribuye con solo el 2%. En todos los casos se produce acetaldehído, producto más tóxico que el propio EtOH. Estudios *in vitro* del metabolismo de EtOH han presentado problemas para su realización, ya que los cultivos primarios de hepatocitos pierden en poco tiempo la capacidad de oxidar el EtOH, y líneas celulares hepáticas como la HepG2 carecen de dicha actividad. Por ello varios grupos de investigación han desarrollado sistemas *in vitro* con la capacidad de oxidar el EtOH. En el presente trabajo se utilizaron células HepG2 transfectadas con el gen de la ADH y del CYP2E1 (VL-17A) o bien sólo con el gen de la ADH (VA-13), con la finalidad de comparar el daño oxidativo producido por el metabolismo del EtOH en las líneas celulares hepáticas. METODOLOGÍA: Cuantificación de la viabilidad celular por el método de MTT. La producción de las ERO en las células se determinó por la fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) en presencia de

peróxidos. El grado lipoperoxidación (LPO) se cuantificó mediante la formación de malondialdehído (MDA). La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y el contenido del glutatión reducido (GSH) celular y mitocondrial determinados por métodos espectrofotométricos. RESULTADOS: Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de EtOH (50-500 mM) por 24 h, encontrando que a 50 y 100 mM de EtOH, los tres tipos celulares presentaron una viabilidad del 87 al 97% con respecto al control. A concentraciones mayores de EtOH la viabilidad disminuyó drásticamente hasta un 60%. Se eligió la concentración de 100 mM EtOH para los siguientes experimentos. Las células VA-13 y HepG2 no presentaron cambios en la producción de peróxidos, mientras las células VL-17A tratadas con EtOH mostraron un aumento de 2 veces en la formación de peróxidos. Las células VA-13 y HepG2 no presentaron un incremento en el daño lipoperoxidativo. Sin embargo, las células VL-17A presentaron 4 veces más, este parámetro y disminuyó la actividad de la SOD un 20%, mientras los otros tipos celulares no mostraron diferencias. El contenido de GSH celular no tuvo cambio en los tres tipos celulares, en contraste el contenido de GSH mitocondrial disminuyó en un 50% en las células VL-17A. CONCLUSIÓN: Los resultados muestran que cuando el EtOH es metabolizado por el sistema CYP2E1 se generan las ERO, ocasionando daño celular por el estrés oxidativo, lo cual no sucede cuando la oxidación es por la enzima ADH, lo cual explica, en parte, el daño generado durante la ingesta crónica de etanol.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The hepatic diseases occupy the fifth cause of death in our country, and a 50% are due to the chronic ethanol intake (EtOH) being a problem of public health. The EtOH is oxidized by different enzymatic systems, the alcohol dehydrogenase (ADH), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and catalase, this last one contributes just by 2%. The EtOH-induced liver damage is driven mainly by alcohol metabolites such as acetaldehyde and reactive oxygen species (ROS). The ROS generates oxidation on lipids, proteins and DNA, inducing cellular dysfunction and eventually cell death which lead organ failure. Studies on primary hepatocytes are limited by an accelerated loss of Cyp2E1 and ADH activities so, stable cells lines transfected with these enzymes are required to understand the mechanism of alcohol-induced liver damage. The aim of this study was to address the differences in the oxidative damage due two cells lines, recombinant HepG2 cells, to overexpressing of ADH gene (VA-13), another which express ADH and Cyp2E1 genes (VL-17A cells). **METHODS:** Quantification of the cellular viability by the MTT assay, peroxides quantification was performed by DCF fluorescent-FACS flow, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione levels and lipid peroxidation (LPO) product (malondialdehyde, MDA) were measured spectrophotometrically. **Results:** The cells were exposed to different concentrations from EtOH (50-500 mM) by 24 h, finding that to 50-100 mM of EtOH the three cellular types displayed viability from the 87-97% with respect to the control. To greater concentrations of EtOH the viability decreased drastically until a 60%. The next experiments of the cells were treated with 100 mM EtOH during 24 h, Only VL-17A cells responded to EtOH treatment increasing production of peroxides and 4-fold more of MDA, this result was correlated with a decrease in mitochondrial GSH (50%) and SOD activity (20%). **Conclusion:** Our data have revealed that Cyp2E1 is required for ethanol-induced damage. Therefore, the accumulation of CYP2E1 induced by ethanol consumption might play important role in alcohol liver damage.

I INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades hepáticas ocupan la quinta causa de muerte en nuestro país. En 1999 se reportaron 27,040 decesos por esta causa, de los cuales 13,417 fueron producidos por el consumo de etanol (EtOH) (DGEI, Secretaría de Salud, 2001).

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) se caracteriza en fases tempranas por esteatosis, inflamación y necrosis; mientras que en fases avanzadas por fibrosis, cirrosis y/o cáncer. Los diferentes tipos celulares hepáticos están involucrados en el inicio y progresión de esta enfermedad, entre ellos juegan un papel importante los hepatocitos, las células de Kupffer y las células estelares (Arteel, 2003).

I.1 METABOLISMO DEL ETANOL.

El hepatocito es el responsable de la oxidación del EtOH, así como del metabolismo de la gran mayoría de fármacos, metabolitos endógenos y xenobióticos que están presentes en la circulación (Lieber, 2000). En esta célula existen tres sistemas metabólicos capaces de oxidar al EtOH: la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema oxidativo microsomal de EtOH (MEOS por sus siglas en inglés *Microsomal Ethanol Oxidizing System*) y en menor proporción por la catalasa (fig. 1). En los tres sistemas se sigue el mismo patrón de oxidación del EtOH en acetaldehído (Ac) y posteriormente en acetato.

El Ac es un metabolito muy tóxico, el cual se une covalentemente con

proteínas formando aductos, generándose la inactivación de las proteínas, lo que impacta en la disminución de la reparación del ADN, en la producción de neoantígenos y en la disminución de los sistemas antioxidantes (Lieber, 2000).

La oxidación del EtOH por la catalasa es el menos utilizado, únicamente el 2% de EtOH se metaboliza por este sistema. La oxidación de una molécula de EtOH en Ac está acoplada con la descomposición de una molécula de H_2O_2 en agua (Rivero-Rosas, 1997).

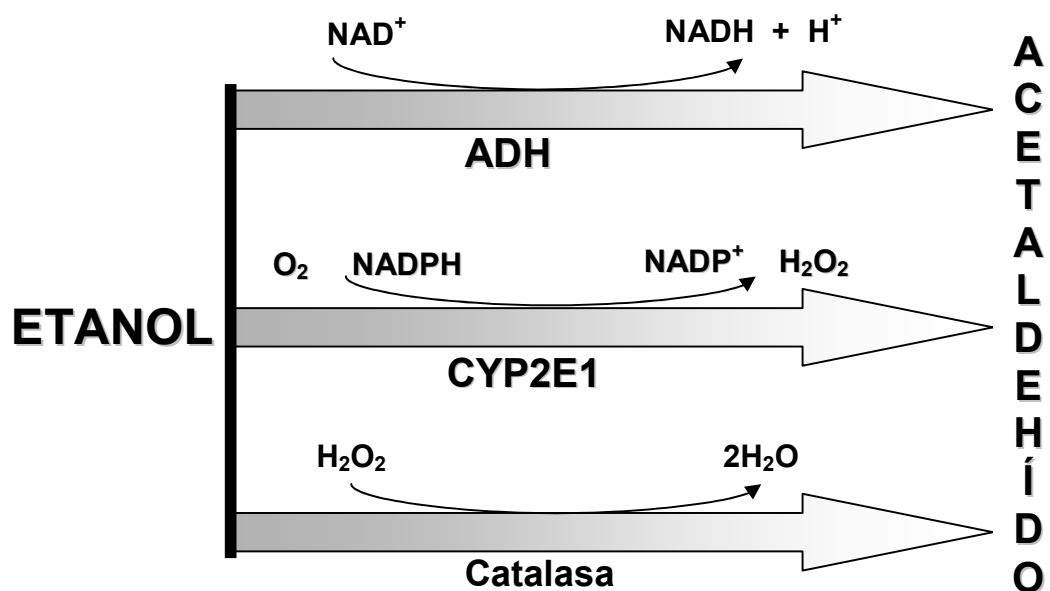


Figura 1. Representación de los tres sistemas metabólicos que oxidan el etanol en acetaldehído: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P4502E1 (CYP2E1) y la catalasa

I.2 ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH).

La enzima ADH promueve la oxidación de EtOH en Ac, reacción acoplada con la reducción del dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD^+) (Rivero-Rosas,

1997). En la mitocondria el Ac se convierte en acetato por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH).

Las enzimas ADH de mamíferos se encuentran en el citosol; existen diferentes isoenzimas clasificadas dentro de 6 categorías, las cuales tienen un 20% de homología y están codificadas por 7 genes distintos. Todas estas isoenzimas usan NAD^+ como aceptor de electrones, para catalizar la oxidación de EtOH a Ac (Rivero-Rosas, 1997).

I.3 CITOCROMO P450 2E1 (CYP2E1).

El citocromo P450 2E1 (CYP2E1) es un sistema inducible, que se localiza en el retículo endoplásmico (RE). El metabolismo de EtOH está acoplado a la oxidación de NADPH para la reducción de una molécula de oxígeno y la formación de peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Guengerich, 1992).



El CYP2E1 es un complejo enzimático constituido por una flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa y una hemoproteína conocida como citocromo P450 (CYP). El término citocromo P450 se refiere al espectro de absorción cerca de 450 nm, lo cual es una característica del grupo hemo (Coon, 1992).

En los tejidos de mamíferos se encuentran los citocromos P450 de forma ubicua y se encuentran en varios organelos, predominantemente en el RE y en la

mitocondria. El CYP2E1 en los hepatocitos además de oxidar al EtOH tiene la capacidad de metabolizar compuestos como la acetona, los alcoholes de cadena corta, el tetracloruro de carbono, el acetaminofen, entre otros (Koop, 1992).

