

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

227419



RELACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR EL ETANOL, EL
ACETALDEHÍDO Y EL LPS EN LA INDUCCIÓN Y SECRECIÓN DE
INTERLEUCINA 8 EN CELULAS HepG2.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A :
Q. I. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

MEXICO, D.F.

2000

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la **Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz** y con la asesoría de la **Dra. Victoria Chagoya** del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y de la **Dra. Florencia Vargas Voráckova**, del Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Agradezco al CONACYT el apoyo brindado durante mis estudios por medio de la beca con número de registro 124751. Asimismo el proyecto contó con el apoyo del CONACYT con número de convenio 40002000-5-25175M

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

Por confiar en mi desde el inicio de la maestría. Por ser un modelo a seguir en mi vida profesional. Gracias mil.

A LA MEMORIA DE MI PADRE:

BERNABE GOMEZ ROMAN

AGRADECIMIENTOS:

A mis asesoras

Dra. Victoria Chagoya y Dra. Florencia Vargas. Por sus consejos y observaciones que han sido de valiosa ayuda en el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Hernández Pando

Por el gran apoyo proporcionado en los ensayos inmunoenzimáticos de las citocinas.

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

A la que desde el primer día consideré mi casa y la seguirá siendo en el tiempo, donde quiere que uno esté.

A mi esposa Dra. Deidry Beatriz Cuevas, compañera siempre, en las buenas y en las malas.

A mi pedacito de gloria, mi hija Frida Mariel Gómez: esperanza y alegría

A mi Madre: Profra. Ma. Guadalupe Quiroz, por el apoyo que me ha dado siempre, sin esperar nada a cambio

A mis hermanos: C.P. Norma Angélica, Ing. José Martín, Ing. Jorge Sinecio y Lic. Rosa Guadalupe Gómez Quiroz. Gracias

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología celular. Dra. Leticia Bucio, MC Elizabeth Hernández, MC. Verónica Souza, MC. Patricia Olivares, Med. Amir Kersenobich, BE. Blanca Farfán, Med. Alicia Correa, BE. Carmen Escobar y Sr. Pedro Palma.

A mis compañeros de generación de la Maestría en Biología Experimental: Patricia Garza, Laura Castañeda, Leticia Alfaro, Eloy Hernández, Ascensión Ramírez, Lucia Hernández, Piedad López, Víctor Rosales, Xochitl Guzmán.

LIVER DISEASES ARE THE MOST IMPORTANT, SINCE
THE LIVER IS A NOBLE ORGAN THAT SUSTAINS, HELPS,
AND INFLUENCES ALL OTHERS.

- Paracelso
Opera omnia
1493-1541

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| ALD | Acetaldehído |
| ALDH | Acetaldehído deshidrogenasa |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| AP-1 | Proteína Activadora |
| ADN | Acido Desoxirribonucleico |
| ARNm | Acido Ribonucleico mensajero |
| ATCC | American Type Culture collection |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| DEPC | Dietil Pirocarbonato |
| EDTA | Acido etilendiamino-tetra-acético |
| EHA | Enfermedad Hepática Alcohólica |
| ELISA | Ensayo Inmunoenzimático |
| ES | Error Estándar |
| EtOH | Etanol |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| H ₂ O | Agua |
| g | gravedad |
| GSHPx | Glutacion peroxidasa |
| GSSG | Glutación oxidado |
| h | hora |
| HCl | Acido clorhídrico |
| HepG2 | Hepatoblastoma humano (hepatocito, línea celular) |
| IL | Interleucina |
| LBP | Proteína unidora de LPS |
| LPO | Lipoperoxidación |
| LPS | Lipopolisacárido ó endotoxina |
| MDA | Malondialdehído |
| mg | miligramo |
| min | minuto |

| | |
|-----------------------------|---|
| min | minuto |
| ml | mililitros |
| MTT | Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil |
| Mol | Molécula |
| NAC | N-acetil-cisteína |
| NADH | Nicotinamida Adenín Dinucleotido |
| NADPH | Nicotinamida Adenín Dinucleotido Fosfato |
| NBT | Tetrazolio-nitro-azul |
| NF- κ B | Factor Nuclear - κ B |
| nm | nanómetros |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| RL | Radical Libre |
| RN | Rojo Neutro |
| RT-PCR | Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecíl Sulfato de Sodio |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| TCA | Acido tricloroacético |
| TMTU | Tetrametil tio-urea |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral- α |
| O ₂ ⁻ | Radical superóxido |
| •OH | Radical hidroxilo |
| W | Watts |

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| I INTRODUCCION | 2 |
| I.1 EL ALCOHOLISMO | 2 |
| I.2 METABOLISMO DEL ETANOL | 2 |
| I.3 EFECTOS TOXICOS DEL ETANOL | 5 |
| I.3.1 METABOLISMO DE LÍPIDOS | 5 |
| I.3.2 GLUTATION | 6 |
| I.3.3 EFECTOS TOXICOS DEL ACETALDEHÍDO | 6 |
| I.4 ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHOLICA | 7 |
| I.5 ENDOTOXEMIA | 9 |
| I.6 MEDIADORES DE COMUNICACIÓN CELULAR | 11 |
| I.6.1 CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO | 12 |
| I.6.2 RADICALES LIBRES | 14 |
| II OBJETIVOS | 17 |
| III HIPÓTESIS | 17 |
| IV MATERIAL Y METODOS | 18 |
| IV.1 CULTIVO CELULAR | 18 |
| IV.2 DISEÑO EXPERIMENTAL | 18 |
| IV.3 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD CELULAR | 19 |
| IV.3.1 ROJO NEUTRO | 19 |
| IV.3.2 MTT | 20 |
| IV.4 DETERMINACION DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACION | 20 |
| IV.5 DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS | 21 |
| IV.5.1 ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL | 22 |
| IV.5.2 ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA | 22 |
| IV.5.3 ACTIVIDAD DE LA CATALASA | 23 |
| IV.6 CONTENIDO DE GLUTATIÓN | 23 |
| IV.7 AISLAMIOENTO DE ARN | 24 |
| IV.8 TRANSCRIPCION REVERSA-REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) | 24 |
| IV.9 SECRECION DE INTERLEUCINA 8 | 26 |
| IV.10 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINA | 26 |
| IV.11 ANALISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| V RESULTADOS | 27 |
| V.1 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD CELULAR | 27 |
| V.1.1 ROJO NEUTRO | 27 |
| V.1.2 MTT | 28 |
| V.2 GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN | 29 |
| V.3 AVTIVIDADES ENZIMATICAS | 30 |
| V.3.1 ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL | 30 |
| V.3.2 ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA | 31 |
| V.3.3 ACTIVIDAD DE LA CATALASA | 32 |
| V.4 CONTENIDO DE GLUTATIÓN | 33 |
| V.5 SECRECIÓN DE INTERLEUCINA 8 | 34 |

| | |
|--|----|
| V.6 INDUCCION DE ARNm DE INTERLEUCINA 8..... | 39 |
| VI DISCUSIÓN..... | 45 |
| VII REFERENCIAS..... | 55 |

COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

RESUMEN

Antecedentes: La respuesta inflamatoria crónica, en la enfermedad hepática alcohólica, esta asociada con el reclutamiento de neutrófilos en la zona de daño, y sobreviene después del daño hepático producido por la ingesta alcohol (EtOH). El estrés oxidativo, la endotoxina y las citocinas, juegan un papel crítico en el inicio y agravamiento de este proceso. Entre las principales citocinas que median este daño se encuentran la interleucina-8 (IL-8), que es quimiotáctica para neutrófilos y el TNF- α , que esta considerada como uno de los primeros mediadores de daño.

Objetivo: Nos propusimos estudiar el efecto del estrés oxidativo producido por el EtOH, el acetaldehído (ALD) o la endotoxina (LPS) en la expresión y secreción de IL-8. Metodología: Células HepG2 se trataron por 24 h con EtOH 50mM, ALD 175 μ M ó LPS 1 μ g/ml. Pasado este tiempo, se recuperaron las células para determinar: la funcionalidad celular por medio de la prueba del rojo neutro (RN) y MTT; las actividades de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx) y Catalasa (CAT); el contenido de glutatión (GSH) y la expresión del mensajero de IL-8 por RT-PCR. En el medio de cultivo se determinó la secreción de IL-8 por medio de ensayos comerciales de ELISA. Resultados: Las pruebas de RN y MTT mostraron que los tres tóxicos presentan una tendencia a disminuir la funcionalidad celular, siendo el ALD el que mostró mayor daño. Las actividades de las enzimas SOD y GSHPx así como el contenido de GSH no mostraron cambios significativos, mientras que la CAT observó una disminución estadísticamente significativa con los tres tratamientos. La expresión y secreción de IL-8 se determinó en presencia de los tóxicos así como de los agentes antioxidantes N-acetil-cisteina (NAC) y tetrametil tiourea (TMTU) a una concentración de 10 mM en ambos casos, así como de 500 U/ml de un anticuerpo policlonal anti-TNF- α y de 0.25 mM de H₂O₂. Encontramos que solo ALD y LPS expresan y secretan IL-8, los dos antioxidantes y el anticuerpo disminuyeron significativamente la secreción, mientras que en la expresión se observó un mejor efecto en la disminución del mensajero con NAC que con TMTU. Los resultados nos sugieren una acumulación de H₂O₂ por la deficiente actividad de CAT, provocada por la presencia de los tóxicos, lo que permite la activación del factor nuclear κ B que a su vez promueve la expresión y secreción de IL-8. El H₂O₂ aumentó significativamente la secreción e inducción de IL-8.

I INTRODUCCION

I.1 EL ALCOHOLISMO

En México como en otros países, la ingesta de alcohol (Etanol, EtOH) es uno de los factores de riesgo más importantes en las enfermedades hepáticas. Se sabe que el consumo del alcohol en nuestro país es muy elevado, ya que el 60 % de la población adulta es bebedora, de los cuales el 43% toman de 3 veces al mes hasta diariamente (Campollo,1997).

La cirrosis es la principal complicación del alcoholismo y es uno de los problemas de salud pública más serios en el país, ya que es la sexta causa de mortalidad general y la tercera en hombres de 15 a 64 años de edad y constituye una de las diez principales causas de hospitalización en las instituciones de salud en el país, con una tasa de mortalidad elevada ya que se presentan 20.3 defunciones por 100,000 habitantes (Campollo, 1997).

Si bien la cirrosis puede ser causada por diferentes agentes etiológicos como son los virus, fármacos como el acetaminofén, drogas, etc., el EtOH es uno de los principales agentes etiológicos de la cirrosis.

I.2 METABOLISMO DEL ETANOL

Una vez que el EtOH es ingerido comienza su absorción inmediatamente por la mucosa del epitelio de la boca y como vapor, en los alvéolos pulmonares, sin embargo, la cantidad de EtOH que es absorbida por estas dos rutas es prácticamente insignificante por lo que se considera que todo el EtOH ingerido va directamente al estómago, donde es absorbido por el epitelio gástrico por simple difusión, como el agua. Una vez que el EtOH arriba al estómago es absorbido un 20 o 30% por este órgano, el resto es canalizado hacia el intestino delgado (principalmente duodeno y yeyuno) donde es finalmente absorbido. El EtOH pasa directamente a la vena porta y de ahí al hígado para ser metabolizado (Riveros-Rosas, 1997).

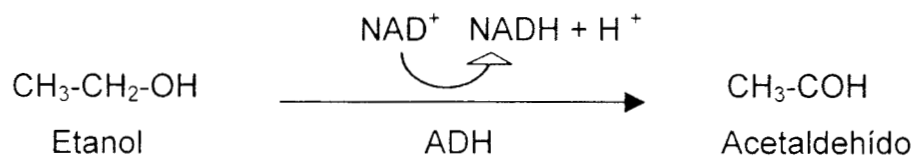
Sin embargo, se sabe que el metabolismo del EtOH inicia en el estómago, donde se encuentra una alcohol deshidrogenasa (ADH) particular de este órgano, presente en la mucosa gástrica (Riveros-Rosas, 1997). La oxidación gástrica del EtOH se le atribuye a las isoformas γ ADH y σ ADH. Se ha sugerido que niveles bajos de ADH gástrica en las mujeres es la causa del incremento en la susceptibilidad de desarrollar una enfermedad hepática alcohólica severa (Arias 1994).

Pero como mencionamos, el principal sitio de detoxificación del EtOH es el hígado, particularmente en el hepatocito, aunque se considera que las células de Kupffer (macrófagos residentes de hígado), contribuyen en parte al metabolismo del tóxico.

Existen 3 sistemas enzimáticos para dicha actividad: el sistema del ADH, el sistema microsomal etanol-oxidante (MEOS) y la catalasa en peroxisomas.

El sistema de la ADH es la principal vía de oxidación del EtOH, oxidando el 90% del EtOH ingerido. La ADH humana existe en por lo menos 20 diferentes isoenzimas las cuales están codificadas por 7 genes.

El EtOH es primero transformado en acetaldehído (ALD), por la ADH, para lo cual utiliza como aceptor de protones una molécula de nicotin-adenin dinucleótido (NAD^+).

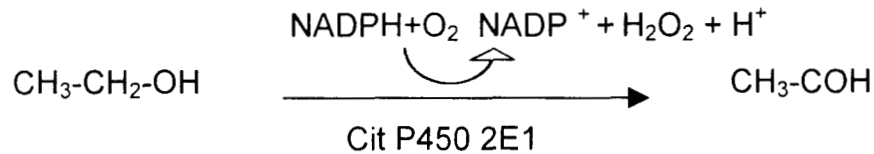


Si bien el sistema de la ADH es la vía principal de detoxificación del EtOH, se ha visto que en la ingesta crónica de EtOH la actividad de la enzima disminuye, esta disminución de la actividad se ha visto incluso en ausencia de daño hepático (Arias 1994).

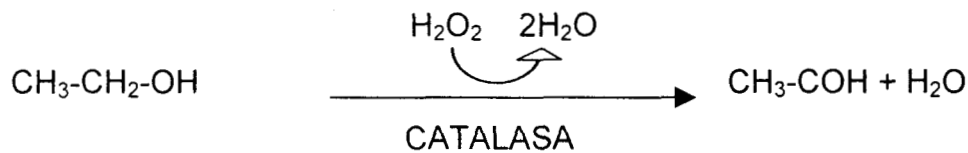
Se ha propuesto que es el sistema oxidativo microsomal (MEOS), localizado en microsomas, es el encargado de la oxidación del EtOH en la ingesta

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

El sistema MEOS cataliza la oxidación del EtOH en presencia de oxígeno y NADPH, resultando ALD, NADP⁺ y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Riveros-Rosas, 1997).