El CYP2E1 es responsable del metabolismo acelerado del EtOH en la ingesta crónica. En investigaciones iniciales se observó que las ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en EtOH presentaban un incremento del RE debido a la inducción del CYP2E1, acompañado por aumento en la oxidación de NADPH, dando como resultado mayor producción del radical superóxido (O_2^{\bullet}), del H_2O_2 y del radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Guengerich, 1992. Kaplowitz, 2000).

El $\bullet OH$ es una molécula altamente reactiva e inestable, que ocasiona daño oxidativo en ADN, proteínas y lípidos. El daño en lípidos de membrana es conocido como lipoperoxidación (LPO) el cual puede producir una reacción en cadena y producir radicales lipídicos, así como aldehídos reactivos como malondihaldehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE).

I.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y CYP2E1.

Por lo tanto un incremento en la actividad del CYP2E1 genera estrés oxidativo, término que se define como un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el O_2^{\bullet} y el $\bullet OH$ (fig.2), y/o una disminución en los mecanismos de defensa antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSHPx), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, así como de los no enzimáticos: α -tocoferol y glutatión (GSH), entre otros (Rojkind, 2001. Arteel, 2003. Dey, 2006).

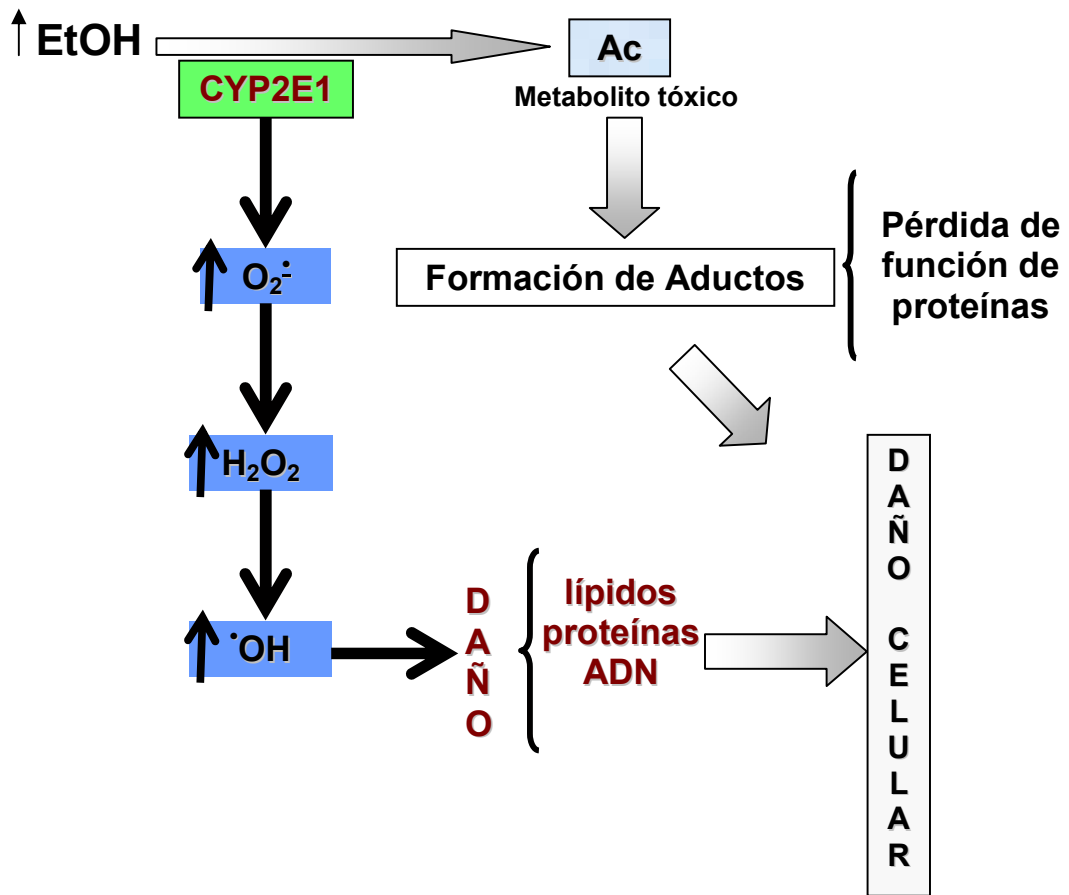


Figura 2. Formación de las especies reactivas de oxígeno, por un aumento de la oxidación del EtOH por el CYP2E1.

I.5 GLUTATIÓN Y GLUTATIÓN PEROXIDASA

El GSH es un tripéptido que se encuentra ampliamente distribuido en las células, entre un 80-85% del total de GSH celular se encuentra en el citosol, donde es sintetizado y es transportado a la mitocondria. El GSH reducido es requerido como cofactor por la GSHPx, esta enzima convierte el H₂O₂ en agua (Fernández-Checa, 1998). En la reacción participan dos moléculas de GSH que ceden dos protones formando el glutatión oxidado (GSSG) por medio de un enlace disulfuro. El GSSG se regenera por la enzima GSH reductasa (GSHRd) en

presencia de NADPH.

I.6 SUPERÓXIDO DISMUTASA.

Existen tres tipos de SOD; en el citosol, en la mitocondria y en la matriz extracelular. La SOD1 del citosol y la SOD3 de la matriz extracelular, son un homodímero que contiene un átomo de Cu y un átomo de Zn por subunidad monomérica; la enzima que se localiza en la matriz mitocondrial es un homotetrámero, contiene un átomo de Mn por subunidad (SOD2). Estas enzimas convierten el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 (Rojkind, 2002. Winterbourn, 1975).

Además, el hígado contiene antioxidantes de bajo peso molecular como la vitamina C y la vitamina E, estos actúan de manera cooperativa atrapando compuestos electrofílicos (Kaplowitz, 2000. Arteel, 2003).

I.7 MITOCONDRIA Y ESTRÉS OXIDATIVO.

La mitocondria tiene la capacidad de generar las ERO como un sub-producto de la cadena respiratoria originando el $O_2^{\bullet -}$ el cual puede ser precursor del H_2O_2 , que a su vez genera especies más tóxicas como el $\bullet OH$; sin embargo, la producción de las ERO es controlada por sistemas antioxidantes como el GSH mitocondrial y la SOD2 (Kaplowitz, 2000. Hoek, 2002). En condiciones normales existe un balance entre las ERO y los mecanismos de defensa antioxidantes, un desbalance deteriora su función y conduce a la muerte celular por apoptosis (Hoek, 2002. Bai, 2003).

La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por encogimiento citoplasmático, condensación de la cromatina y fragmentación celular (cuerpos apoptóticos). Los eventos bioquímicos que se desencadenan, incluyen la translocación de fosfatidilserina a la parte externa de la membrana plasmática, activación de caspasas, transición en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT por sus siglas en inglés *mitochondrial permeability transition*), liberación del citocromo c (Cit-c) al citoplasma y fragmentación del ADN (Bai, 2003).

II ANTECEDENTES.

Varios estudios *in vitro* relacionados con el metabolismo de EtOH, han presentado problemas para su realización, ya que los cultivos primarios de hepatocitos pierden la capacidad de metabolizar el EtOH en poco tiempo, mientras que las líneas celulares hepáticas como la HepG2 carecen de dicha actividad. Por lo que otros grupos de investigación han desarrollado sistemas *in vitro* con la capacidad de oxidar el EtOH.

Clemens y cols. (2002) transfectaron células HepG2 con un plásmido pVL-2 que contiene una copia de ADNc del gen murino de la enzima ADH (*adh-1*) ésta línea se denominó VA-13. En esta línea se demostró la producción de Ac por la oxidación del EtOH mediado por la ADH (Clemens, 2002).

Por otro lado, en otro estudio Donohue (2006) transfectaron las células HepG2 con el gen murino de la *adh* y otro con el gen humano del *cyp2e1*. Las células resultantes fueron denominadas como VL-17A, las cuales tuvieron

actividad enzimática específica de la ADH y del CYP2E1 comparables con los hepatocitos recién aislados. Las células fueron tratadas con 100 mM de EtOH durante 72 horas esto incremento la actividad de caspasa-3 un indicador de apoptosis, esta actividad no se encontró alterada en las células HepG2 con el mismo tratamiento. Las células VL-17A al ser tratadas con 100 mM de EtOH generaron 2.5 veces más de Ac en comparación con un tratamiento de 25 mM de EtOH. Un inhibidor del CYP2E1 el DAS causo una reducción del 41% en la formación de Ac durante la exposición con EtOH, comparadas con las células sin tratamiento (Donohue, 2006).

Estudios en las células VA-13 mostraron que el metabolismo de EtOH genero citotoxicidad y reduciendo la síntesis de ADN. Por otro lado, el EtOH provocó el arresto del ciclo celular en G2/M en éstas mismas células (Clemens, 2002, 2003).

En un estudio con células HepG2 transfectadas con el gen *cyp2e1* (HepG2-E9) un tratamiento con EtOH, ocasiono cambios morfológicos en el citoplasma y en el núcleo, provocando la muerte por apoptosis. Por otra parte, reportaron que la proteína Bcl2 previene el efecto dañino producido por el EtOH (Wu; 1999). La línea celular E47 que sobreexpresa el CYP2E1 fue más sensible a la toxicidad y a la apoptosis inducida por el EtOH, así como, por el ácido araquidónico y el fierro (Marí, 2002).

En un modelo murino de la EHA fue reportado que el EtOH indujo la acumulación hepática de aductos de MDA y del HNE, así como, una disminución de la capacidad antioxidante, por la inducción de la LPO, ocasionando deterioro

hepático. Este efecto fue prevenido por la administración de un antioxidante como el N-acetilcisteína (NAC), disminuyendo el daño hepático causado por el tóxico, por reducción de la LPO y un aumento en el contenido de GSH en este modelo (Ronis, 2005).

En un estudio *in vitro* donde utilizaron la línea celular WIF-B, altamente diferenciada, siendo el resultado de un híbrido de hepatoma de rata y fibroblasto humano, las cuales expresaban el CYP2E1 y la ADH. Estas células mostraron cambios morfológicos y fisiológicos en respuesta al tratamiento con EtOH (Schaffert, 2004).