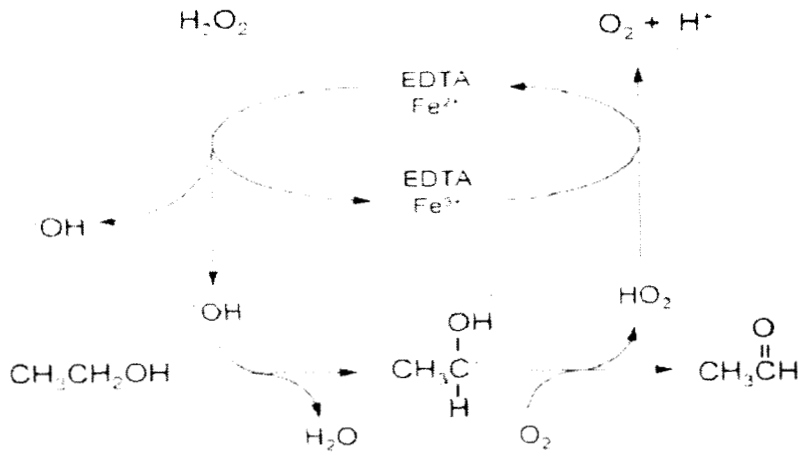


La tercera ruta para la oxidación enzimática del EtOH es la catalasa de los peroxisomas. En este sistema el EtOH es oxidado por la catalasa utilizando H₂O₂ y dando como resultado ALD y agua.



Lieber (1984) reporta que menos del 2% del EtOH ingerido es oxidado por este sistema, por lo que consideramos que contribuye en forma mínima al metabolismo del EtOH.

Existen además otras rutas no-enzimáticas para el metabolismo del EtOH, donde por medio del hierro (Fe) y utilizando al H₂O₂ como agente oxidante, el EtOH es transformado en ALD (Riveros-Rosas, 1997).



I.3 EFECTOS TOXICOS DEL ETANOL.

De manera general el EtOH puede ejercer su efecto tóxico por: la generación de Radicales Libres (RL), por la inducción de citocinas y factores de crecimiento como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β); la deficiencia en el metabolismo de lípidos, la disminución de los niveles de glutatión y finalmente por la generación de su metabolito principal el acetaldehído (ALD), el cual resulta ser más tóxico que el EtOH (Klotz, 1998).

I.3.1 METABOLISMO DE LÍPIDOS

La alteración del metabolismo de lípidos conduce a la esteatosis. En la ingesta de EtOH se reduce drásticamente los niveles de NAD^+ lo que provoca una disminución en la eficiencia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ya que los protones producidos en la oxidación del EtOH entran a mitocondria para ser utilizados, en lugar de los provenientes de la β -oxidación de ácidos grasos, lo que provoca, que éstos, que normalmente son fuente de energía, no sean usados por el hígado, ocasionando su deposito en el órgano, patología que se le conoce como hígado graso o esteatosis (Lieber, 1984).

I.3.2 GLUTATION

El glutati3n (GSH) es un trip3ptido que existe en altas concentraciones (del rango de nanomoles) en todas las c3lulas. Si bien es muy abundante en la c3lula, no est3 bien distribuido en sus organelos, ya que del 80-85% se encuentra en citosol y el resto en mitocondria. El GSH se sintetiza exclusivamente en citosol, a partir de glutamato, ciste3na y glicina, por un par de reacciones secuenciales dependientes de ATP, reacciones catalizadas por la γ -glutamilciste3na sintetasa y la GSH sintetasa (Fern3ndez-Checa, 1997).

GSH es el principal agente hepatoprotector, ya que neutraliza RL por medio de su grupo sulfhidrilo, adem3s de que sirve como sustrato en la destoxificaci3n del H_2O_2 por la GSH peroxidasa (GSHPx).

Se sabe que en gran medida, el da3o producido por los RL, se debe a una disminuci3n en el contenido de GSH, ya sea por una deficiencia en la s3ntesis *de novo*, o por una inapropiada restauraci3n del GSH oxidado (GSSG).

La generaci3n de RL se da principalmente por su metabolismo, ya que el Cit P450, en su proceso de oxidaci3n del EtOH produce una gran cantidad de RL, como el an3n super3xido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el radical hidroxietilo (Albano, 1999) y tricloroetilo, que da3an membranas por medio de la lipoperoxidaci3n (LPO), as3 como prote3nas y ADN. Sin embargo, el EtOH, por si solo puede ser citot3xico como se ha demostrado en nuestro laboratorio (Guti3rrez-Ruiz y cols., 1999; Olivares y cols, 1997).

I.3.3 EFECTOS TOXICOS DEL ACETALDEH3DO

El ALD, como se ha mencionado, es el principal metabolito del EtOH, es altamente reactivo y sumamente t3xico. Para su destoxificaci3n el ALD es metabolizado principalmente por la aldeh3do deshidrogenasa (ALDH), la cual lo transforma en acetato (Yoshida, 1998).

Existen niveles detectables de ALD en sangre e hígado después del consumo de EtOH. El ALD forma aductos con los residuos de lisina por medio de una base de Schiff, aunque también se forman aductos con residuos de tirosina y cisteína. La formación de dichos complejos ALD-proteína, se incrementan con el consumo crónico de etanol (Hill, 1998).

Estudios previos han demostrado que el ALD se une covalentemente a la membrana celular hepática, a proteínas citosólicas, al Cit. P 450, a la tubulina, a la actina, a la albúmina, a la hemoglobina y a las ARNasas, lo que impide el funcionamiento normal de estas proteínas y altera su estructura transformándolas en neoantígenos, los cuales estimulan una respuesta inmune que daña al hepatocito (Hill, 1998; Niemelä, 1999).

Por otro lado, el ALD incrementa el estrés oxidativo directamente por promover la lipoperoxidación (LPO) y de manera indirecta por disminuir los niveles de GSH.

I.4 ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHOLICA

De lo anteriormente planteado, podemos afirmar que el etanol y sus metabolitos, resultan ser altamente tóxicos para el hígado. La ingesta aguda y/o crónica del EtOH nos conduce a un estado patológico conocido como Enfermedad Hepática Alcohólica (EHA).

En los últimos años ha 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 que incluyen a los hepatocitos, las células de Kupffer, las células estelares, los neutrófilos, células endoteliales, etc. Estas células despliegan una red de comunicación mediada por citocinas, factores de crecimiento, RL y eicosanoides. Los cambios en la abundancia y función de estas células y de sus matrices dentro de la región perisinusoidal del hígado, así como en el desbalance en la red de comunicación celular, nos conducen a la patología crónica progresiva. 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 provocan que se vuelvan patológicas (Figura 1).

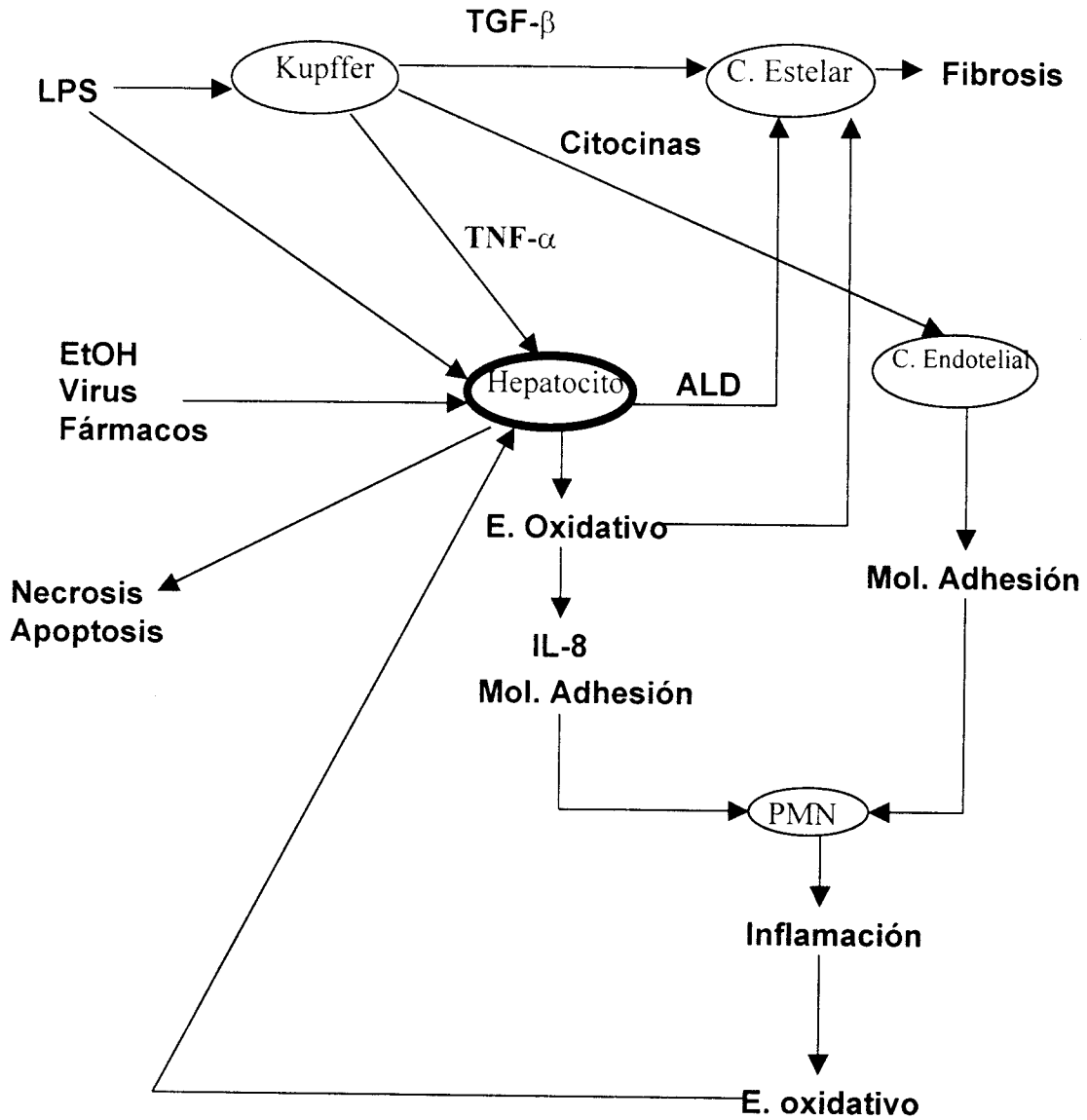


Figura 1 Interrelación celular y de mediadores en el daño hepático

I.5 ENDOTOXEMIA

En el daño hepático inducido por la ingesta de EtOH participan otros factores como son el estado nutricional del individuo y la endotoxemia. Este último aspecto ha cobrado gran importancia en la actualidad, ya que se ha visto que el abuso del alcohol favorece el desarrollo de la endotoxemia (Lands, 1995).

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

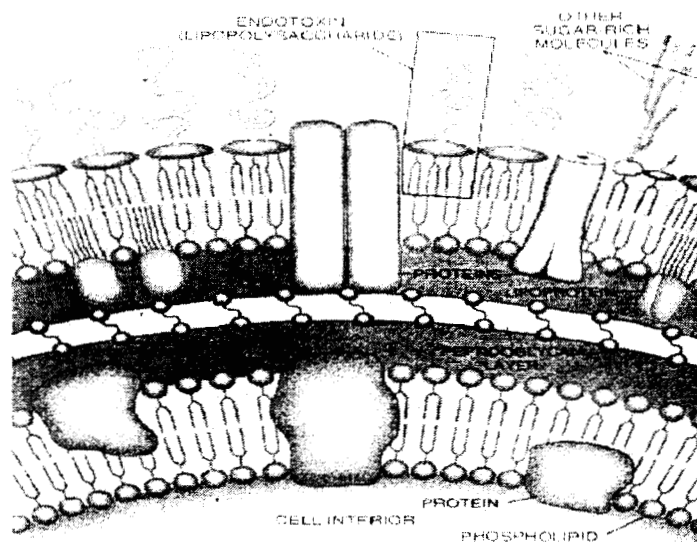


Figura 2 Ubicación del LPS en las bacterias Gram (-)

La importancia del LPS en el daño hepático inducido por la ingesta de EtOH, se ha venido estudiando desde hace varios años por algunos grupos de investigación, los cuales han aportado evidencias experimentales, entre los que se encuentran por su importancia:

- Títulos elevados de IgA anti-lípido A en 35 de 41 pacientes con EHA (Nolan, 1986)

- Hepatitis necrosante en ratas sometidas a una dieta con EtOH y LPS (Bhagwandeem, 1997).
- Lesiones necrosantes focales inducidas por LPS (Shibayama, 1991).
- Disminución del daño hepático por el bloqueo de la endotoxina (Adachi, 1995).

Entre los factores que favorecen la endotoxemia en alcohólicos se encuentran el incremento en la permeabilidad de la mucosa intestinal al LPS, la reducción en la capacidad de las células de Kupffer para destoxificar al LPS y el incremento de bacterias Gram (-) en la biota intestinal (Shenker, 1995).

Para su acción el LPS necesita de dos glicoproteínas, una proteína unidora de LPS (LBP), y una proteína receptora para el complejo LPS-LBP, conocida como CD14.

La proteína que une al LPS es una glicoproteína de 60 kD 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 µg/ml (Schumann 1990).

El LBP se une con alta afinidad al lípido A, el complejo LPS-LBP activa a la célula a través del receptor membranal CD14.

CD14 es una glicoproteína de 55 kD que está unida a membrana por un puente de fosfatidilinositol glicano (Wright, S.D. 1990).

Se ha reportado por Su y cols. (1998) que el LBP y el CD14 son inducibles en un modelo de EHA en ratas que fueron alimentadas con EtOH y con grasas insaturadas lo que provoca un aumento en el daño hepático con respecto a los animales control. Igualmente Fukui y cols (1994) reportan que el EtOH induce la producción de LBP en el hígado.

Por otro lado, diversos autores reportan que el LPS es capaz de inducir la secreción de diferentes mediadores de daño en algunos tipos celulares (Lands, 1995; Wang, 1995; Kaoru, 1997; Kayama, 1997; Lechner, 1998, Gutiérrez-Ruiz, 1999), hecho que resulta de suma importancia, ya que son estos mediadores los que se encargarán del daño hepático.

No se conoce con exactitud como participa el LPS en la iniciación y agravamiento de la EHA, sin embargo, Schenker y col. (1995) especulan que el LPS activa a las células de Kupffer, las cuales responden secretando citocinas que son liberadas al suero, lo que altera el flujo sanguíneo causando hipoxia hepática, por otro lado, se incrementa el metabolismo del EtOH lo que ocasiona una generación de ALD con sus efectos tóxicos ya explicados .

I.6 MEDIADORES DE COMUNICACIÓN CELULAR

I.6.1 CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Sin lugar a dudas, las citocinas y factores de crecimiento, son unos de los principales mediadores de la comunicación celular tanto en estados normales, como en los patológicos.

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por una variedad de células después de una estimulación con múltiples inductores. A diferencia de las hormonas, que son producidas por tejidos específicos, las citocinas son generadas por una variedad de órganos y células. Históricamente el término interleucina (IL) fue propuesto para describir a las proteínas producidas por los linfocitos que actúan sobre otros linfocitos, sin embargo, las fuentes celulares de estas proteínas no se restringe a las células del sistema inmune, sino que estos mediadores son producidos por otras células como los hepatocitos, las células estelares, las células endoteliales, etc (Simpson, 1997).

Una de las clasificaciones mejor aceptadas es aquella que las agrupa según su función en: pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimiotácticas, sin embargo, el hecho de que una citocina se incluya en un grupo, no la excluye de otro, por ejemplo: la IL-8 es quimiotáctica para células polimorfonucleares o neutrófilos, pero también es una citocina pro-inflamatoria.

Las citocinas tienen todas ellas una función fisiológica a concentraciones basales, sin embargo, en procesos patológicos como la EHA, la concentración normal se ve alterada, ocasionando un desbalance en otras citocinas, ya que muchas de ellas regulan la secreción de otras, como por ejemplo el TNF- α que

regula la inducción y secreción de IL-6, IL-8, etc., (Marie, 1999), o en el caso de la IL-4 que regula la actividad del TNF- α (Manna, 1998) al disminuir el número de receptores en la célula.

La IL-8 es una citocina pro-inflamatoria que promueve la activación, la acumulación y la quimiotaxis de los neutrófilos al sitio donde es producida, generalmente una zona dañada, donde liberan el contenido de sus gránulos (Lindley, 1998; Damme, 1994).

La IL-8 es producida por varios tipos celulares bajo una apropiada estimulación como con el TNF- α , IL-1, IL-6, LPS, entre otros, mientras que es inhibida con IL-10 y con agentes antioxidantes.

La IL-8 fue identificada en 1987, como un factor soluble presente en sobrenadantes 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 (aa) entre los dos primeros residuos de cisteína, existe otro grupo que carece de este aa las cuales pertenecen al grupo CC.

La IL-8 humana está codificada por un solo ARNm de aproximadamente 1.8 kb. El gene de IL-8 comprende 4 exones y 3 intrones y se localiza en el cromosoma 4. La quimiocina se produce como una proteína de 99 aa, pero la forma activa se presenta como una proteína de 77 aa, como es el caso de la secretada por células endoteliales y hepatocitos mientras que los monocitos secretan principalmente una proteína de 72 aa, así como otras formas de 77, 70 y 69 residuos (Lindley, 1998).

Existen en la región promotora de IL-8 dos sitios de unión para dos factores nucleares que responden a estrés oxidativo, el Factor Nuclear κ B (NF- κ B) y la Proteína Activadora 1 (AP-1, Lindley, 1998), se ha observado que la activación de NF- κ B esta mediado selectivamente por peróxidos, como el H₂O₂, el cual activa rápidamente al factor nuclear, efecto que no se observa con superóxidos o con el •OH (Dalton, 1999).

Por otro lado, AP-1 es activado principalmente por O_2^- ya que se ha observado que la inducción de este factor nuclear es bloqueada por la adición de la superóxido dismutasa (SOD) y no por la catalasa (Dalton, 1999).

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 IL-8RA es específico, ya que el otro receptor une también a 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 al estrés oxidativo, por otro lado, los neutrófilos atraídos por ella, incrementan el estado oxidante por la liberación del contenido de sus gránulos, los cuales contienen principalmente H_2O_2 , lo que agrava el problema, desde el punto de vista de oxidativo.

Se ha propuesto que en la EHA 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 de ascitis en el mismo tipo de pacientes (Martínez-Brú, 1999).

Un estudio llevado al cabo por Sheron y cols (1993), reveló que en personas sanas, no se detectaron niveles circulantes de IL-8, mientras que en pacientes con hepatitis alcohólica se hallaron niveles muy altos de la quimiocina, del orden de 600 ng/ml, particularmente en aquellos que murieron, esto se correlacionó con indicadores bioquímicos de daño hepático severo (bilirrubina, creatinina, $TNF-\alpha$, entre otros). Por otro lado se encontró una elevación de IL-8 moderada, en personas que presentaban cirrosis alcohólica (93 ng/ml) y en pacientes alcohólicos que se encontraban en abstinencia (137 ng/ml), mientras que los niveles de pacientes que presentaban hepatitis no-alcohólica presentaron niveles de 17 ng/ml.

Estudios *in-vitro* han revelado que IL-8, es secretada por hepatocitos tratados con metales, (Dong, 1998a), LPS (Dong, 1998b) y con EtOH (Shiratori, 1993), sin embargo, no se conoce como es que estos tóxicos estimulan la secreción de la quimiocina. Se sabe que en otras células el $TNF-\alpha$ está

involucrado en dicha secreción, así como el estrés oxidativo o productos de la LPO (Jayatilleke, 1998).

El TNF- α es uno de los primeros mediadores de comunicación celular secretados después de un estímulo. Se ha propuesto que el TNF- α juega un rol 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 el TNF- α estimula la secreción de otros mediadores de daño, por si solo ejerce daño citotóxico en hepatocitos de la línea celular HepG2 (Hill, 1995), parte del efecto tóxico del TNF- α se ejerce a través de un mecanismo intracelular que se desconoce, el cual bloquea el funcionamiento del complejo III, de la cadena respiratoria mitocondrial. Este bloqueo permite el incremento del O_2^- , producido por la auto-oxidación del radical ubisemiquinona acumulado.

I.6.2 RADICALES LIBRES

Los RL son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos, este hecho hace que estas moléculas modifiquen su reactividad haciéndolas más reactivas. El desbalance entre la producción de RL y el sistema antioxidante, origina un exceso de oxidantes, particularmente del O_2^- el cual se genera de manera fisiológica en la cadena respiratoria mitocondrial, así como en reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, y por los procesos de destoxificación del Cit.P450. El O_2^- es transformado por la SOD en H_2O_2 que no es un RL, pero que es precursor de una especie sumamente tóxica, el radical hidroxilo $\bullet OH$ (Halliwell, 1984).

La principal vía de generación del $\bullet OH$ es la reacción de Fenton, (Fig. 2) la cual genera al radical a partir del H_2O_2 , interviniendo el Fe^{2+} como donador de electrones (Halliwell, 1984).

El radical $\bullet OH$ está considerado como un RL sumamente peligroso por estar involucrado en la LPO, daño oxidativo a proteínas y a ADN.

Este radical 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 detoxificación del radical O_2^- , del H_2O_2 y del Fe^{2+} .

Los ácidos grasos de las membranas celulares son los principales blancos del $\bullet OH$. 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 célula para contrarrestar la presencia de RL posee un sistema de defensa el cual contiene componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los componentes enzimáticos se encuentra la SOD, la glutatión peroxidasa (GSHPx) y la catalasa, mientras que los principales componentes no enzimáticos son: el GSH, vitaminas C, E y A.

La SOD es la primera enzima que actúa en la detoxificación de RL, ella se encarga de la transformación del O_2^- en H_2O_2 . Esta enzima se localiza en mitocondria, (MnSOD), sitio principal de generación de RL y en citosol (CuZnSOD)

La GSHPx es una enzima citosólica, que tiene como cofactor al selenio, transforma al H_2O_2 en dos moléculas de agua, en la reacción participan dos moléculas de GSH que seden dos hidrógenos formando el GSH oxidado (GSSG) por medio de un enlace disulfuro. El GSSG se regenera por medio de la GSH reductasa (GSHRd) en presencia de NADPH.

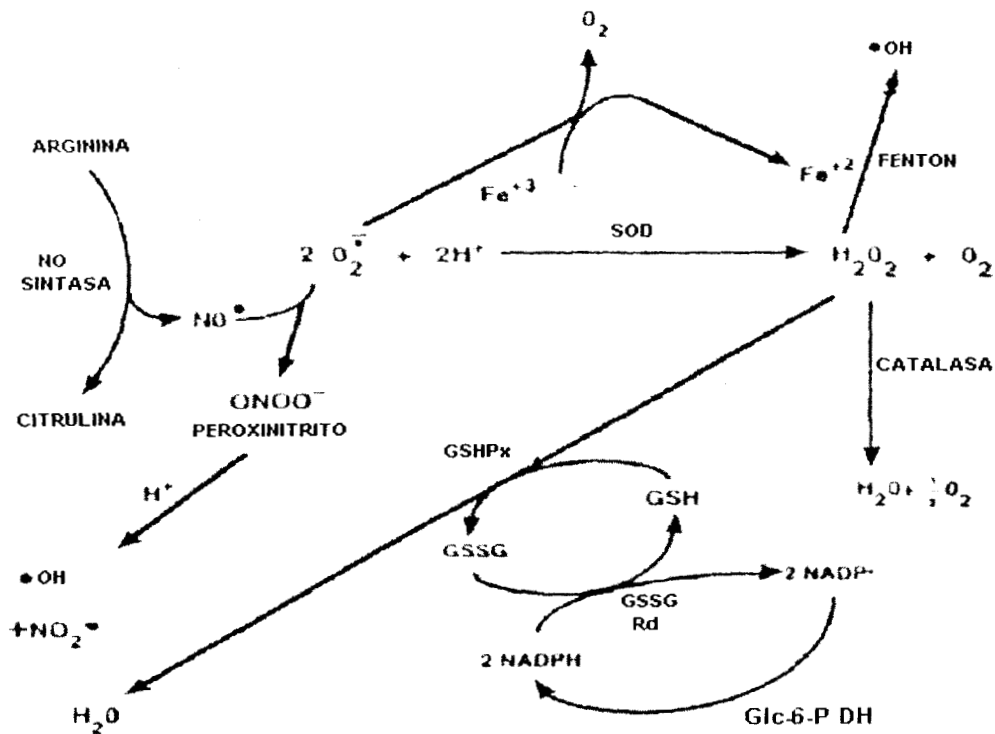


Figura 3 Esquema de las principales rutas de generación y detoxificación de radicales libres.

Finalmente la catalasa, enzima confinada a los peroxisomas, transforma también al H_2O_2 en agua por dismutación.

En nuestro trabajo de investigación, nos propusimos estudiar la relación que guarda el estrés oxidativo, generado por el EtOH, el ALD y el LPS, en la inducción y secreción de IL-8, además de conocer el papel que juega el TNF- α sobre dicha interleucina, ya que hemos considerado a la IL-8 como una citocina que se estimula por estrés oxidativo y que esta a su vez, induce estrés oxidativo de manera indirecta al atraer al hígado del paciente con EHA, neutrófilos que responden liberando su poder oxidante en el tejido hepático, lo que incrementa el número de RL que ya había sido generado por los tóxicos.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación del estrés oxidativo generado por el tratamiento agudo de etanol, acetaldehído y LPS, con la expresión y secreción de IL-8 y su relación con el TNF- α en células HepG2

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la inducción y secreción de IL-8 en cultivos de células HepG2, con tratamientos de EtOH, ALD ó LPS.

Determinar los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo generado en cultivos de células HepG2, tratadas con los agentes tóxicos anteriores.

Determinar si la inducción y secreción de IL-8 depende de la secreción de TNF- α

Determinar si la inducción y secreción de IL-8 depende del estrés oxidativo.

III. HIPÓTESIS

La secreción de IL-8 por las células HepG2 tratadas con EtOH, ALD ó LPS esta mediada por radicales libres y por el TNF- α

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.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 79, se cultivaron en medio William's (Gibco BRL), el cual se suplementó con 10 % suero fetal bovino (Hy-Clone), 100 U / ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Microlab). En adelante el medio así preparado se le llamará medio completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Nunc). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25%, (Sigma) previo lavado con 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.

IV.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 los tóxicos.

Los tratamientos que se aplicaron por separado fueron: EtOH 50 mM (Backer), ALD 175 µM (Backer) y LPS de *Salmonella typhimurium* 1 µg/ml (Sigma), todos prepararon en medio William's sin suero. Los tratamientos fueron por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Las botellas de cultivo con los tratamientos de EtOH y ALD 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 congelados a -70°C para la determinación de citocinas y las células se emplearon en las diferentes pruebas bioquímicas y para el aislamiento del ARN total.

Como agentes antioxidantes se emplearon N-acetil-cisteina (NAC, Sigma) y Tetrametil tiourea (TMTU, Sigma) a una concentración de 10 mM (Dong, 1998a). Los antioxidantes se adicionaron conjuntamente con cada uno de los tóxico en medio sin suero.

El H₂O₂ se empleó como un agente generador de estrés oxidativo a una concentración de 0.25 mM (Dong, 1998a), se adicionó en medio sin suero y los experimentos se realizaron 24 h después de su adición.

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 una hora previa al tóxico.

Todos los tratamientos se aplicaron por 24 h y cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico. Se emplearon cultivos entre los pasajes 90-112.

IV.3 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD CELULAR

IV.3.1 ROJO NEUTRO (RN)

La prueba del rojo neutro se realizó siguiendo la metodología propuesta por Borenfreund y cols. (1985), la cual se basa en la capacidad de incorporación del colorante por los lisosomas de las células viables.

Se sembraron 13×10^4 células/pozo en multicámaras de 4 pozos con medio completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, después de este tiempo, se lavaron las células con PBS y se aplicaron los tratamientos arriba mencionados. Concluido el periodo de exposición, las células se lavaron con PBS y se les adicionó el colorante RN (50 μ g/ml) por 3 h a 37°C. El colorante fue previamente incubado en medio sin suero por 24 h a 37°C y centrifugado por 10 min a 2000 g en una centrífuga (Beckman GS-15R), para remover los cristales del colorante precipitados. Posteriormente se retiró el colorante y se fijaron las células con una solución de CaCl₂ 1% y formaldehído al 0.5%. Después se adicionó 0.5 ml de una solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% para extraer el RN. Las muestras se agitaron por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el volumen

total en una celda de 800 μ l de capacidad y se leyó el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) a una longitud de onda de 540 nm. La funcionalidad se determinó por el porcentaje de absorbancia de la muestra con respecto a la absorbancia de las células control (Doyle 1994).

IV.3.2 PRUEBA DE MTT

La prueba de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil) se determinó por el método de Mosmann (1983) que se basa en la capacidad de la succinil deshidrogenasa, en mitocondria, para reducir el MTT.

Se sembraron 13×10^4 células/pozo en multicámaras de 4 pozos con medio completo y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h, después de este tiempo, se lavaron las células con PBS y se aplicaron los tratamientos arriba mencionados. Concluido el periodo de exposición, las células se lavaron con PBS y se les adicionó 0.5 mg/ml de MTT en PBS pH 7.5. La incubación fue por 3 h a 37°C. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS y se les agregó 500 μ l de una solución de HCl 0.04 N en isopropanol. Se agitaron las placas por 15 min, para disolver el formazán. Se recuperaron 250 μ l de muestra y se pasó a una celda junto con 500 μ l de la solución ácida de isopropanol. La absorbancia se leyó a 570 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro. La funcionalidad se determinó por el porcentaje de absorbancia de las muestras con respecto a la absorbancia de las células control.