El tratamiento con 25 mM de EtOH en las células VL-17A altero el estado redox celular, dando respuestas similares a las células VA-13, esto se debe a la expresión de la ADH en ambos tipos celulares. Sin embargo, el incremento de la concentración de EtOH (100mM) causo mayor daño por la inducción del CYP2E1 (Donohue, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el GSH mitocondrial es un importante mecanismo de defensa, ya que se ha demostrado que la exposición crónica con el EtOH produce estrés oxidativo, por una disminución importante y selectiva (aproximadamente entre un 45-65%) en la concentración de GSH mitocondrial, debido a la alteración del transporte de GSH desde el citosol a la matriz mitocondrial. Dicho defecto, determina una mayor susceptibilidad de los hepatocitos al EtOH, generando estrés oxidativo letal por la disminución mitocondrial de GSH (García-Ruiz, 1995).

A pesar de que se han realizado varias investigaciones para establecer el

daño hepático por el metabolismo de EtOH, se necesita explorar más a fondo cómo se regulan los procesos de daño oxidativo producido por el metabolismo del EtOH y así proponer nuevas alternativas para contrarrestar el daño causado por él. Las células VL-17A y VA-13 son excelentes modelos experimentales para investigar el daño celular hepático inducido por el metabolismo de EtOH.

Para el presente estudio se utiñizaron las células VL-17A y las células VA-13, estas líneas celulares fueron producidas y donadas a nuestro laboratorio, por el Dr. Dahn L. Clemens (Department of Internal Medicine of the University of Nebraska Medical Center y Department of Veterans Affaire Medical Center, Omaha, Nebraska) (Donohue, 2006). Además, se utilizaron las células HepG2 que no oxidan el EtOH, la cual es derivada de un hepatoblastoma humano, las cuales se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA),

III OBJETIVOS.

III. 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño celular generado por el metabolismo del etanol debido a la actividad del CYP2E1 y de la ADH.

III. 2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1 Estimar el efecto del metabolismo de EtOH en la viabilidad celular en sistemas *in vitro* que metabolizan el EtOH.
- 2 Determinar el estrés oxidativo generado por el metabolismo de etanol, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y niveles de glutatión reducido.
- 3 Valorar el efecto del metabolismo del etanol en diferentes tipos celulares en la actividad de la enzima superóxido dismutasa.
- 4 Evaluar los niveles de lipoperoxidación producidos como resultado del metabolismo del etanol en las células VL-17A, VA-13 y HepG2.

IV HIPÓTESIS.

Si el metabolismo del etanol ocasiona daño celular por el estrés oxidativo, entonces, las células HepG2 transfectadas con la enzima ADH y el CYP2E1 (VL-17A) presentarán mayor daño oxidativo producido por la oxidación de EtOH que las células HepG2 transfectadas sólo con la enzima ADH (VA-13).

V MATERIALES Y MÉTODOS.

V.1 CULTIVO CELULAR

Las células HepG2, VA-13 y VL-17A se cultivaron en medio William's, el cual se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB, Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Microlab). A este medio se le llamó medio W-completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, Acton, MA, EUA). Las células se resembraron a una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma) previo lavado con un buffer salino de fosfatos (PBS). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37°C. Después de este tiempo se procedió a realizar los experimentos posteriormente mencionados. Se utilizaron células tratadas con diferentes tóxicos, como controles positivos.

V.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se sembraron las células en cajas Petri (Corning) con medio W-completo. Se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Posteriormente se cambió el medio por uno libre de SFB y conteniendo una concentración 100 mM de EtOH (J.T. Baker) o células sin tratamiento. Las cajas fueron selladas con parafilm para evitar la evaporación del EtOH.

Terminado el tiempo del tratamiento los medios fueron retirados, y las células se emplearon en las diferentes pruebas: viabilidad celular por la técnica de MTT, producción de peróxidos por citometría de flujo, lipoperoxidación por producción de MDA, GSH celular y mitocondrial por el método de Tietze, y la actividad de la enzima superóxido dismutasa. Todos los tratamientos se aplicaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico.

V.3 VIABILIDAD CELULAR (PRUEBA DE MTT).

Se determinó la viabilidad celular utilizando la prueba de MTT por el método de Mosmann (1983), la cual se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la mitocondria de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) soluble en agua (amarillo), a formazán (azul) insoluble en agua. Se sembraron 200,000 células/pozo en multicámaras de 24 pozos (Nunc) con medio W-completo, dejándolas crecer por 24 h a 37°C. Concluido este tiempo, las células se lavaron con PBS y fueron tratadas por 24 h a diferentes concentraciones de EtOH: 50, 100, 200, 300 y 500 mM en medio sin SFB. Pasado éste tiempo, las células se lavaron con PBS y se les adicionó una solución de 0.5 mg/ml de MTT

en PBS. La incubación fue de 3 h a 37°C, terminado este tiempo, las células se lavaron con PBS y se les agregó 500 µl de una solución de HCl 0.04 N en 2-isopropanol, durante 15 min, se agitaron las placas para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se determinó a 570 nm en un espectrofotómetro. La viabilidad se determinó por el porcentaje de cambio de coeficiente de extinción del MTT con respecto al control. Para los siguientes experimentos se decidió utilizar la concentración 100 mM de EtOH.

V.4 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDOS.

La producción de las ERO fue determinada indirectamente por la fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF). La técnica se basa en la oxidación del 2,7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA, Molecular Probes, USA), el cual no es fluorescente y en presencia de peróxidos en las células se convierte en DCF (producto verde fluorescente). Se sembraron 1×10^5 células por caja Petri (Corning) con medio W-completo, dejándolas crecer por 24 horas, después de este tiempo las células fueron tratadas con EtOH. Al término del tratamiento, el medio fue retirado, se lavaron las células con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA al 25%. Posteriormente, el DCF-DA se adicionó a las células a una concentración final de 20 µM por 30 min a 37°C en obscuridad. Inmediatamente la fluorescencia de DCF se determinó en un citómetro de flujo (Escalibur) a 529nm/503nm (emisión/excitación). Se utilizaron células tratadas con antimicina A (AA) como control positivo (Román, 1999) a una concentración de 15 µM por 24 h.

V.5 CONTENIDO DE GLUTATIÓN REDUCIDO CELULAR.

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

Se sembraron 1.5×10^6 células en botellas de cultivo de 25 cm^2 con medio W-completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, posteriormente las células fueron tratadas con el tóxico. Al término de la incubación con el tratamiento, el medio fue retirado, se lavaron las células con PBS y se levantaron con un gendarme de goma en 0.6 ml de PBS. De este volumen se tomó 0.1 ml para la determinación de proteína y el volumen sobrante se utilizó para la determinación de grupos tioles. A la 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 de ácido tricloroacético (TCA) al 5% agitándose durante 5 min. Se centrifugó a 3000 g por 15 min a 4°C . Se tomó 0.2 ml del sobrenadante para la determinación de GSH total y se le agregó 2.5 ml de PBS, 0.8 ml de EDTA 1 mM y 0.030 ml de DNTB, la mezcla se agitó y la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro a 412 nm de longitud de onda. El contenido de GSH se reportó en nanomoles GSH/mg de proteína (Tietze, 1969).

V.6 CONTENIDO DE GLUTATIÓN REDUCIDO MITOCONDRIAL.

Para la obtención de GSH mitocondrial se sembraron 5.0×10^6 células en botellas de cultivo de 75 cm^2 con medio W-completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, posteriormente las células fueron tratadas con 100 mM de EtOH durante

24 h. Al término de la incubación con el tratamiento, el medio fue retirado, se lavaron las células con PBS y se levantaron con un gendarme de goma en 0.60 ml de PBS. De este volumen se tomó 0.1 ml para la determinación de proteína y el resto se utilizó para la determinación de grupos tioles. En microtubos de 1.5 ml se le agregó 100 μ l de TCA al 10 %, con mucho cuidado se le adicionó una solución de parafina: silicona (1:5). Lentamente, por las paredes del tubo se dejó resbalar 100 μ l de digitonina, esto fue para que se formará una bolita de digitonina en la solución de parafina:silicona. Las células resuspendidas en 0.5 ml en se colocaron con gran cuidado dentro de la bolita de digitonina y se incubó por 1 min a temperatura ambiente, inmediatamente, se centrifugó a 14,000 rpm, durante 2 min a 4°C. Pasado este tiempo, se formaron 3 fases en el microtubo. La primera fase, era la fracción citosólica, la fase intermedia correspondió a los organelos, y la tercera fase fue la fracción mitocondrial, se recuperaron 75 μ l y se colocó en un microtubo el cual contenía 75 μ l de PBS, esta mezcla se mantuvo en hielo, hasta la cuantificación de GSH mitocondrial por el método de Tietze (1969). El contenido de GSH mitocondrial se reportó en nanomoles GSH/mg de proteína.

V.7 DETERMINACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

El grado de LPO se determinó por el método de Buege y Aust (1978), el cual se basa en la formación de MDA en presencia de ácido tiobarbitúrico. Se sembraron 4×10^6 células en botellas de cultivo de 75 cm² con medio W-completo, se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, después de este tiempo las células fueron

tratadas con EtOH 100 mM o con butil-sulfoxamina (BSO) 0.01mM durante 24 h como control positivo (Marí, 2002). Pasado este tiempo se lavaron las células con PBS para retirar los tratamientos, las células se levantaron con un gendarme de goma y se resuspendieron en 1 ml de PBS. De este homogenado se tomaron 50 μ l para la determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry (1951). A las muestras se les adicionaron 2 ml de una solución reactiva compuesta de TCA-ácido tiobarbitúrico- ácido clorhídrico (TCA-TBA-HCl) en una proporción de 15%:0.375%:0.25 N respectivamente. Las muestras se agitaron y se incubaron en un baño de agua a 100°C durante 30 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 15 min. Pasado este tiempo se centrifugó a 1000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante para la determinación de la absorbancia a 534 nm contra un blanco de TCA-TBA-HCl.

Se determinó la concentración de MDA empleando el coeficiente de extinción molar (E) de 1.56×10^5 /M cm y se aplicó la fórmula de:

$$C = A/EI$$

Donde: A = absorbancia, I = grosor de la celda.

Los resultados se reportaron en nmol de MDA / mg de proteína.