IV.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACION

El grado de lipoperoxidación se determinó por el método de Buege y Aust (1978) el cual se basa en la formación de malondialdehido (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. Se sembraron 10^7 de células en botellas de cultivo de 75 cm² con medio completo, se dejó estabilizar el cultivo 24 h. Pasado este tiempo se adicionaron los tratamientos, posteriormente se retiraron los medios con los tóxicos y se lavaron las células con PBS y con un gendarme de goma se

levantaron las células, se resuspendieron en 1 ml de solución salina isotónica y se lisaron en un sonicador (Ultrasonic Processor XL2020). De este lisado se tomó 0.1 ml para una determinación posterior de proteína. A la muestra restante se le adicionaron 2 ml de una solución reactiva compuesta por ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0.5% y HCl 0.25 N. Las muestras se agitaron vigorosamente y se incubaron en un baño de agua a 100°C durante 30 min. Se dejaron enfriar y se centrifugaron a 1500 g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 535 nm de longitud de onda. La concentración de MDA se determinó de la relación:

$$C = A/\epsilon l$$

Dónde:

C = concentración de MDA

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar (1.56×10^5 /cm M)

l = grosor de la celda

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

IV.5 DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Se sembraron 2×10^7 células en botellas de cultivo de 162 cm² con medio completo, el cultivo se dejó estabilizar por 24 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se cambió el medio por uno conteniendo los tratamientos con cada uno de los tóxicos. Concluido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con un buffer de sacarosa (0.25 M sacarosa-Tris 10 mM) y con un gendarme de goma se levantaron las células de las botellas de cultivo. El homogenado celular se resuspendió en 1 ml de buffer de sacarosa y se lisaron con el sonicador. Del lisado celular se tomaron 0.05 ml para cuantificar proteína por el método de Lowry (1951) y el resto se centrifugó a 100,000 g por 90 min. a 4°C en una

untracentrifuga Beckman (TLX). Las actividades de las enzimas fueron determinadas en el sobrenadante .

IV.5.1 ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA TOTAL

La actividad de la SOD total se determinó empleando el método de Winterbourn y cols. (1975). En una serie de tubos de ensaye se preparó la mezcla de reacción 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 0.067 M pH 7.8, teniendo un volumen final de 3.0 ml, los tubos se colocaron en una cámara iluminada con lámparas fluorescentes de 15 W por un periodo de 10 min. Pasado este tiempo se agregaron a los tubos de ensaye 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM y se incubaron en la misma cámara 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 proporciona la mitad de la máxima inhibición por la enzima. La actividad se determinó por la siguiente relación:

Unidades = $1000,000/\text{Vol.}$ que resulta de la mitad de la máxima inhibición

Los resultados fueron reportados como mU/mg de proteína.

IV.5.2 ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA

La actividad de la enzima GSHPx se determinó por el método de Lawrence (1976). Se tomaron 0.5 ml de muestra a la cual se le adicionaron 0.2 ml de una mezcla de reacción compuesta por GSH 0.25 mM, H_2O_2 0.2 mM, azida de sodio 1mM, 1 U/ml de Glutación reductasa y EDTA 0.091 mM en 50 mM de Tris HCl (pH 7.6). La mezcla se dejó incubar 2 min a 37°C. Después de este tiempo de incubación se agregaron 42 μ l de NADPH 0.12 mM y las muestras se leyeron a

350 y 380 nm cada minuto. La actividad enzimática se reporta como nmol de NADP/mg de proteína por min.

IV.5.3 ACTIVIDAD DE LA CATALASA

La actividad de la catalasa se determinó por el método de Beers y Sizer (1952). Se tomaron 100 μ l de muestra y se agregaron 1.9 ml de agua, se dejó incubar por 2 min a 25 °C, posteriormente se adicionó 1 ml de una solución de H₂O₂ 59 mM en PBS 0.05 M (pH 7.0). La absorbancia de la muestra se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 240 nm en el espectrofotómetro, se repitió la lectura pasado un minuto. Los resultados se expresan como U / mg de proteína.

IV.6 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 1.5×10^6 células en botellas de cultivo de 25 cm² 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. De este volumen se tomó 0.1 ml para la determinación de proteína y el resto se utilizó para determinar los grupos tioles. 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 g por 15 min a 4°C. Del sobrenadante se tomó 0.2 ml para la determinación y se le agregaron 2.5 ml de PBS 0.05 M a pH 7.1, 800 μ l de EDTA 1mM, 30 μ l de DTNB, 50 μ l de glutati3n reductasa 100 μ l de NADPH (2 mg/ml). 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 /mg de proteína.

IV.7 AISLAMIENTO DE ARN

El aislamiento de ARN total se llevó al cabo empleando la técnica de Chomczynski (1993). Se sembraron 10^7 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 y se les agregó 0.5 ml de cloroformo, se agitó el tubo por 15 segundos y se centrifugó 10 min a 12,000 rpm a 4°C. La fase acuosa (superior) fue recuperada y se agregaron 500 μ l 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:

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

IV.8 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 μ g/ml de ARN total de cada tratamiento y se le agregaron 2 μ l de MgCl_2 25 mM; 1 μ l de ATP 10 mM; 1 μ l de GTP 10 mM; 1 μ l de CTP 10 mM; 1 μ l de TTP 10 mM; 0.5 μ l de inhibidor de ARNasa a una concentración de 10 U/ μ l, 0.5 μ L de oligo d(T)₁₆ 5 nmoles; 0.5 μ L

de transcriptasa reversa a una concentración de 50 U/ μ L y 1 μ L de un buffer para PCR 10X que contiene: 10 mM de KCl; 200 mM TRIS-HCl; pH 8.8, 100 mM de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 10% Triton X y 100 μ g/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 μ l de ADN complementario (ADNc) que se obtuvo en la reacción de RT, se le agregaron 2 μ l de MgCl_2 25 mM; 4 μ l de Buffer PCR 10X ; 31.75 μ l de agua estéril; 0.25 μ l de DNA polimerasa (AmpliTaqDNA polimerase, Perkin Elmer) a una concentración de 5 U/ μ l y 2.5 μ l 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 μ M. 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 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 calentó 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/ μ 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 geles se observaron en un analizador de geles (Phosphor Imager. Bio Rad)

IV.9 SECRECIÓN DE INTERLEUCINA-8

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

IV.10 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA.

El contenido de proteína en las muestras, se determinó por el método de Lowry y cols. (1951). Se preparó una solución de carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio 0.1 N y tartrato de sodio-potasio al 0.02% y otra con sulfato de cobre al 0.5%, se mezclaron ambas soluciones para obtener otra que denominamos Solución C. A una alícuota de la muestra se le adicionaron 5 ml de la solución C y 0.5 ml de Folín (Sigma) 1 N y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se leyó 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, 100 mg/ml.

IV. 11 ANALISIS ESTADÍSTICO

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

V. RESULTADOS

V.1 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD CELULAR

V.1.1 ROJO NEUTRO

Se evaluó la funcionalidad de las células en presencia de cada uno de los tóxicos a las concentraciones establecidos en material y métodos, por 24 h.

En la tabla 1 se muestran los valores de captación del rojo neutro por las células en los diferentes tratamientos. Se observó una disminución con respecto al control en la captación del colorante debido a la presencia de cada uno de los tóxicos, siendo del 17% en EtOH, 41% en ALD y 8% con LPS. Sin embargo solo el tratamiento con ALD mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los valores control.

Tabla 1 Captación lisosomal del colorante rojo neutro por células HepG2 expuestas a los diferentes tóxicos por 24 h.

| TRATAMIENTO | % del cambio de absorbancia (540 nm) |
|--------------------|---|
| CONTROL | 100 ± 3.2 |
| EtOH | 83 ± 4.1 |
| ALD | 59 ± 3.6 * |
| LPS | 92 ± 7.5 |

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± E.S. del porcentaje de la absorbancia de las muestras tratadas con los diferentes tóxicos con respecto a la absorbancia de la muestra de las células control $p \leq 0.05$

V.1.2 MTT

En la tabla 2 se muestra la capacidad de las células HepG2 tratadas con los diferentes tóxicos de reducir el MTT a formazán. Se observó un incremento, con respecto al control del 26.12% en EtOH y del 57.5% en ALD, mientras que con el tratamiento con LPS disminuyó 11.9%, solo el ALD mostró una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 2 Reducción del MTT a formazán por las células HepG2 expuestas 24 h a los diferentes tóxicos.

| TRATAMIENTO | % Absorbancia (570 nm) |
|--------------------|-------------------------------|
| CONTROL | 100 ± 14.3 |
| EtOH | 126.12 ± 8.6 |
| ALD | 157.5 ± 20.6* |
| LPS | 88.1 ± 3.0 |

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± E.S. del porcentaje de la absorbancia de las muestras tratadas con los diferentes tóxicos con respecto a la absorbancia de las muestras de las células control $p \leq 0.05$

V. 2 GRADO DE LIPOPEROXIDACION

Se cuantificó la formación de malondialdehído en presencia de ácido tiobarbitúrico, en las células tratadas con los tóxicos así como en las células control. Como se puede observar en la figura 4 existe LPO basal, sin embargo se observa una tendencia a incrementarse con respecto a las células control en presencia de los diferentes tóxicos presentándose un incremento de 1.8 el valor control con EtOH, de 3.5 con ALD y de 1.9 con LPS.

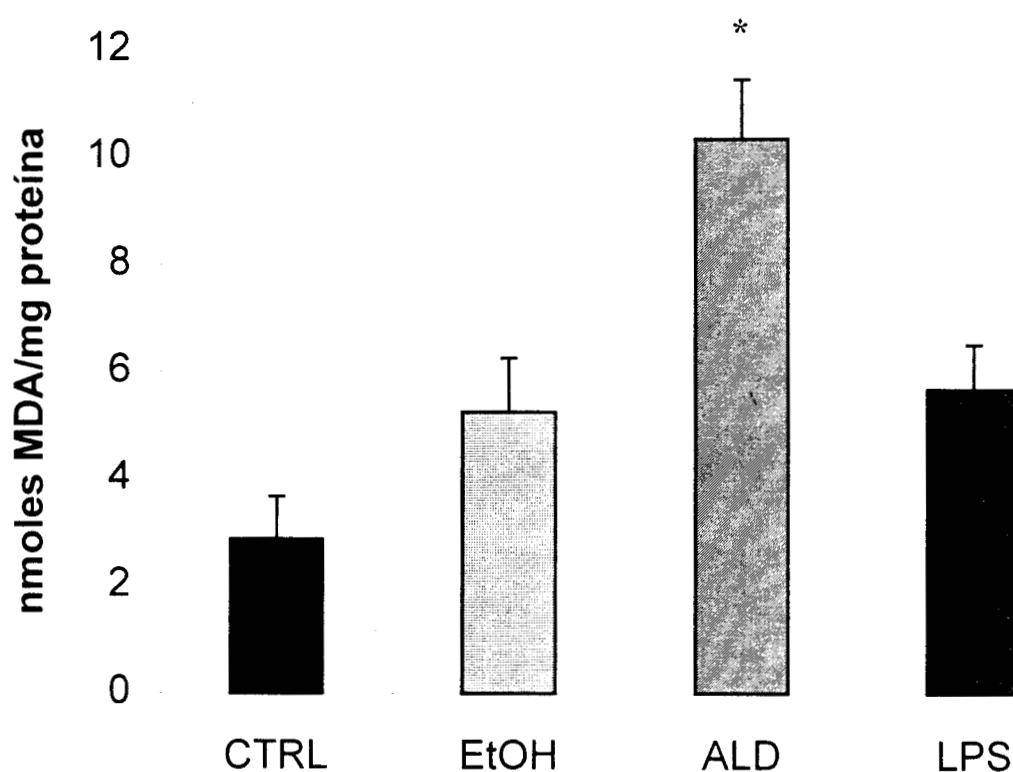


Figura 4 Producción de malondialdehído (MDA) en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

V.3 ACTIVIDADES ENZIMATICAS

V.3.1 ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA TOTAL

La actividad de SOD se determinó por el método de Winterbourn (1975) el cual se basa en la habilidad de la enzima para inhibir la reducción del tetrazolio-nitro-azul (NBT) por el radical superóxido el cual es generado por la reacción de foto-reducción de la riboflavina y el oxígeno.

En la figura 5 se observa una tendencia a disminuir en la actividad de la enzima, debido a la presencia de los diferentes tóxicos, siendo del 24.8% en EtOH, del 29.4 % en ALD y del 31.8 % en LPS respectivamente. Sin embargo, ningún tratamiento mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

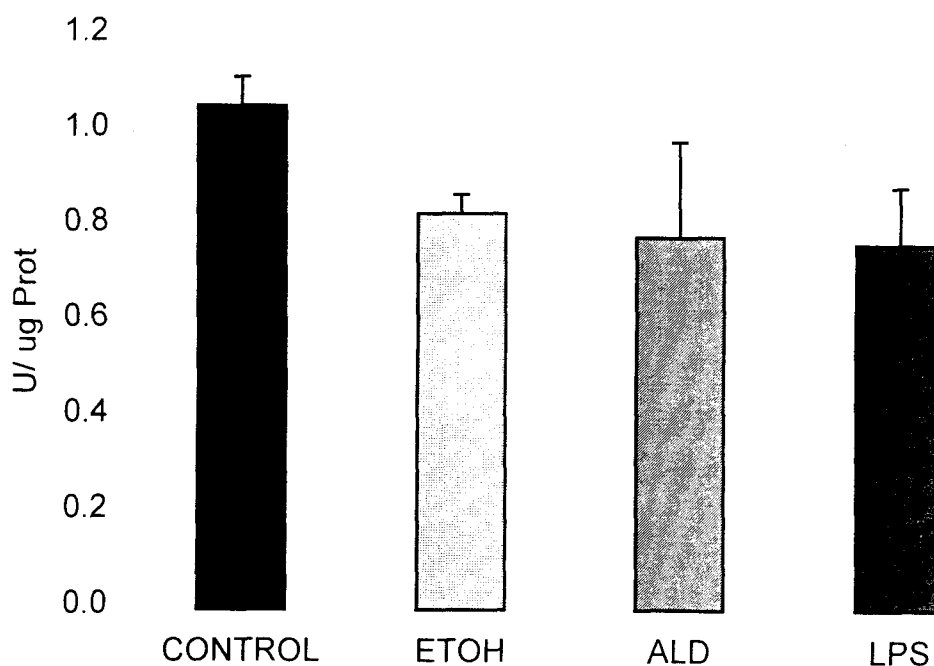


Figura 5 Actividad de la enzima superóxido dismutasa en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S.

V.3.2 ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA

La actividad de GSHPx se determinó por el método de Lawrence (1976), el cual se basa en la transformación del H_2O_2 en agua, mediado por la oxidación de NADPH utilizado por la enzima.