V.8 ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA TOTAL.

La actividad de la SOD total se determinó empleando el método de Winterbourn (1975). Se utilizaron células tratadas con 5 μ M de CdCl₂ como control positivo por 4 h (Escobar, 2002). En una serie de tubos de ensayo se preparó la

mezcla de reacción que estaba formada por la muestra en diferentes volúmenes que fueron desde 5 hasta 300 μ l, 0.2 ml de EDTA 0.1 M, 0.1 ml de tetrasolio-nitro azul (NBT) 1.5 mM y PBS, obtuvimos un volumen final de 0.3 ml. Los tubos se colocaron en una cámara iluminada con lámparas fluorescentes de 15 W por un periodo de 10 min. Pasado este tiempo se les agregó a los tubos 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM y se incubaron en la misma cámara por 20 min, al final de este tiempo las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 560 nm de longitud de onda.

Se determinó el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT para calcular el volumen que proporcione la mitad de la máxima inhibición por la enzima. La actividad se determino por la siguiente relación:

$$\text{Unidades} = 1,000,000 / \text{vol que resulto de la mitad de la máxima inhibición}$$

Los resultados fueron reportados como mU/mg de proteína.

V.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

La concentración de proteína de cada muestra, se determinó por el método de Lowry (1951). Se preparó una solución de carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.1 N y tartrato de sodio-potasio al 0.02%, otra solución con sulfato de cobre al 0.5%, se mezclaron ambas soluciones 50:1 y se le denominó solución C. Las muestras alicuotadas se les agregó 5 ml de la solución C y 0.5 ml de fenol-folin-cioalceu 1 N y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado este tiempo se determinó el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 500

nm. Para determinar la concentración de proteína de las muestras, se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina a concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 mg/ml.

V.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un 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 $p \leq 0.05$.

VI RESULTADOS

VI.1 VIABILIDAD CELULAR.

Se evaluó la viabilidad de las células HepG2, VA-13 y VL-17A en presencia de EtOH por el método del MTT. En la figura 1 se muestra el porcentaje de viabilidad de los tres tipos celulares en presencia de diferentes concentraciones de EtOH, con un tiempo de exposición de 24 h con respecto a las células control. Las células HepG2 en la figura 1-A, presentaron una alta viabilidad incluso a concentraciones de 200 mM de EtOH, disminuyendo ésta a medida que se incrementa la concentración del tóxico, apreciándose una reducción significativa en la viabilidad con 500 y 1000 mM de EtOH (fig.1-A).

Las células VA-13 y las VL-17A presentaron un comportamiento dosis dependiente, al incrementarse la concentración del tóxico, se acrecentó la muerte celular (fig.1-B, 1-C). Existió una reducción significativa de la viabilidad celular de 44.14 y 63.68 % a concentraciones de 200 y 500 mM de EtOH respectivamente, comparadas con las células sin tratamiento (fig.1-B).

La exposición de las células VL-17A a concentraciones de 50 y 100 mM de EtOH mostraron una viabilidad alta de aproximadamente del 90% contrastadas con las células control. A concentraciones mayores de 100 mM de EtOH, existe una reducción de más del 60% de la viabilidad celular presentando valores estadísticamente significativos con respecto al control (fig. 1-C).

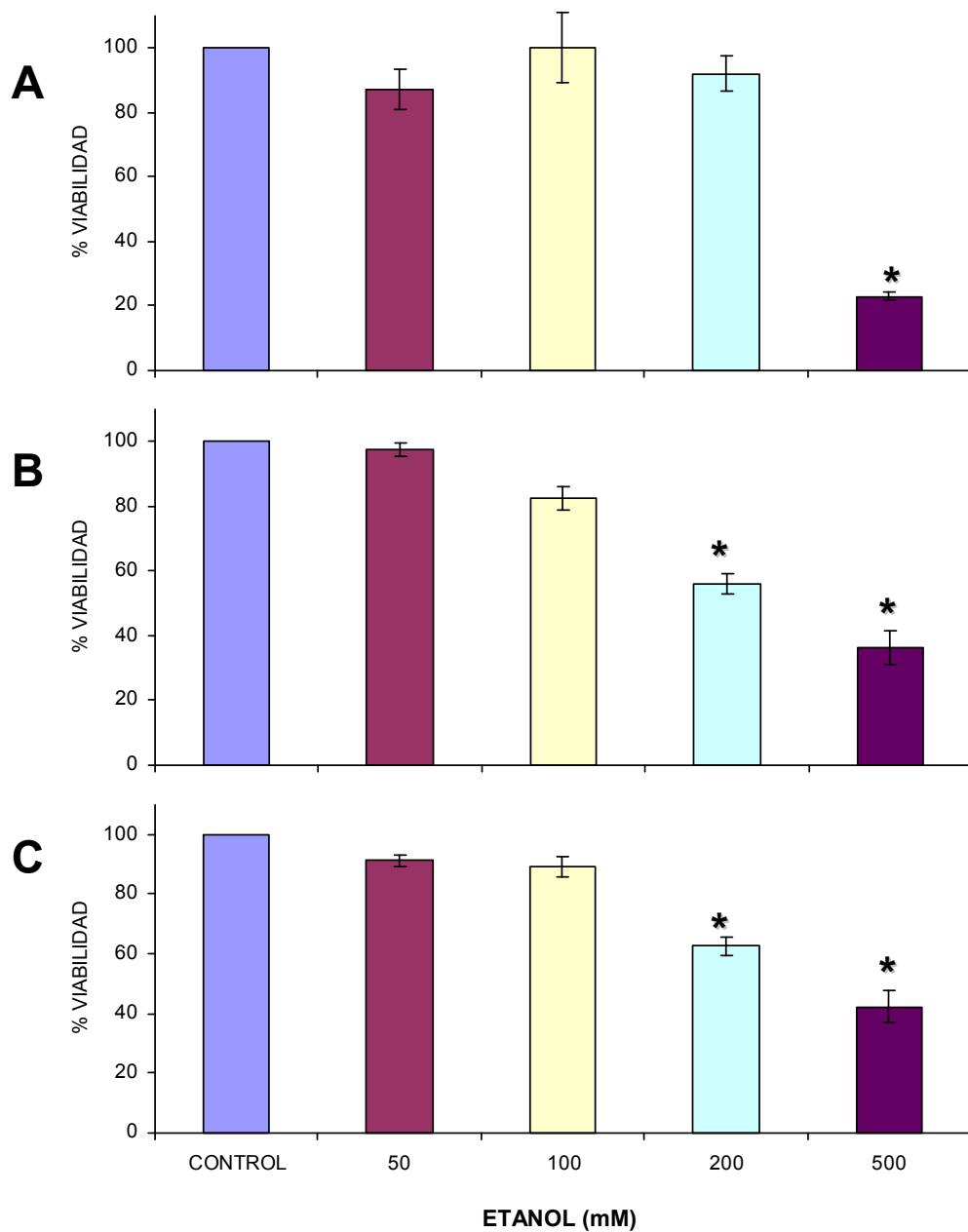


Figura 1. Viabilidad de las células HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C) tratadas a diferentes concentraciones de EtOH por 24 horas. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa con respecto al % del control $p \leq 0.05$.

VI.2 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

La fluorescencia de DCF por la presencia de peróxidos es un parámetro utilizado para determinar de manera indirecta la producción de las ERO en las células. En la figura 2-A, las células HepG2 tratadas con EtOH no presentaron diferencias en la producción de peróxidos con respecto a las células sin tratamiento.

La producción de peróxidos no se incrementó en las células VA-13 expuestas al mismo tóxico (fig. 2-B). La presencia del CYP2E1 en las células VL-17A, afectó la producción de peróxidos, ya que estos se incrementaron por la actividad del CYP2E1. Esto se puede apreciar en la figura 2-C, un aumento en la cantidad de los peróxidos, debido al metabolismo del EtOH, siendo estadísticamente significativo con respecto las células sin tratamiento.

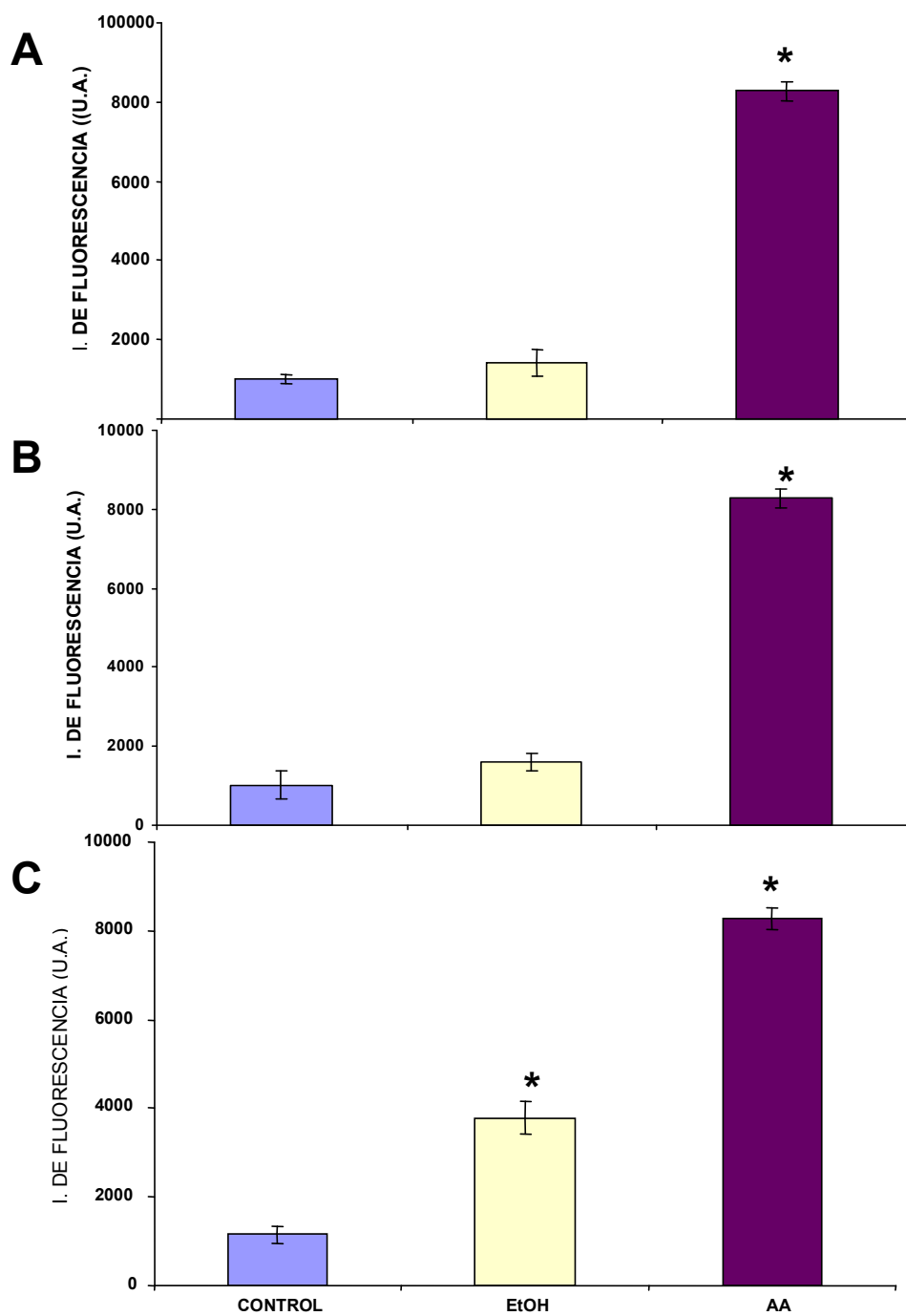


Figura 2. Generación de ERO en las células HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C), después de un tratamiento con 100 mM de EtOH, ó con 15 μ M de antimicina A (AA) durante 24 h. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$

VI.3 GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

La LPO fue determinada mediante la formación de MDA en presencia de ácido tiobarbitúrico. Las células VA-13, VL-17A y HepG2 fueron tratadas con 100 mM de EtOH o con 0.01 mM de BSO como control positivo, durante 24 h. Las células VL-17A exhibieron un incremento de 4 veces en la formación de MDA siendo significativo, por lo que hubo una gran diferencia con las células sin tratamiento (fig. 3-C).

El mismo tratamiento aplicado a las células HepG2 y a las VA-13 mostraron valores similares en la producción de MDA con respecto a las células control, como se puede apreciar en la figura 3-A y 3-B.

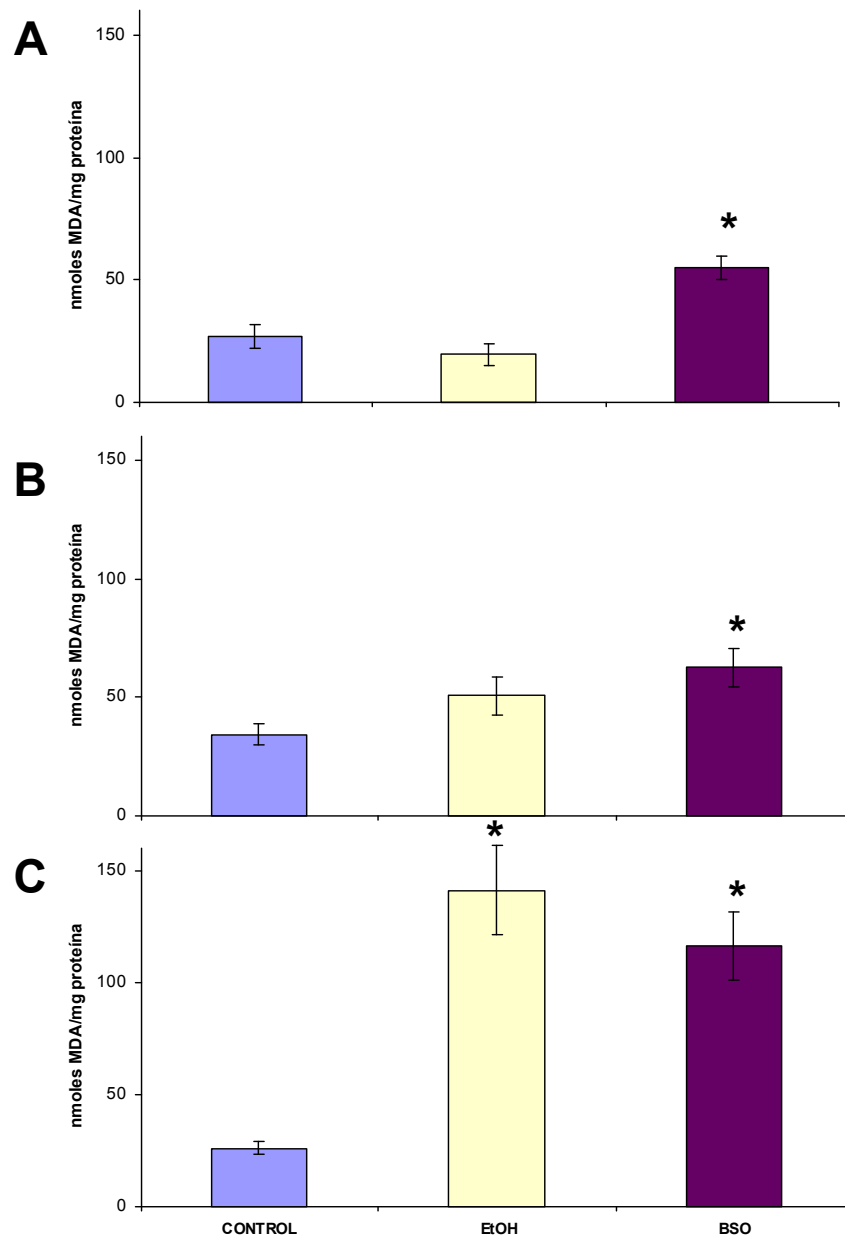


Figura 3. Formación de malondialdehído (MDA) en las células HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C), tratadas con 100 mM de EtOH o 0.01 mM de BSO por 24 h. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes. *Diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$.

VI.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA.

El tratamiento con EtOH afectó la actividad enzimática de SOD en las células VL-17A, como se puede apreciar en la figura 4-C, hay una disminución del 9.30 % en la actividad de la SOD.

En contraste, las células HepG2 (fig. 4-A) con el mismo tratamiento no presentaron diferencias en la actividad enzimática de SOD comparadas a las células sin tratamiento.

La actividad de la SOD en las células VA-13 no se encontró alterada al ser tratadas con el EtOH. Como se puede apreciar en la figura 4-B, sin embargo, al emplear un tratamiento con 5 μM de CdCl_2 como control positivo por 4 h produjo una disminución en la actividad enzimática de SOD siendo estadísticamente significativa con respecto a las células sin tratamiento

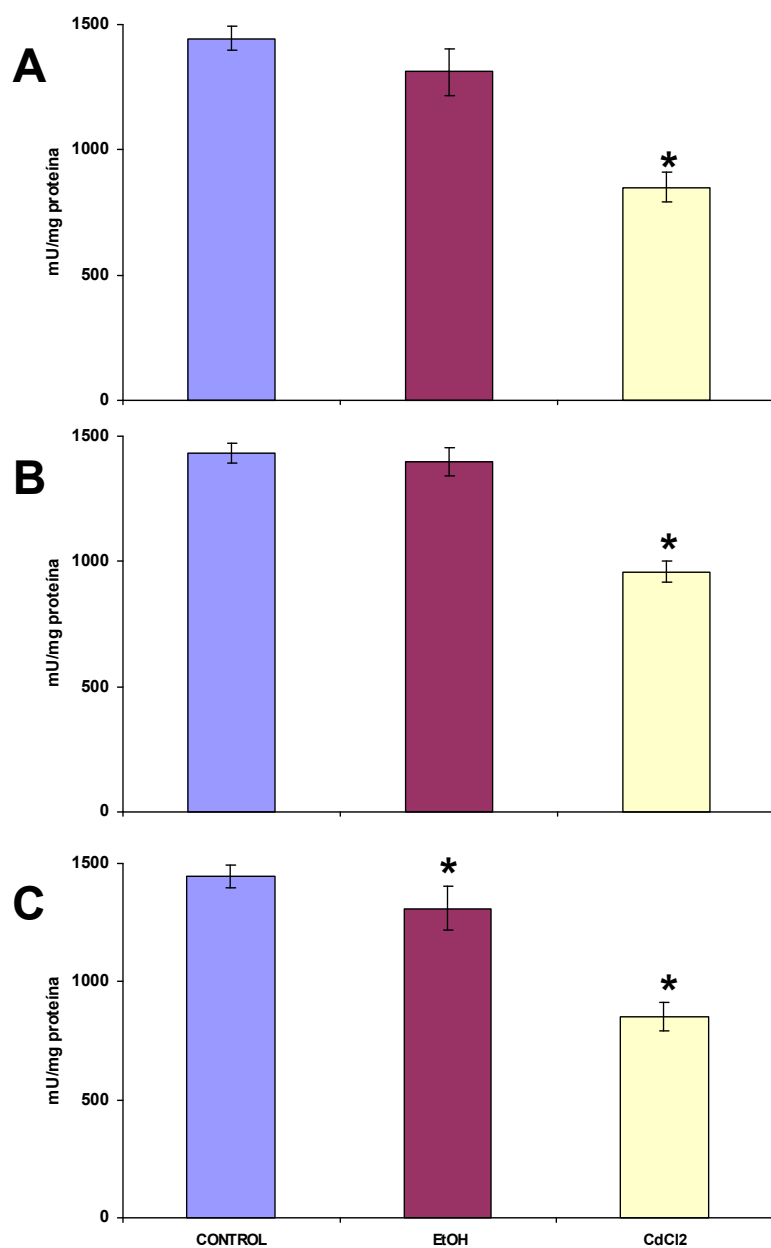


Figura 4. Actividad de la SOD en las células HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C), tratadas por 24 h con 100 mM de EtOH o con 5 μ M de CdCl₂, por 4 h. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$.

VI.5 CONTENIDO DE GLUTATIÓN REDUCIDO CELULAR Y MITOCONDRIAL.