En la figura 6 se muestran los resultados de la prueba, observándose una tendencia a disminuir la actividad de la enzima por los tres tratamientos siendo dicha disminución con respecto al control de: 3.1 , 2.9 y 1.7 veces con EtOH, ALD y LPS, respectivamente. De manera similar a la actividad de la SOD, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos con respecto al control.

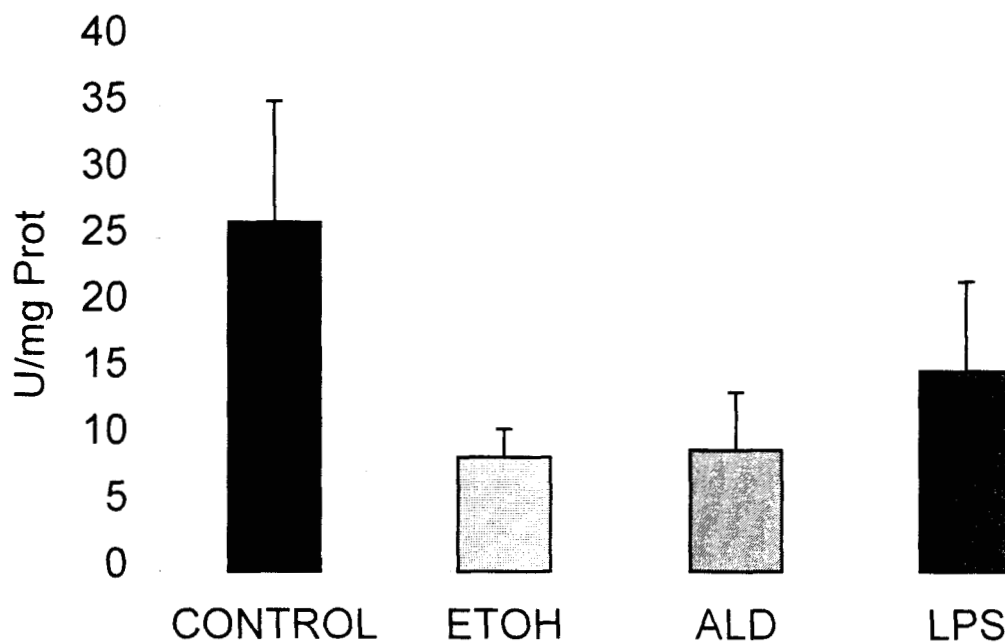


Figura 6 Actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GSHPx) en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S.

V.3.3 ACTIVIDAD DE LA CATALASA

La prueba consiste en la transformación del H_2O_2 en agua por la catalasa, seguida esta reacción espectrofotométricamente a 240 nm, entendiéndose de que una unidad de enzima descompone 1 μmole de H_2O_2 por minuto a 25°C .

La figura 7 muestra los resultados de la prueba, observándose un decremento estadísticamente significativo de la actividad de la enzima como consecuencia del tratamiento con los tres tóxicos.

Se obtuvieron valores de 663.7 ± 39.5 para el control, 440.3 ± 13.4 para el EtOH, 349.5 ± 21.6 para ALD y 441 ± 45.2 U/mg de proteína para LPS.

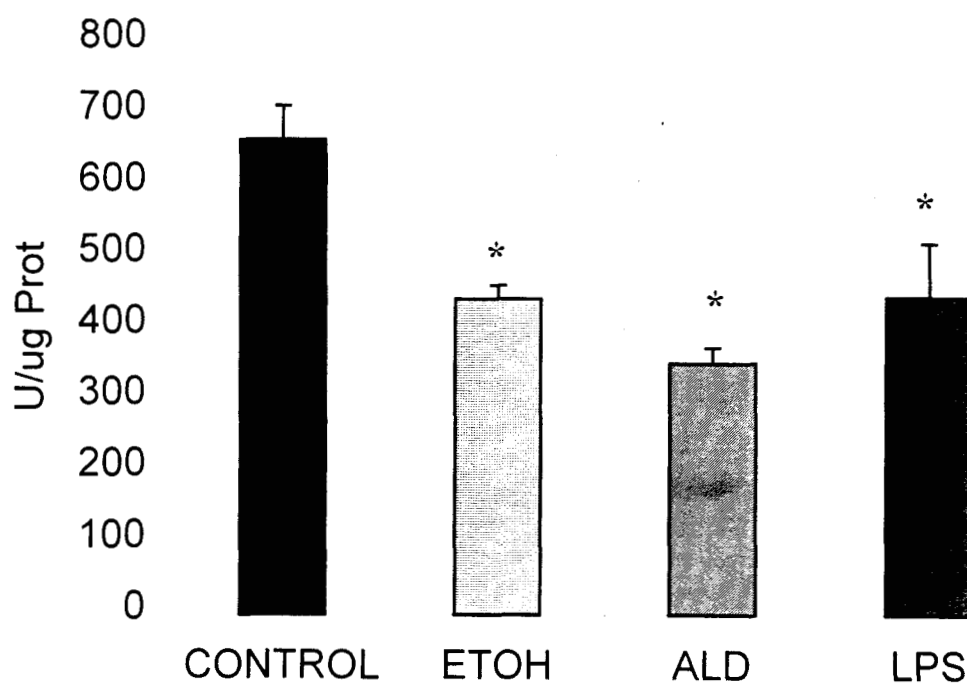


Figura 7 Actividad de la enzima catalasa en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μM de ALD y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

V.4 CONTENIDO DE GLUTATION

El contenido de GSH mostró una disminución en los tres tratamientos, como se puede ver en la figura 8, sin embargo, ninguno de ellos mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Los valores que se presentaron fueron de 201.7 ± 23.7 para el control y de 137.8 ± 31.9 , 115.9 ± 14.3 y 143.5 ± 6.0 nmol/mg de prot. para EtOH, ALD y LPS respectivamente.

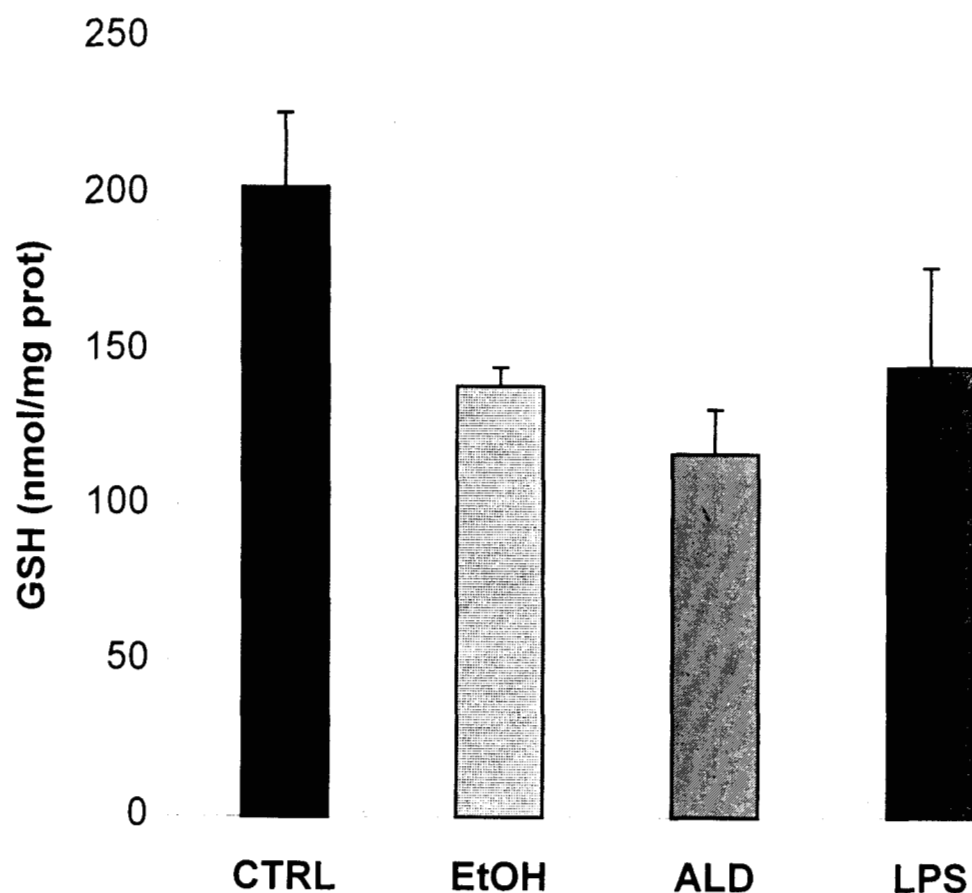


Figura 8 Contenido de Glutación en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S.

V.5 SECRECION DE IL-8

La secreción de IL-8 estudiada por medio de ensayos inmunoenzimáticos mostró que cada uno de tóxicos aumentaron la secreción de IL-8 con respecto al control, siendo el incremento de un 57.2 % para el tratamiento con ALD, 50.2% para LPS y de 38.2 % para EtOH, como se muestra en la figura 9. El ALD y el LPS mostraron una diferencia significativa con respecto al control, no así el EtOH.

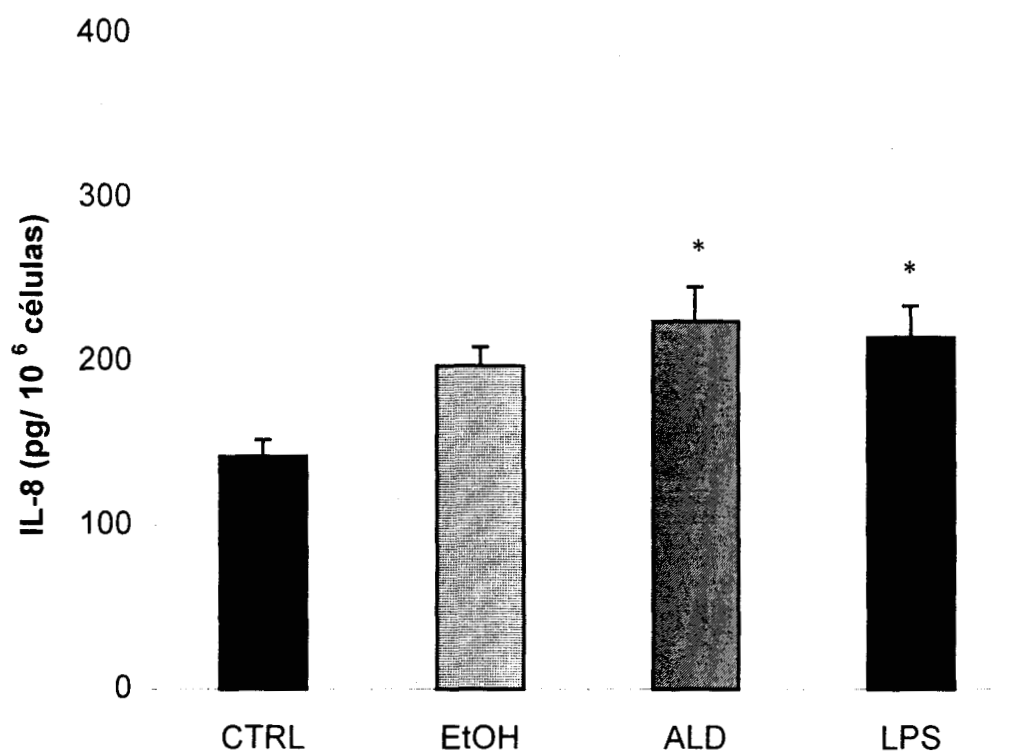


Figura 9 Secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control.

Para evaluar el papel que juega el estrés oxidativo provocado por los tóxicos en la secreción de IL-8, las células fueron tratadas con dos agentes antioxidantes: NAC y TMTU los cuales fueron agregados a una concentración de 10 mM junto con los tóxicos y se mantuvieron por 24 h. Así mismo para evaluar el papel que juega el TNF- α en la secreción de la quimiocina se pusieron 500 U/ml de anit-TNF- α una hora previa al tóxico y se dejó incubar a 37°C por 24 h.

En la figura 10 se observa un incremento en la secreción de IL-8 por las células tratadas con EtOH de un 38.2% con respecto a las células control, mientras que los antioxidantes mostraron un decremento del 87.7% para con NAC.

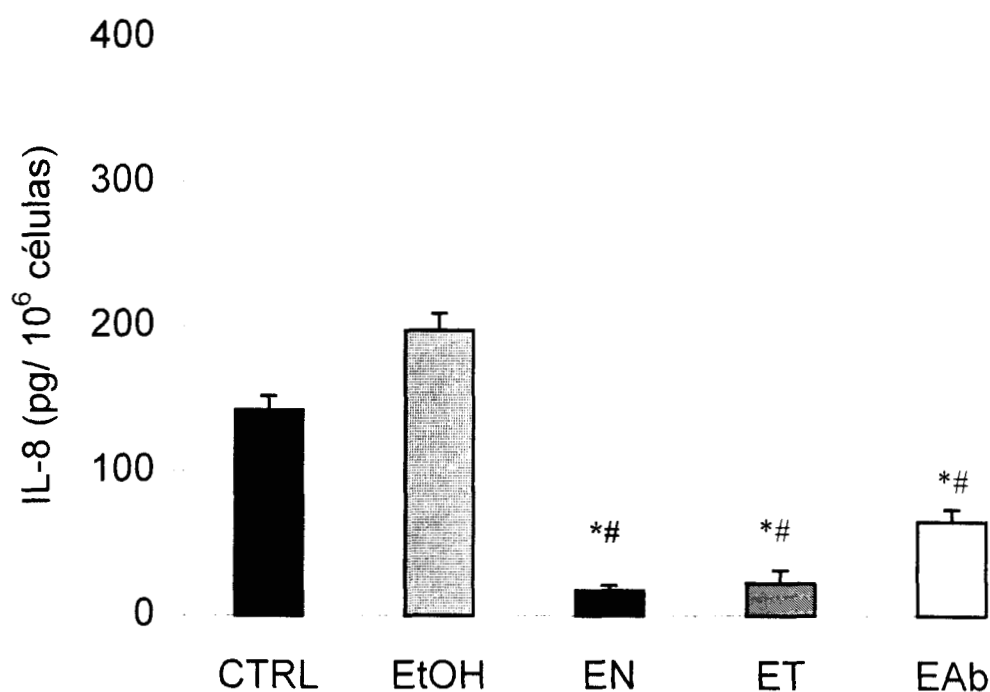


Figura 10 Secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH y 10 mM NAC (EN), 10 mM TMTU (ET) y 500 U/ml de Anti-TNF- α (EAb). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a EtOH.

(EN), 84.2% para con TMTU (ET) y con el anticuerpo se presentó una disminución del 64.0% (EAb) con respecto a las células control. Por otro lado los decrementos con respecto a las células tratadas únicamente con EtOH fue de un 91% en EN, del 88.6% en ET y del 74.7% para EAb.