No se observaron cambios de en el contenido de glutatión reducido celular en ninguna de las líneas celulares estudiadas (fig.5).

Las células VL-17A al ser tratadas con EtOH, presentaron una disminución del 52% en el contenido de glutatión reducido mitocondrial (GSHm), siendo estadísticamente significativo con respecto a las células sin tratamiento (fig. 6-C).

El contenido de GSHm en las células HepG2 y en las células VA-13 no fue afectado por el tratamiento con EtOH, mostrando un comportamiento semejante a las células sin tratamiento, como se puede apreciar en la figura 6-A y 6-B.

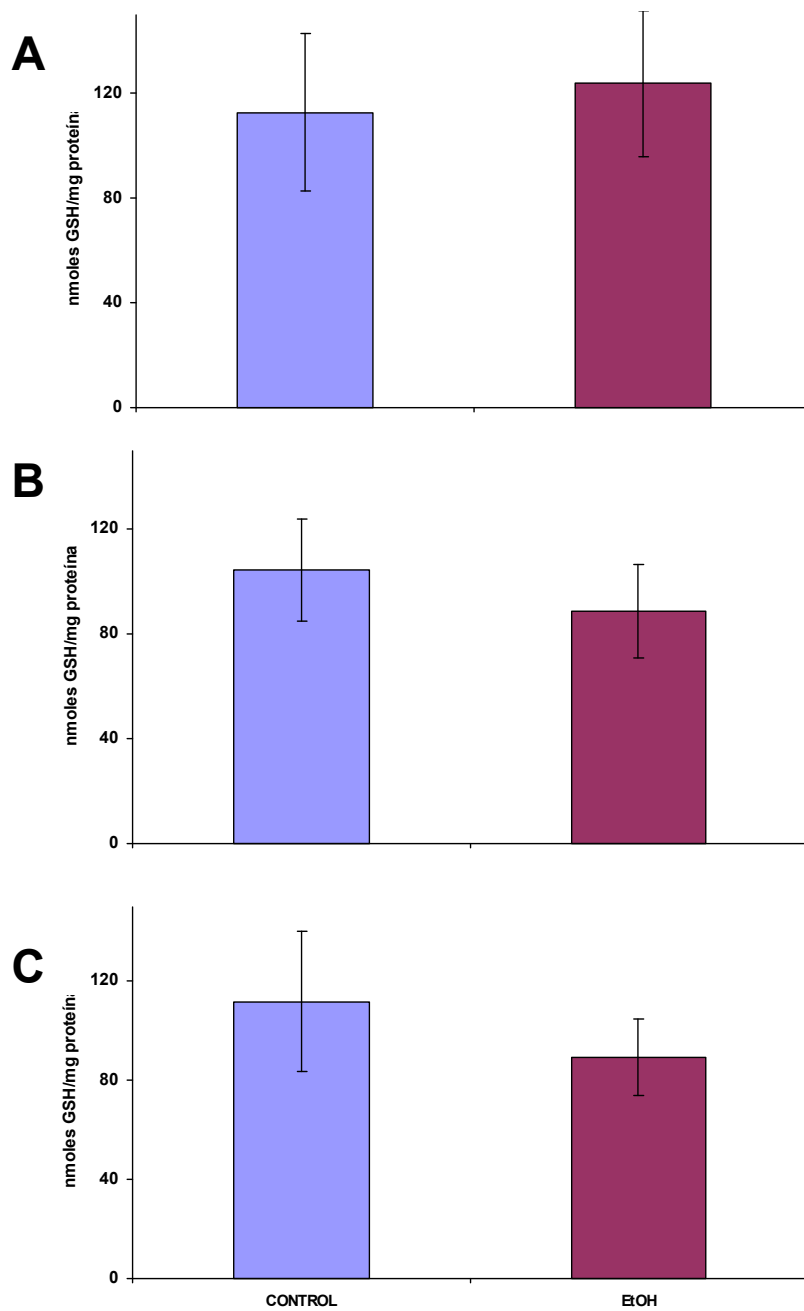


Figura 5. Contenido de GSH celular en HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C), tratadas por 24 h con 100 mM de EtOH. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes. *Diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$.

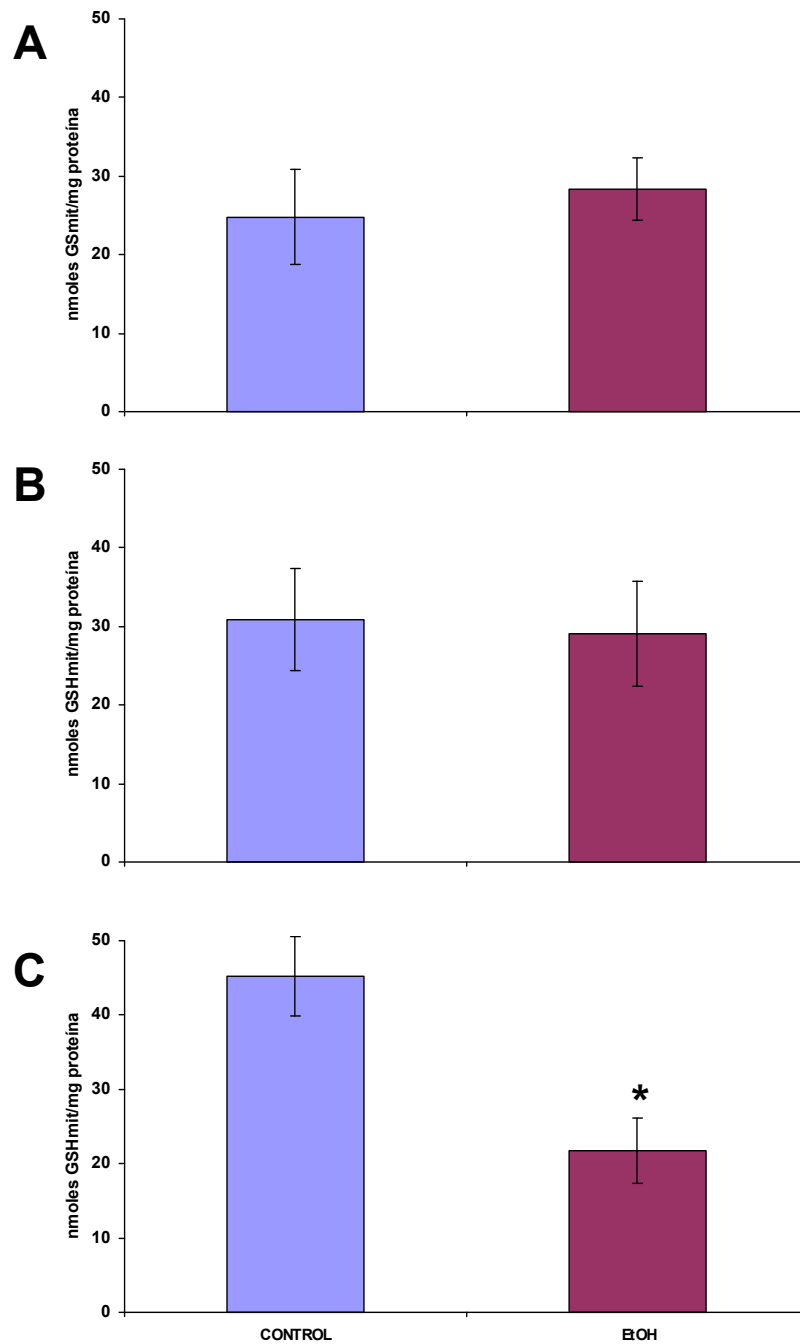


Figura 6. Contenido de GSH mitocondrial en las células HepG2 (A), VA-13 (B) y VL-17A (C), tratadas con 100 mM de EtOH por 24 h. Cada valor representa la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes. *Diferencia significativa con respecto al control $p \leq 0.05$.

VII DISCUSIÓN.

Se ha reportado que una exposición aguda o crónica de EtOH incrementa las ERO, y/o disminuye los niveles de antioxidantes en diversos tejidos, principalmente en el hígado, siendo el estrés oxidativo inducido por el metabolismo del alcohol uno de los elementos importantes para producir daño hepático. Existen distintos mecanismos para producir estrés oxidativo por el EtOH, algunos de ellos incluyen cambios en el estado redox, el daño mitocondrial, producción de acetaldehído, efecto directo del EtOH en la membrana causado por su hidrofobicidad, hipoxia inducida por el alcohol, efecto del EtOH en el sistema inmune lo cual altera la producción de citocinas, alteración en los mecanismos antioxidantes, particularmente del GSH citosólico y mitocondrial, entre otros (Dey, 2006).

El estudio de los efectos dañinos ocasionados por el metabolismo de EtOH en los hepatocitos no había sido una tarea fácil, porque los hepatocitos en cultivo primario pierden en poco tiempo la capacidad de oxidar el EtOH. Recientemente se han perfeccionado los modelos *in vitro*, por la generación de líneas celulares con la capacidad de metabolizar el EtOH, como lo son las células E-47, E-9, entre otros modelos *in vitro* que expresan el CYP2E1, se ha encontrado que este citocromo P450 tiene un papel fundamental en el deterioro celular por estrés oxidativo generado por el metabolismo del EtOH.

Sin embargo, no se habían realizado estudios *in vitro*, para el estudio de la oxidación del alcohol en un modelo más real, con los dos principales sistemas enzimáticos de la oxidación del alcohol: la ADH y el CYP2E1. Por lo cual, en el

presente estudio utilizamos tres tipos celulares, las células HepG2 que no metabolizan el EtOH, las células VA-13 que oxidan el alcohol por medio de la enzima ADH y las células VL-17A, las cuales metabolizan el EtOH por la enzima ADH y/o por el CYP2E1. Con la finalidad de conocer el efecto citotóxico del metabolismo de EtOH en las líneas celulares hepáticas, para poder realizar un análisis comparativo principalmente entre las células VA-13 y las células VL-17A. Con el propósito de demostrar que el daño ocasionado por el metabolismo del EtOH, es primordialmente por la actividad del CYP2E1, el cual tiene un papel relevante en la inducción de estrés oxidativo.

La viabilidad no fue afectada en las células HepG2, VA-13 y VL-17A con un tratamiento de 100 mM de EtOH, dato que concuerda con el reportado por Robin y cols. Esta concentración de EtOH no esta asociada con mortalidad celular (Robin, 2005). Concentraciones mayores mayores de 500 mM de EtOH en las tres líneas celulares presentaron un incrementó en la tasa de mortalidad. Esto coincide con lo obtenido por Wu y Cederbaum (2000) en hepatocitos y en las HepG2. Del mismo modo, Nakayama y cols. (2001) encontraron que un tratamiento con 400 mM de EtOH sensibilizaron a las células HepG2 a la muerte por apoptosis (Nakayama, 2001).

Ponsoda y cols (1999) mostraron que en hepatocitos humanos incubados con 100 mM de EtOH, se incrementó dos veces la actividad enzimática de CYP2E1 y esto incrementó la producción de las ERO comparado con los cultivos sin tratamiento (Ponsoda, 1999).

Sólo las células VL-17A presentaron un incrementó significativo en la

producción de peróxidos, un aumento en el daño lipoperoxidativo, así como, una alteración en los mecanismos antioxidantes debido a la disminución en la actividad enzimática de la SOD y en la concentración de GSH mitocondrial.

El CYP2E1 es inducido predominantemente en los hepatocitos por el EtOH, originando el anión superóxido lo que ocasiona daño hepático durante una exposición crónica con el EtOH. El estrés oxidativo inducido *in vivo* durante la ingesta de alcohol genera estrés oxidativo por la formación de las ERO, permitiendo la acumulación de productos de LPO como el HNE (Kono,1999). En las células E-47 Marí y cols. (2003) mostraron que la actividad del CYP2E1, incrementaba la producción de las ERO (Marí, 2003). Esto lo encontramos en las células VL-17A, por que al tratar las células con EtOH, se incrementaba la producción de peróxidos.

En un modelo animal, los ratones fueron alimentados con una dieta suplementada con EtOH durante 4 días, lo que incrementó de manera drástica la actividad del CYP2E1, esto provocó la producción masiva de peróxidos, una disminución en los niveles de GSH mitocondrial y citosólico, así como, un aumento en la LPO ocasionando un deterioro celular (Bradford, 2004).

En ratones que no expresaban el CYP2E1 (*Cyp2E1 null*) se encontró un mecanismo compensatorio debido a la inducción de isoformas del citocromo P450, como el CYP4A, sin embargo, recientemente se ha reportado que la inducción de CYP4A10 y CYP4A14 no esta asociado con un incremento en la LPO en el hígado (Ip, 2003).

En las células VL-17A se incrementó 4 veces el MDA producto de la LPO

en comparación con las células sin tratamiento, esto se debe a que la concentración de EtOH fue alta y se indujo al CYP2E1. En las células HepG2 y VA-13 la presencia de EtOH no afectó la producción de productos lipoperoxidativos.

El EtOH no incrementa la LPO en las células HepG2, porque no tienen la capacidad de metabolizar el alcohol, esto fue comprobado en un estudio realizado en nuestro laboratorio (2001), las células HepG2 fueron tratadas con 50 mM de EtOH durante 24 h, presentaron valores de MDA similares a las células no tratadas (Gutiérrez-Ruiz, 2001). Lo cual fue corroborado en el presente trabajo de investigación en las células HepG2 expuestas al mismo tóxico, mientras que las VL-17A incrementaron de manera dramática el contenido del aldehído producto de la LPO.

En hepatocitos de cultivo primario de humano el EtOH incrementó la síntesis del CYP2E1, causando un incremento en la LPO. Así mismo, un inhibidor del CYP2E1 como el DAS, atenuó el daño lipoperoxidativo, lo que indicó que este efecto es por la inducción en la actividad del CYP2E1 (Liu, 2005).

Las células E-47 al ser tratadas con EtOH durante 5 días, ocasionó un incremento en la producción de peróxidos en comparación con las células que no expresan el citocromo, promoviendo una baja en los niveles del GSH mitocondrial, no así en la concentración de GSH citosólico, induciendo la muerte celular (Xu, 2003). Del mismo modo en nuestro estudio encontramos en las células VL-17A un decremento significativo en los niveles de GSH mitocondrial en comparación con las células VA-13 y HepG2 que no presentaron cambios en el contenido de GSH

mitocondrial. La disminución en los niveles de GSH en la mitocondria esta asociado al aumento en los niveles del CYP2E1 (Robin, 2005), asimismo, los bajos niveles de GSH en la mitocondria, se atribuye a un defecto en el transportador mitocondrial de GSH, esto puede ser prevenido por un antioxidante como el S-adenosilmetionina (García-Ruiz, 1995).

Fernández-Checa y cols. (1998) han documentado extensamente que la ingesta crónica de EtOH en el modelo de Lieber-DeCarli, causó niveles bajos de GSH en los hepatocitos particularmente en la mitocondria. Esta disminución de GSH mitocondrial parece ser clave en el desarrollo de la EHA.

Los efectos ocasionados por el metabolismo del EtOH como es el incremento en la producción de las ERO y la LPO, es causado directamente por la actividad del CYP2E1, porque las secuelas de deterioro celular fueron bloqueadas con inhibidores químicos del CYP2E1 (Cederbaum, 2003).

En un modelo animal el EtOH incrementó la LPO microsomal, lo cual se correlacionó con altos niveles en la actividad de CYP2E1. Por otra parte, experimentalmente una disminución en la inducción de este citocromo esta asociado con una reducción del daño hepático inducido por el EtOH (Gouillon, 2000).

El tratamiento con EtOH en las células VL-17A produce alrededor de 200 μ M de Ac (Donohue, datos no publicados) (Donohue, 2006). La expresión del CYP2E1 en las células E47 genera estrés oxidativo, esto se corroboró por la presencia de peróxidos (fluorescencia de DCF), una disminución del GSH

intracelular y una elevada LPO comparado con las células C34, que no expresan el citocromo. Antioxidantes como trolox protegen a las células E47 del estrés oxidativo (Zhuge, 2005).

Donohue y cols. (2006) concluyeron que la oxidación del alcohol por la ADH aumenta el cociente NADH/NAD en las células VL-17A, sin embargo, esto no es la causa principal de la toxicidad por el metabolismo del EtOH (Donohue, 2006).

El daño celular por estrés oxidativo ocasionado por el metabolismo del EtOH, es debido a la participación del CYP2E1. Las evidencias encontradas en este trabajo de investigación fueron contundentes, porque las células VL-17A que oxidan el EtOH por la ADH o por el CYP2E1, presentaron incrementó en la producción de las ERO y una disminución de los mecanismos antioxidantes, lo cual no sucedió con las células VA-13. Las diferencias que existen entre ambos tipos celulares, es atribuible a la presencia del citocromo P450 2E1.

VIII CONCLUSIONES.

La toxicidad celular en el metabolismo del EtOH, es debido a la oxidación del alcohol por el CYP2E1, porque las células VL-17A al ser tratadas con EtOH presentaron daño celular debido a la oxidación del EtOH por este citocromo, el deterioro presentado en esta línea celular, no fue observado en las células VA-13 y HepG2, lo cual ha sido corroborado en diferentes estudios antes mencionados.

Encontramos en este estudio que los mecanismos antioxidantes como la actividad de la SOD y el contenido de GSH mitocondrial se encontraban disminuidos de manera significativa en las células VL-17A con un tratamiento 100 mM de EtOH por 24 h, debido a la oxidación del EtOH por el CYP2E1, ocasionando daño por estrés oxidativo.

Aunque, las células VL-17A pueden metabolizar el EtOH tanto por la enzima ADH o por el CYP2E1, en este trabajo de Investigación ratificamos que el daño por el metabolismo de EtOH es incrementado, si el alcohol es oxidado por el CYP2E1, siendo dependiente de la dosis y el tiempo de exposición del tóxico.

El estrés oxidativo ocasionado en el daño hepático por el EtOH es principalmente por la participación del CYP2E1 en el metabolismo de este alcohol, además de la producción de Ac como metabolito altamente tóxico, induce un aumento en las ERO y una disminución en los mecanismos de defensa antioxidantes, afectando la actividad de la superóxido dismutasa y niveles bajos del GSH mitocondrial, del mismo modo, un incremento en el daño lipoperoxidativo, deteriorando las funciones celulares y esto puede originar la muerte celular (fig. 7).