La figura 11 muestra la secreción de IL-8 por células tratadas con ALD. Se observó un incremento del 57.2% con respecto a las células control, mientras que los agentes antioxidantes mostraron un disminución del 76.0% para con NAC (AN), 76.5% para con TMTU (AT) y con el anticuerpo fue de un 36.8% menos (AAb) con respecto a las células control. Por otro lado las disminuciones con respecto a las células tratadas con ALD fue de un 84.8% en AN, del 89.9% en AT y del 60.0% para AAb.

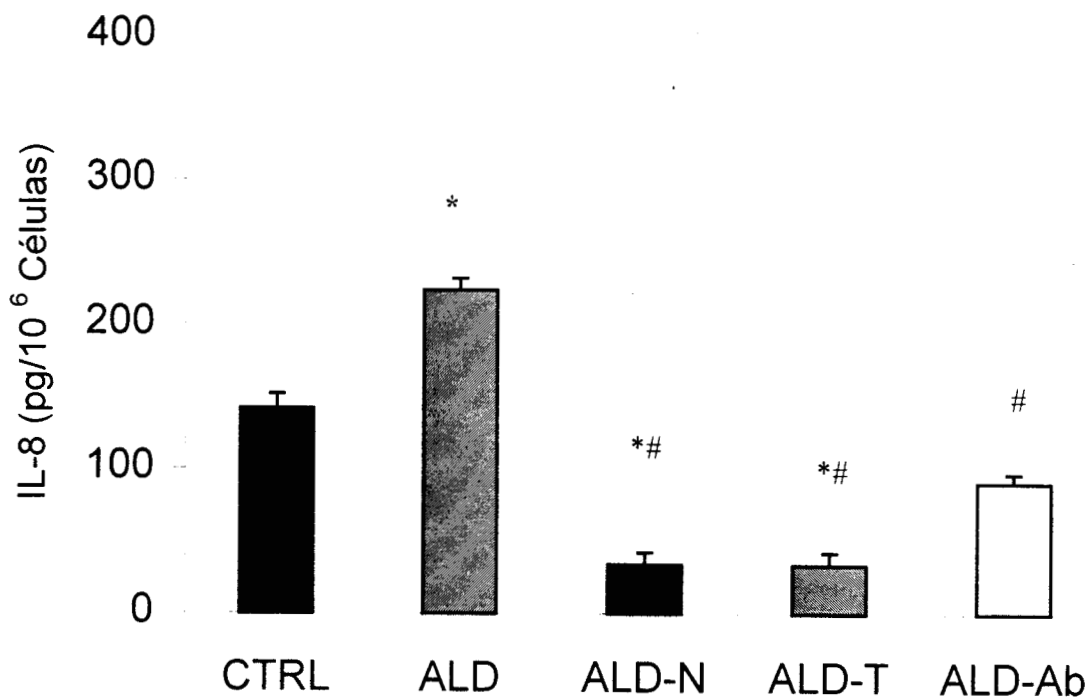


Figura 11 Secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas con 175 μ M de ALD y 10 mM NAC (AN), 10 mM TMTU (AT), 500 U/ml de Anti-TNF- α (AAb). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a ALD

La figura 12 muestra la secreción de IL-8 por células tratadas con LPS. Se observó un incremento del 50.2% con respecto a las células control, mientras que los antioxidantes mostraron un disminución del 77.4% para con NAC (LN), 76.0% para con TMTU (LT) y con el anticuerpo fue de un 66.6% menos (LAb) con respecto a las células control. Por otro lado los decrementos con respecto a las células tratadas con LPS fue de un 84.7% en LN, del 84.3% en LT y del 77.8% para Lab.

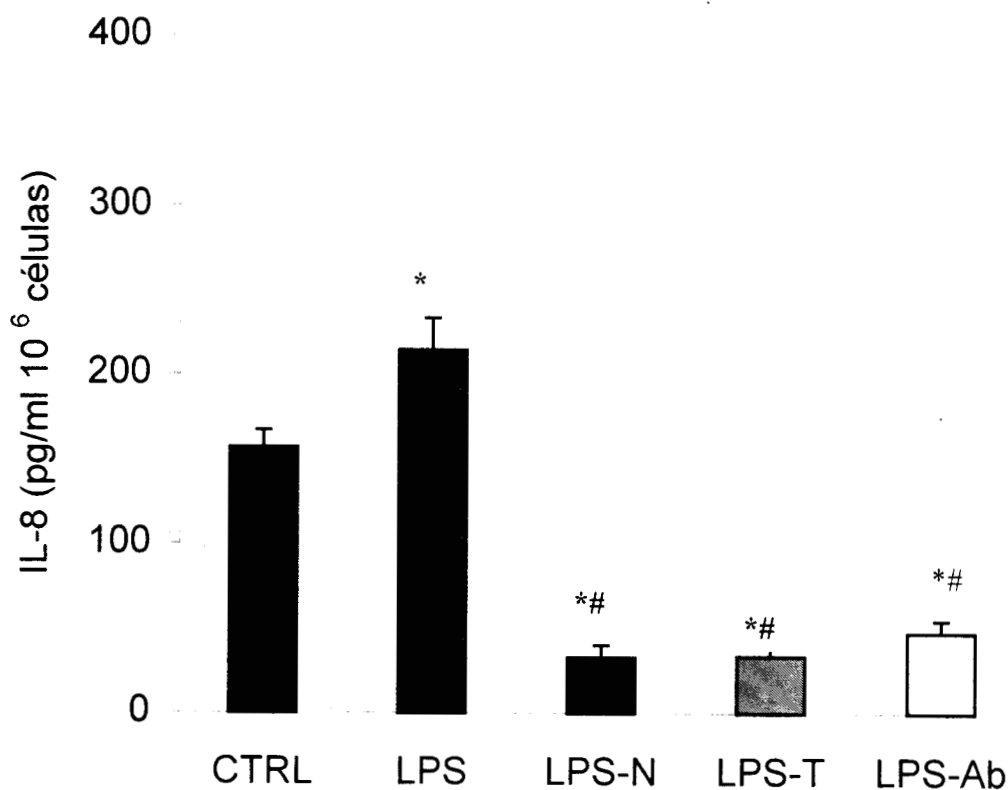


Figura 12 Secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS y 10 mM NAC (LPS-N), 10 mM TMTU (LPS-T), 500 U/ml de Anti-TNF- α (LPS-Ab). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a LPS.

Con la finalidad de evaluar el papel que juega el estrés oxidativo en la secreción de la citocina, se agregó H_2O_2 al cultivo celular a una concentración de 0.25mM y se determinó la quimiocina. En la figura 13 se puede observar un incremento en la secreción de IL-8 inducida por el H_2O_2 del 171% con respecto a las células control, mientras que los antioxidantes disminuyeron esta secreción en un 47.7% con NAC y 45.9% con TMTU por de bajo del control. Mientras que con respecto a las células expuestas al H_2O_2 se observó una disminución del 80.7% con NAC y un 80.1% con TMTU.

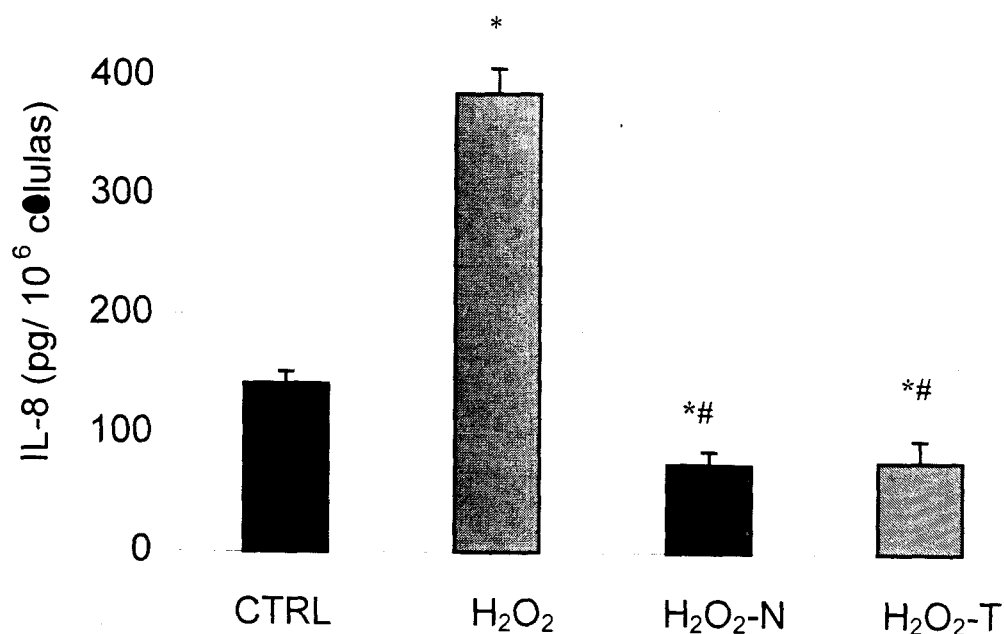


Figura 13 Secreción de IL-8 en células HepG2 tratadas con 0.25 mM peróxido de Hidrógeno y 10 mM NAC (H_2O_2), 10 mM TMTU (H_2O_2 -T). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto a H_2O_2

V.6 INDUCCION DE ARNm DE IL-8

Con el fin de conocer el impacto de los tóxicos en la inducción de IL-8, se estudiaron los mensajeros de esta citocina inducidos por los tres tóxicos, con los antioxidantes y con el anticuerpo anti-TNF- α .

En la figura 14 se observa una tendencia a incrementarse el mensajero, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el mensajero de las células tratadas con respecto al control.

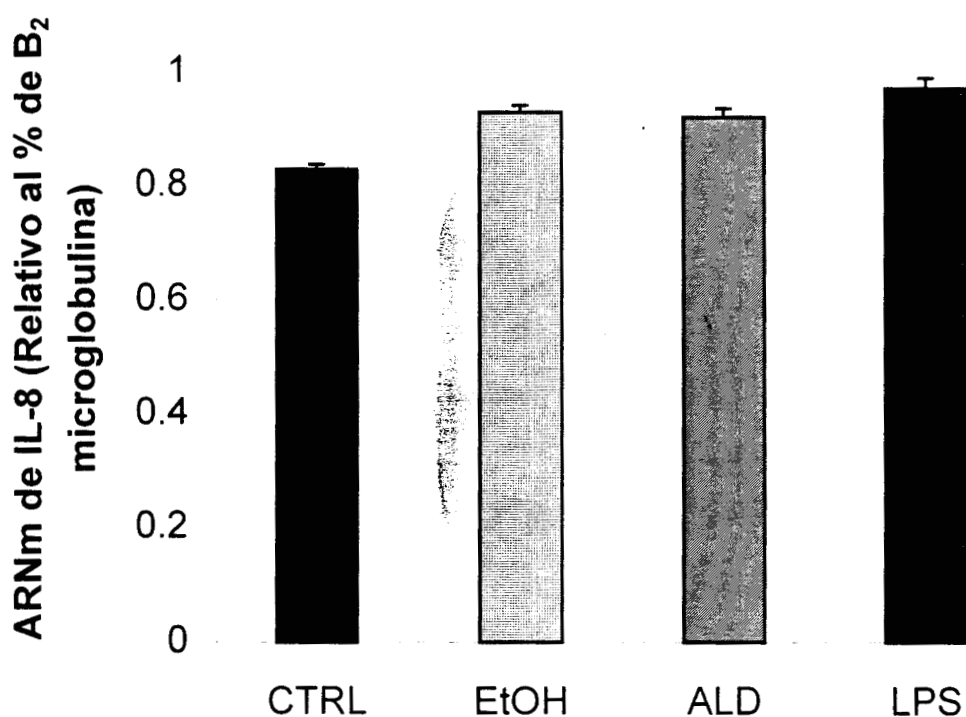


Figura 14 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, 175 μ M de ALD y 1 μ g/ml de LPS

La figura 15 muestra los resultados del efecto del EtOH en la inducción de IL-8, donde se observa un ligero incremento en la producción del mensajero de las células tratadas con EtOH, mientras que la presencia de los agentes antioxidantes y del anticuerpo disminuyó la producción siendo del 27% la disminución con NAC (EN) del 65 % con TMTU (ET) y del 40% con el anticuerpo (EAb) con respecto a las células tratadas con el EtOH y del 12% en EN, 49% en ET y 33% con EAb con respecto a las células control.

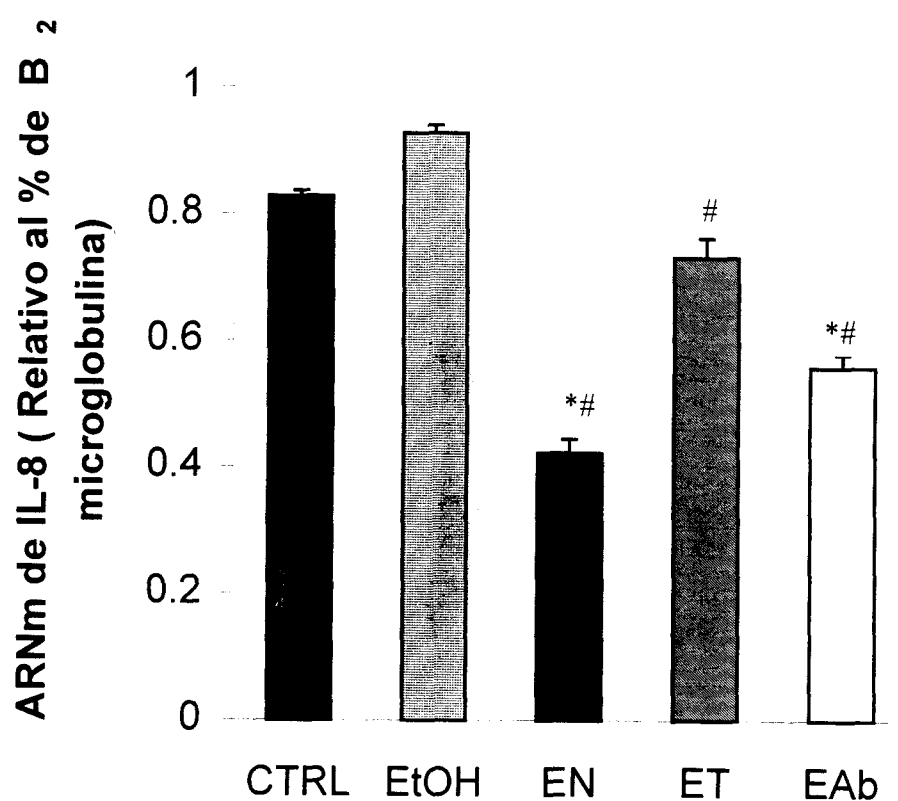


Figura 15 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 50 mM de EtOH, y 10 mM de NAC (EN), 10 mM de TMTU (ET) y 500 U/ml de Anti-TNF- α (AAb). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq$ con respecto al EtOH

La figura 16 muestra los resultados obtenidos en la inducción del mensajero de IL-8 en células tratadas con ALD por 24 h. Se puede observar un incremento del mensajero del 10.6% en las células tratadas con el ALD con respecto al control, mientras que los antioxidantes y el anticuerpo disminuyeron dicha secreción en un 48% para AN, 12% para AT y 50% para AAb con respecto a las células tratadas con ALD, y un 42% para AN, 2.8% para AT y 47% para AAb con respecto a las células control.