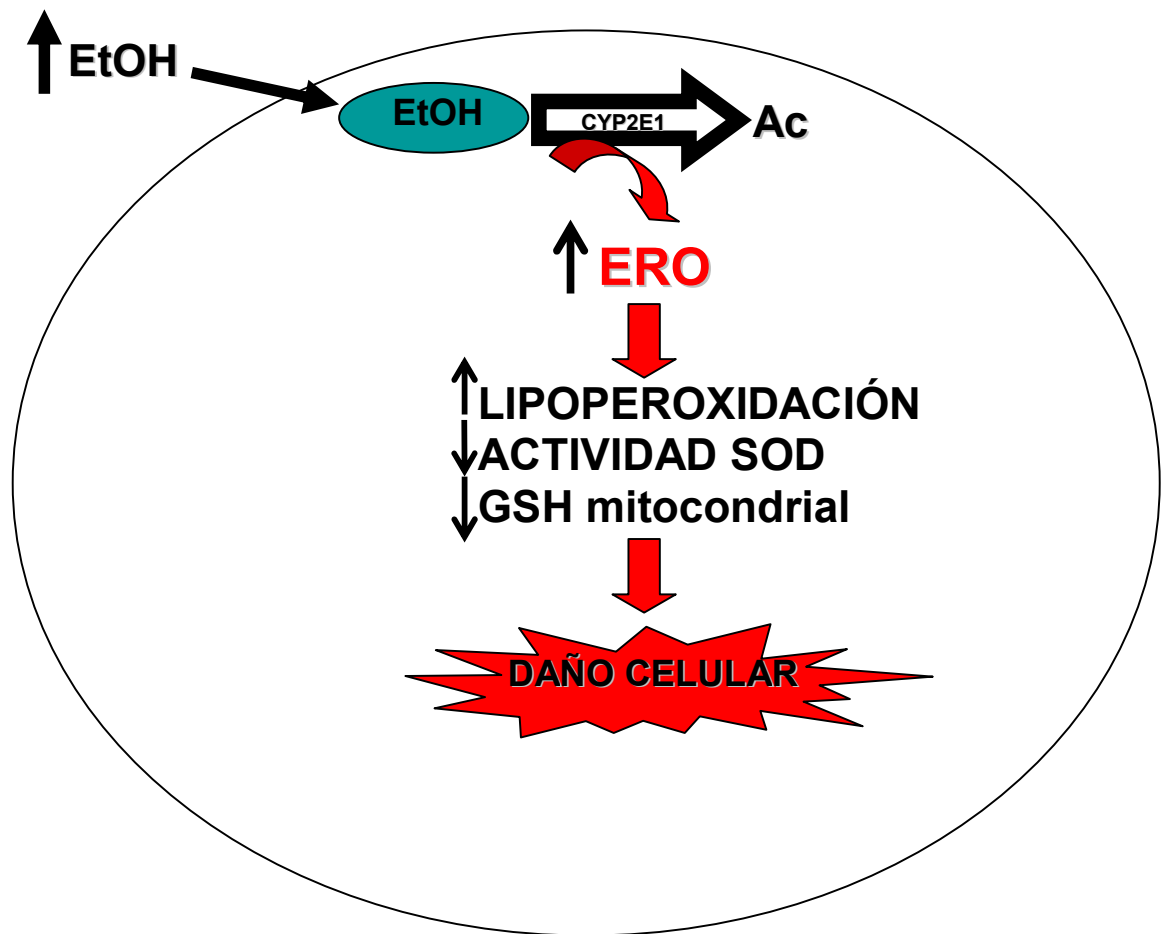


Figura 7. El metabolismo de EtOH por el CYP2E1 además de producir acetaldehído (Ac) como metabolito tóxico, genera especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual ocasiona un mayor deterioro a nivel celular, por la disminución de los mecanismos antioxidantes.

Las células VL-17A son un excelente modelo *in vitro* para el estudio del daño oxidativo por el metabolismo de EtOH por las características que presentan, ya que contiene los dos principales sistemas enzimáticos para la oxidación del EtOH: la ADH y el CYP2E1, además, nuestra línea celular se asemeja más a un hepatocito expuesto al EtOH en un organismo real. Porque, los hepatocitos recién aislados pierden en pocas horas la capacidad de metabolizar el alcohol. Las células VL-17A pueden ayudar a comprender y profundizar en los mecanismos

moleculares que se encuentran involucrados en los procesos de deterioro celular en la enfermedad hepática alcohólica.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, podemos concluir que el citocromo P450-2E1 induce estrés oxidativo. Asimismo, la inducción del CYP2E1 por la oxidación del EtOH, tiene un papel importante en el daño hepático por el alcohol.

IX REFERENCIAS.

- Arteel G. 2003. Oxidants and antioxidants in alcohol- induced liver disease. *Gastroenterology*, 124:778-790.
- Bai J. y Odin J. 2003. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmun Rev*, 2:36-42.
- Bradford B., Kono H., Isayama F., Kosyk O., Wheeler M., Akiyama T., Bleye L., Krausz K.W., Gonzalez F.J., Koop D.R., Rusyn I. 2005. Cytochrome P450-CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology*, 41:336-344.
- Buege J.A. y Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52:302-310.
- Cederbaum A. 2003. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol*, 30:115-120.
- Clemens D.L., Calisto L., Sorrell M., Tuma D. 2003. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant HepG2 cells. *Hepatology*, 38:385-393.
- Clemens D.L., Forman A., Jerrels T.R., Sorrell M., Tuma D. 2002. Relationship between acetaldehyde levels and cell survival in ethanol-metabolizing hepatoma cells. *Hepatology*, 35:1196-1204.
- Coon M.J., Ding X.X., Pernecky S.J., Vaz A.D. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J*, 6: 669-673.
- Dey A y Cederbaum A. 2006. Alcohol and oxidative liver injury, *Hepatology*. 43:S63-S74.

- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud. 2001. Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México. 1999. Salud Pública de México, 43:67-73.
- Escobar Ma.C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Damián-Matzumura P., Zaga V., Gutiérrez-Ruiz M.C. 2002. Cadmium induces α 1 collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. Toxicology. 170:63-73.
- Donohue T., Osna N., Clemens D.L. 2006. Recombinant HepG2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. Int J Biochem Cell Biol, 38:92-101.
- Fernández-Checa J.C., García-Ruiz C., Ookhtens M., Kaplowitz N. 1998. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats: tracer kinetic studies in vitro and susceptibility oxidants stress. J Clin Invest, 87:397-405.
- García-Ruiz C., Morales A., Colell A., Ballesta A., Rodes J., Kaplowitz N., Fernández-Checa J.C. 1995. Feeding S-Adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. Hepatology, 21:207-214.
- Gouillon Z., Lucas D., Li J., Hagbjork A.L., French B.A., Fu P. 2000. Inhibition of ethanol-induced liver disease in the intragastric feeding rat model by chlormethialoze. Proc Soc Exp Biol Med, 224:302-308.
- Guengerich P. 1992. Cytochrome P450: advances and prospects. FASEB J,

6:667-668.

- Gutiérrez Ruiz M.C., Gómez Quiroz L., Hernández E., Bucio L., Souza V., Llorente I., Kershenobich D. 2001. Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells. *IMAJ*, 3:131-136.
- Hoek J.B., Cahill A., Pastorino J.G. 2002. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology*, 122:2049-2063.
- Ip E., Farrell G.C., Robertson G., Hall P., Kirsch R., Leclercq I. 2003. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 38:123-132.
- Kaplowitz N. 2000. Mechanisms of liver cell injury. *Hepatology*, 32:39-47.
- Kono H., Bradford B., Yin M., Sulik K., Koop D., Peters J., Gonzalez F., McDonald T., Dikolova A., Kadiiska M., Mason R., Thurman R. 1999. CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol*, 277:G1259-G1267.
- Koop D.R. 1992. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J*, 6:724-7
- Krausz K., Gonzalez F., Koop D., Rusyn I. 2004. Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology*, 41:336-344.
- Lieber C.S. 2000. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *Hepatology*, 32:113-128.
- Liu L., Yan H., Yao P., Zhang W., Zou L., Song F., Li K., Sun X. 2005. CYP2E1-dependent hepatotoxicity and oxidative damage alter ethanol administration in

human primary hepatocytes. *World J Gastroenterol*, 11:4530-4535.

- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. 1951. Protein a mechanism with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.

- Mari M., Bai J., Cederbaum A. 2002. Adenovirus-mediated overexpression of catalase in the cytosolic or mitochondrial compartment protects against toxicity caused by glutathione depletion in HepG2 cells expressing CYP2E1. *J Pharmacol Exp Therap*, 201:111-118.

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63.

- Nakayama N., Eichrorst S., Müller M., Krammer P. 2001. Ethanol-induced apoptosis in hepatoma cells proceeds via intracellular Ca^{2+} elevation, activation of TLKC-sensitive proteases, and cytochrome c release. *Exp Cell Res*, 269:202-213.

- Ponsoda X., Bort R., Jover R., Gomez-Lechon M.J. 1999. Increased toxicity of cocaine on human hepatocytes induced by ethanol: role of GSH. *Biochem Pharmacol*, 58:1579-1585.

- Rivero-Rosas H., Julian-Sanchez A., Piña E. 1997. Enzimology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res*, 28:453-471.

- Robin M.A., Sauvage I., Grandperret T., Descatoire V., Pessayre D., Fromently. 2005. Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes. *FEBS Lett*, 579:6895-6902.

- Rojkind M., Domínguez-Rosales J., Nieto N., Greenwel P. 2001. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci*, 59:1872-1891.

- Román J., Colell A., Blasco C., Caballería J., Parés A., Rodés J., Fernández-Checa J. 1999. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Hepatology*, 30:1473-1480.
- Ronis M., Butura A., Sampey B.P., Shankar K., Prior R.L., Korourian S., Albano E., Ingelman-Sudberg M., Petersen D., Badger T. 2005. Effect of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med*, 39:619-630.
- Schaffert C., Todero S., McVicker B., Tuma P., Sorrel M., Tuma D. 2004. WIF-B cells as a model for alcohol-induced hepatocyte injury. *Biochem Pharmacol*, 67:2167-2174.
- Stewart S., Jones D., Day C. 2001. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventive strategies. *TRENDS Mol Med*, 9:408-413.
- Tietze F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Annal Biochem*, 27:502-522.
- Wu D. y Cederbaum A. 2000. Ethanol and arachidonic acid produce cytotoxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol Cell Biochem*, 204:157-167.
- Wu D. y Cederbaum A. 1996. Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem*, 271:23914-23919.
- Wu D. y Cederbaum A. 1999. Ethanol-Induced apoptosis to stable HepG2 cell

line expressing human cytochrome P450 2E1. *Alcohol Clin Exp Res*, 23:67-75.

- Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M., Carrell R.W. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*, 85:337-341.

- Xu Y., Leo M., Lieber C. 2003. Lycopene attenuates alcoholic apoptosis in HepG2 cells expressing CYP2E1. *Biochem Biophys Res Commun*, 308:614-618.

- Zhuge J. y Cederbaum A. 2006. Serum deprivation-induced HepG2 cell death is potentiaced by CYP2E1. *Free Radic Biol Med*. 40:63-74.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Determinación del daño oxidativo generado por el metabolismo de etanol en líneas celulares hepáticas”, con fecha de examen oral el día 29 de Noviembre del 2006.

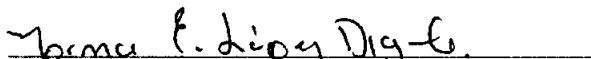
JURADO DE EXAMEN



Presidenta

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

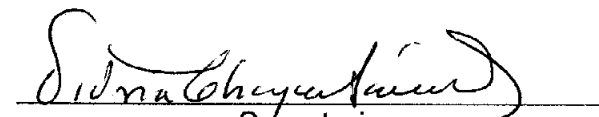
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretaria

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México