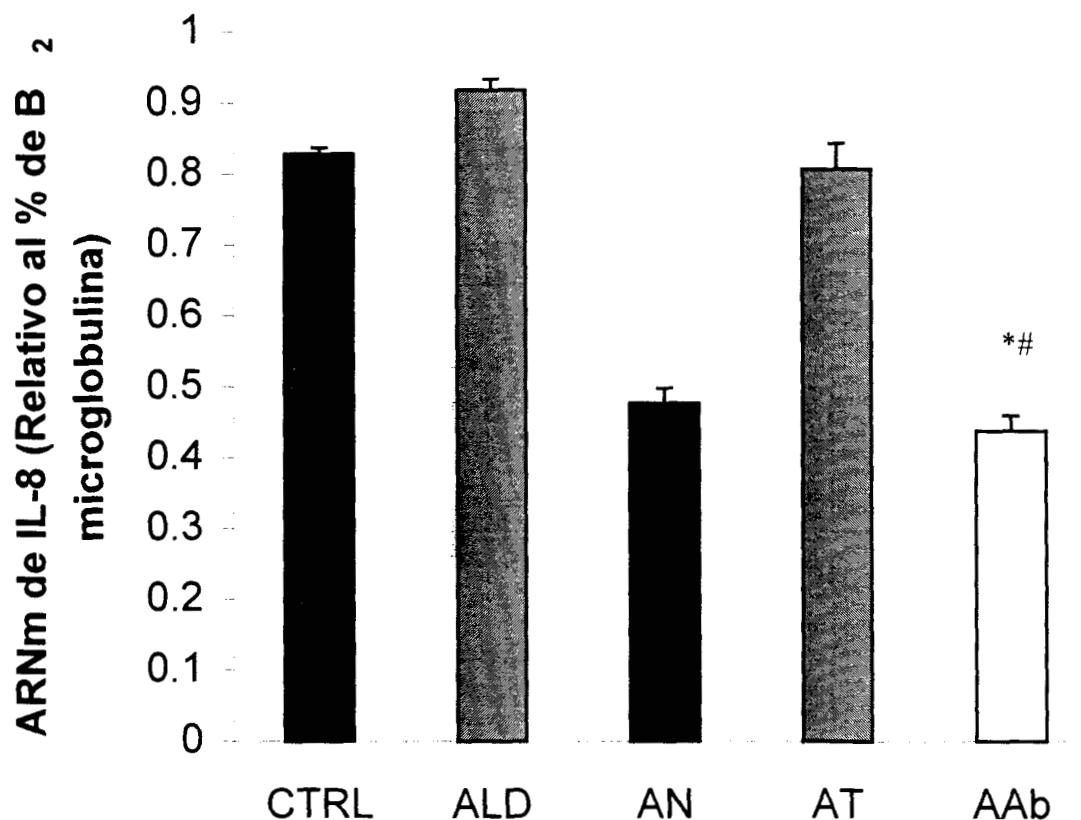


Figura 16 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 175 μ M de ALD, y 10 mM de NAC (AN), 10 mM de TMTU (AT) y 500 U/ml de Anti-TNF- α (AAb). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq$ con respecto al ALD

La figura 17 muestra el efecto del LPS en la inducción del ARNm de IL-8. Se observó un incremento en el mensajero de las células tratadas con ALD del 14%, mientras que los antioxidantes mostraron un decremento del 41% y del 0.4% con LN y LT respectivamente, el anticuerpo mostró un decremento del 53.5% con respecto a las células control. Por otro lado los decrementos con respecto a las células tratadas con LPS estuvieron del orden del 49%, 13.8% y 60% para LN, LT y LAb respectivamente.

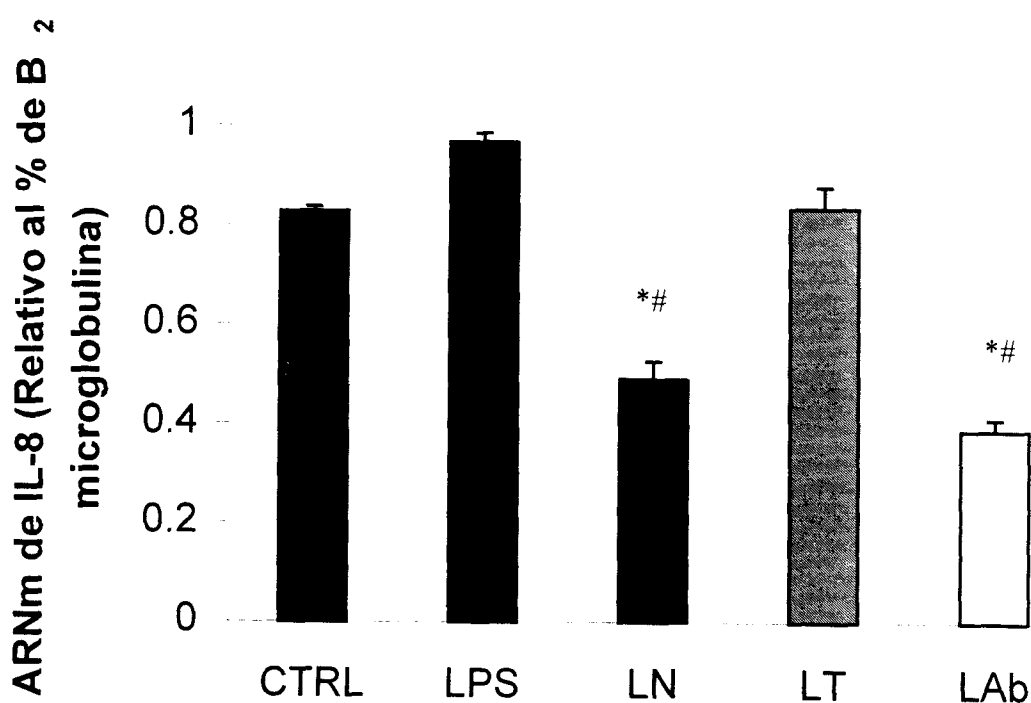


Figura 17 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 1µg/ml de LPS, y 10 mM de NAC (LN), 10 mM de TMTU (LT) y 500 U/ml de Anti-TNF-α (LAb). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± E.S. * Diferencia significativa $p \leq 0.05$ con respecto al control. # Diferencia significativa $p \leq$ con respecto al LPS

En la figura 18 se presentan los resultados del efecto del estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 en la inducción del ARNm de IL-8. Se puede observar el incremento del 21% en las células expuestas a 0.25 mM de H_2O_2 y el decremento del mensajero con los antioxidantes estando ambos un 6.5% por debajo de las células control. Por otro lado se observó una disminución del mensajero con los antioxidantes del 26% con respecto a las células expuestas al H_2O_2 .

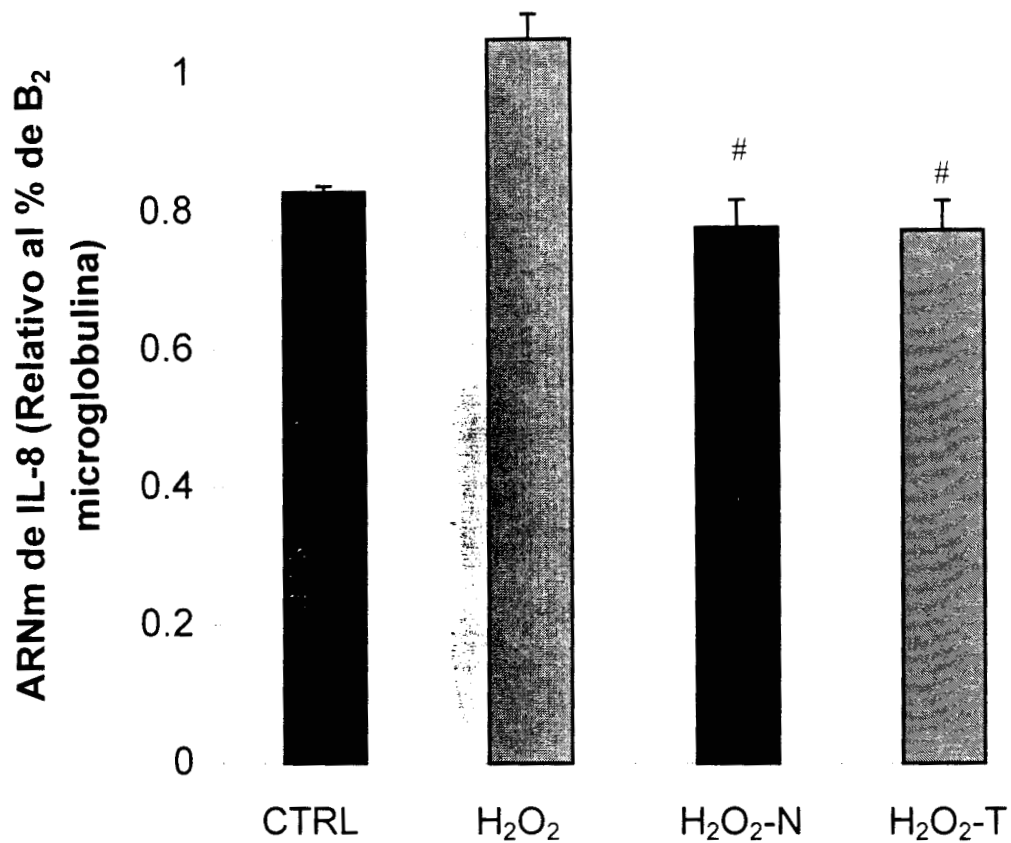


Figura 18 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 24 h con 0.25 mM H_2O_2 y 10 mM de NAC (H_2O_2 -N), 10 mM de TMTU (H_2O_2 -T). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S. # Diferencia significativa $p \leq$ con respecto al H_2O_2

Finalmente con el fin de conocer como se comporta el ARNm de IL-8 con respecto al tiempo de tratamiento, se trataron células HepG2 con 175 μ M de ALD, por ser el tóxico que mostró más daño y secreción de la citocina, por 1, 3, 6 y 24 h, figura 19.

Se encontró una disminución en el mensajero de IL-8 a las 3 h con respecto a la primera hora de tratamiento, la disminución se estabilizó a las 6 h y permanece en esos niveles hasta las 24 h de tratamiento.

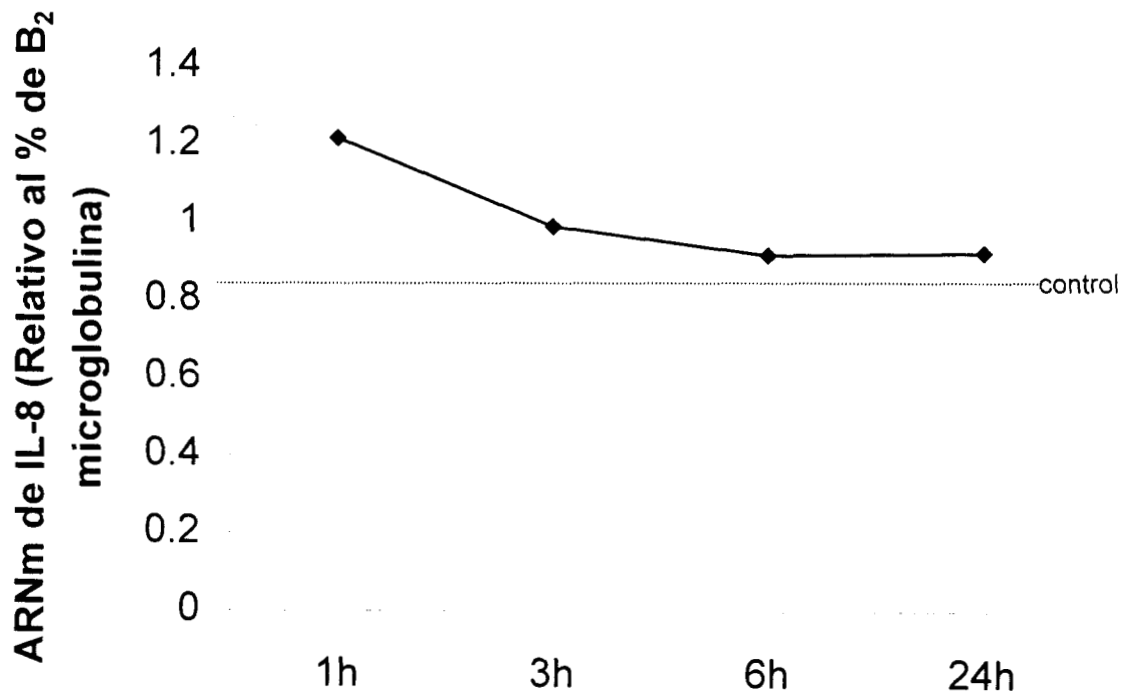


Figura 19 Inducción de ARNm de IL-8 en células HepG2 tratadas por 1,3,6 y 24 h con 175 μ M de ALD.

VI Discusión

En este estudio se investigó la relación existente entre el estrés oxidativo generado por el etanol (50mM), el acetaldehído (175 μ M) y el LPS (1 μ g/ml) en la inducción y secreción de la interleucina-8, así como la participación del TNF- α en dicho proceso, en células de un hepatoblastoma humano de la línea celular HepG2.

Primeramente se evaluó el impacto de los tres tóxicos en la funcionalidad celular. Se realizó la prueba del RN la cual reveló que el ALD ocasiona mayor daño lisosomal que el EtOH y el LPS (Tabla 1), por otro lado en la prueba del MTT se obtuvo la misma información, corroborando que el ALD es el tóxico que ocasiona mayor daño lisosomal y, en el caso del MTT, mayor daño a nivel mitocondrial (Tabla 2).

Lo anterior concuerda con estudios previos llevados al cabo en nuestro laboratorio donde se encontró que el ALD despliega mayor daño en una línea celular de hepatocitos fetales (WRL-68) tratados con 10 mM de ALD por 2 h, mientras que éstas mismas células tratadas con EtOH 200 mM presentaron menor captación de colorante por los lisosomas (Olivares y cols. 1997). Por otro lado esta misma investigación mostró una disminución en la actividad de la enzima deshidrogenasa succínica, por medio de la prueba de MTT. Los resultados que nosotros obtuvimos con la prueba de MTT nos muestran un incremento en la actividad de la enzima, principalmente con el ALD, esto puede deberse en parte a que las concentraciones de los tóxicos que nosotros usamos fueron considerablemente más bajas que las que usaron Olivares y cols. (1997), y que nuestro tiempo de tratamiento fue a 24 h, tiempo que le permite a la enzima recuperarse de un daño severo como el que se dio en los tratamientos de Olivares y cols.

Se ha sugerido que un aumento en los RL de alta energía incrementa la actividad de la deshidrogenasa succínica, enzima involucrada en la prueba de MTT. Las concentraciones de los tóxicos que utilizamos en el presente trabajo

generaron posiblemente RL de alta energía que aumentaron la actividad de la deshidrogenasa succínica.

Por otro lado, en un estudio realizado en células HepG2, Gutiérrez-Ruiz y cols. (1999) mostraron que el ALD exhibe mayor daño lisosomal a una concentración de 175 μ M por 24 h, seguido del EtOH (50 mM), siendo la disminución en la capacidad de captación del colorante por los lisosomas de las células tratadas con EtOH del 64% y del ALD del 60%. Lo que confirma nuestros resultados de que el ALD produce mayor daño citotóxico seguido del EtOH.

El grado de lipoperoxidación es un parámetro indicador de daño por RL, ya que estos al entrar en contacto con las membranas desencadenan una serie de reacciones con los ácidos grasos, desestabilizando otros sistemas internos y generando un mayor número de RL.

Los resultados que se observan en la figura 4 muestran un incremento en la producción de malondialdehído (MDA) en las células tratadas con los tóxicos, presentando mayor producción el ALD.

Portolés y cols. (1993) reportan un incremento significativo en la producción de MDA en cultivos primarios de hepatocitos de rata con diferentes concentraciones de LPS (50, 100, 200 μ g/ml), dentro de las primeras 2 h de tratamiento, este incremento cae a niveles basales a las 4 h.

Por otro lado Olivares y cols. (1997) encontraron que hepatocitos de la línea WRL-68 tratados con 200 mM de EtOH y con 10 mM de ALD durante 2 h muestran un incremento significativo en la producción de MDA.

Al GSH se le ha identificado como una de las principales entidades hepatoprotectoras por su capacidad de neutralizar RL, entre otras funciones.

En nuestro trabajo se esperaba que las células expuestas con los diferentes tóxicos mostraran cantidades muy bajas de GSH (figura 5), si bien se observa una tendencia a disminuir no se presentó una diferencia estadísticamente significativa en presencia de cada uno de los tóxicos, sin embargo, es posible que el tiempo de tratamiento sea muy largo y que las células tratadas bajen sus niveles de GSH en

las primeras horas de tratamiento y que los valores observados en la figura 5 sea un reflejo de una recuperación a las condiciones de los tratamientos empleados.

Los resultados de Olivares y cols. (1997) muestran una disminución en el contenido de GSH en las células WRL-68 tratadas con 200mM de EtOH de un 7.8% en 2 h de tratamiento, mientras que las mismas células tratadas con 10 mM de ALD mostraron una disminución del 90.5%.

Por otro lado Gutiérrez-Ruiz y cols. (1999) reportan una disminución en el contenido de GSH en hepatocitos tratadas con los mismos tóxicos y concentraciones que usamos en este trabajo coincidiendo con el nuestro en el hecho de que el ALD mostró mayor efecto en los niveles de GSH.

Posteriormente evaluamos el efecto que tienen los tres tóxicos en las diferentes enzimas antioxidantes.

La SOD total es la primera enzima que se encarga de contrarrestar la presencia de RL, ya que se encarga de la transformación de radical superóxido en H_2O_2 .

Se observó una tendencia estadísticamente no significativa en la disminución de la actividad de la enzima en las células HepG2 tratadas por 24 h en presencia de cualquiera de los tres tóxicos, (figura 2), viéndose principalmente afectada por el LPS y el ALD (31.8 y 29.4% respectivamente con respecto al control). Otro estudio *in vitro* realizado por Portolés y cols. (1993) reveló que hepatocitos tratados con 50 μ g/ml de LPS por 2 h disminuyeron su actividad en un 59% con respecto a las células control, actividad que se recuperó en un 120% a las 4 h de tratamiento.

Lo anterior nos hace suponer que la enzima SOD se recupera rápidamente al daño y que a 24 h la enzima se encuentra en sus niveles basales, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que si bien se observa una tendencia a disminuir en las células tratadas con los tóxicos, dicha disminución no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células control.

Se evaluó la actividad de la enzima GSHPx, la cual se encarga de transformar el H_2O_2 en agua utilizando al GSH como agente reductor. Se observó una tendencia estadísticamente no significativa a disminuir la actividad de la enzima en las células tratadas con respecto a las células control (figura 3). Watson y cols. (1999) en un estudio que realizaron con ratas a las cuales se les administró LPS (8 mg/kg de peso, i.v.), observaron que la actividad de la GSHPx hepática disminuye a las 24 h de haber sido administrado el LPS, sin embargo Maulik y cols. (1995) reportaron una disminución en la actividad de GSHPx una hora después de haberse administrado el LPS y una recuperación en la actividad de la enzima 24 h después de un tratamiento con una dosis baja de LPS (0.5 mg/kg peso). Lo anterior nos hace suponer que muy posiblemente la enzima tuvo una disminución en su actividad en las primeras horas de tratamiento, sin embargo a las 24 h, la actividad de la enzima estaba parcialmente recuperada a sus niveles basales. Se ha reportado que uno de los principales factores para la inhibición de esta enzima es el óxido nítrico (NO) el cual se ha reportado que inactiva a la GSHPx, pero no a la catalasa, ni a la SOD (Asahi y cols. 1995).

Otra de las enzimas antioxidantes que se evaluó fue la catalasa, la cual se encarga de detoxificar el H_2O_2 metabolizándolo en agua. En nuestro estudio encontramos que la actividad de la catalasa de células tratadas por 24 h con EtOH, ALD ó LPS mostró una disminución estadísticamente significativa, presentando el valor más bajo en la actividad las células tratadas en presencia de ALD.

Watson y cols. (1999) también reportan una disminución estadísticamente significativa a las 24 h de la actividad de la catalasa hepática de ratas tratadas con LPS (8 mg/kg peso), disminución que persiste incluso a las 70 h de tratamiento.

Reddy y cols. (1999) reportaron que en fracciones subcelulares de cerebro de rata a las que les dieron vía oral EtOH, mostraron una disminución significativa de la actividad de la catalasa.

En un estudio con hepatocitos tratados con dietil malato y con butionina sulfoximina, (Haidara, 1999), productos que alteran el estado Redox de la célula, se observó que el estrés oxidativo que se generó disminuyó significativamente la

actividad de la catalasa, mientras que la SOD y la GSHPx permanecieron sin cambios significativos.

Estos resultados nos sugieren que la catalasa es la enzima antioxidante que permanece alterada por tiempos más prolongados, incluso no logra su recuperación en tiempos largos de exposición al tóxico.

El siguiente punto que se evaluó fue la secreción de IL-8 debido a la presencia de cada uno de los tóxicos, en base a que detectamos la generación de estrés oxidativo por los tóxicos y sabiendo que en la región promotora de IL-8 se localizan sitios de unión para AP-1 y NF- κ B que son responsivos para estrés oxidativo (Dalton, 1999) se cuantificó IL-8 en los medios de cultivos de las células tratadas.

Se registró un incremento en la secreción de IL-8 en las células tratadas con cualquiera de los tóxicos, mostrando un incremento significativo en las células tratadas con el ALD y con el LPS.

Existen varias evidencias experimentales las cuales afirman que uno de los principales inductores de la secreción de IL-8 es el LPS (Dong, 1998a; Keelan, 1997; Marie, 1999; Laham, 1997) y el estrés oxidativo (Dong, 1998a, Dong1998b)

Con el fin de comprobar la participación de los RL en la secreción de IL-8, sometimos al cultivo celular a los tóxicos y a dos agentes antioxidantes, el N-Acetil-Cisteína (NAC) y Tetrametiltiurea (TMTU).

NAC es un aminotiol permeable a membranas, capaz de capturar RL. Es un precursor del GSH, que ha sido usado en clínica, como agente mucolítico y como antídoto en sobredosis de acetaminofén (Sekharam, 1998). Así mismo se ha visto que previene la invasión y metástasis de células malignas.

TMTU, por su parte, es un antioxidante que ha sido ampliamente usado como atrapador de \bullet OH (Vulcano, 1998; Dong, 1998a)

Los resultados mostraron que ambos antioxidantes disminuyeron la secreción de la citocina por debajo de los niveles normales, lo que nos indica, que

IL-8 en células HepG2 está mediado en parte por estrés oxidativo, lo que comprobamos al agregar H_2O_2 , el cual elevó significativamente la secreción.

Jayatileke y cols. (1998) encontraron que IL-8 se secretaba en monocitos, cuando estos eran tratados con MDA y 4-hidroxinonenal, productos de lipoperoxidación, y proponen que esto puede ser parte primordial en la generación del daño inducido por el EtOH.

Esta idea apoya nuestros resultados, se correlaciona muy bien el hecho de que el ALD mostró ser el tóxico que generó más LPO y más secreción de IL-8.

En la literatura se ha reportado que IL-8 esta mediada también por $TNF-\alpha$ (Locati, 1999,), para lo cual, pusimos un anticuerpo policlonal anti- $TNF-\alpha$ en los tratamientos con el fin de evaluar la participación de este factor en el proceso. Encontramos una disminución en la secreción de la citocina, disminución que no fue tan marcada como con los agentes antioxidantes, pero lo suficiente para ser significativa con respecto al control y al tóxico, esto nos sugiere que el $TNF-\alpha$ se involucra en la secreción de IL-8 en células HepG2.

El estudio del mensajero de IL-8 apoyó lo anteriormente dicho, ya que hay una correspondencia entre la inducción y la secreción de esta citocina.

En el ARNm de IL-8 de las muestras tratadas con los tóxicos durante 24 h no presentó una diferencia significativa con respecto al control, aunque mostraron una tendencia al incremento. Sin embargo, los mensajeros de los tratamientos a los cuales se les agregaron los agentes antioxidantes, se observó una disminución, principalmente con NAC, el cual, captura preferencialmente O_2^- y se ha observado que inhibe la secreción de IL-8 por la supresión en la actividad del $NF-\kappa B$ (Shimada, 1999).

El ARNm de las muestras tratadas con el anticuerpo anti- $TNF-\alpha$, mostró una disminución similar a la que se obtuvo con NAC.

Los tratamientos a los cuales se les aplicó TMTU, si bien presentaron disminución en el mensajero, no mostraron un valor tan bajo como los observados con NAC.

Si bien se muestran diferencias en la inducción del mensajero, con los dos agentes antioxidantes, esto no sucedió con la secreción, ya que ambas sustancias

mostraron una disminución muy similar en la secreción, lo que nos puede indicar que existe también una regulación postranscripcional.

Las células a las cuales se les adicionó H_2O_2 , mostraron como se esperaba un incremento significativo en la inducción del mensajero de IL-8, inducción que disminuyó drásticamente con los agentes antioxidantes.

Lo anterior nos sugiere que IL-8 pudiera estar regulada en el hepatocito principalmente por el NF- κ B.

Con el fin de conocer como se comporta el ARNm de IL-8 con respecto al tiempo de tratamiento, se trataron células HepG2 con 175μ M de ALD, por ser el tóxico que mostró más daño y secreción de la citocina, por 1, 3, 6 y 24 h

La figura 18 muestra el comportamiento del mensajero de IL-8 a diferentes tiempos de tratamiento con ALD.

La disminución del mensajero a niveles basales a las 3 h nos indica que la respuesta mediada por IL-8 se da tempranamente, efecto muy similar que hemos observado en nuestro laboratorio con otras citocinas como IL-6, TGF β_1 e IL-1 β (datos por publicar).

Una de las principales características de la EHA es la infiltración de neutrófilos en el parénquima hepático, con el consecuente proceso inflamatorio que acompaña a este fenómeno, por lo que se ha considerado que estos leucocitos juegan un papel muy importante en la patogénesis de la EHA (Maltby, 1996).

Durante mucho tiempo se ha considerado que las células de Kupffer (CK) son las principales entidades hepáticas que responden al daño secretando citocinas, entre otras IL-8, que es quimiotáctica de neutrófilos.

En el presente estudio demostramos que el hepatocito también es capaz de producirla en el modelo in vitro que hemos usado.

Los hepatocitos de la línea celular HepG2 respondieron secretando IL-8 en los tratamientos con ALD y LPS, que por un lado, confirma que el LPS juega un papel primordial en el reclutamiento de neutrófilos, vía producción de IL-8, no solo por las CK, sino también por los hepatocitos; y por otro lado, nos indica que es

necesario en el hepatocito la presencia del metabolito principal del EtOH, el ALD, para la producción de IL-8, ya que el EtOH por si solo no induce la producción de la quimiocina.

Si bien en el animal completo o en el humano con EHA la principal vía de señalización para la IL-8 son los RL producidos en el metabolismo del EtOH, en este trabajo comprobamos que el ALD por si solo puede producir significativamente estrés oxidativo que origina daño celular (Figura 4) así como producción de IL-8 (Figura 11).

Nuestros resultados muestran que la actividad de la SOD no esta del todo afectada, indicando una buena transformación del radical superóxido a H_2O_2 , por la célula, sin embargo, este peróxido, no se ve del todo detoxificado, por estar seriamente dañada la catalasa, lo que permite la acumulación del H_2O_2 .

Esto consiente que se favorezca por un lado la reacción de Fenton, con las consecuencias ya explicadas a nivel de membranas, ADN y proteínas, y por otro lado que se active el NF- κ B, que a su vez regula a la IL-8.

El LPS, no generó significativamente estrés oxidativo, pero posiblemente si genero suficientes RL para activar al NF- κ B, pues es bien sabido que la concentración de RL que se necesitan para activar genes es mucho menor a los necesarios para llevar al cabo daño celular, aún que posiblemente en el caso del hepatocito el LPS emplee otra vía de señalización para con IL-8, donde este involucrado el TNF- α , ya que en el tratamiento con LPS más el anticuerpo anti-TNF- α , se observó una disminución más pronunciada en el mensajero que con los antioxidantes (Figura 17), efecto que no se observó con los otros tóxicos.

De hecho se ha reportado que el TNF- α genera IL-8 en hepatocitos de la línea celular HepG2 (Thornton, 1990; Dong, 1998a), donde se ha tenido buena respuesta en la secreción de esta citocina.

El presente estudio demuestra que los hepatocitos, al igual que las células no parenquimatosas son altamente responsivas en la secreción de citocinas. La IL-8 secretada por los hepatocitos puede tener acciones locales, es decir, que solo actúa en el sitio de daño para facilitar la reparación. Alternativamente, esta citocina

puede no solamente estar confinada al hígado, sino que puede ser liberada a circulación donde puede contribuir al procesos patológicos extrahepáticos.

El conocimiento del mecanismo de acción de los tóxicos y de la respuesta celular, específicamente, la secreción de citocinas, permite ir avanzando en el entendimiento de la fisiopatología de la EHA, esto llevará a proponer nuevas terapias para el control y cura de esta patología, evitando que llegue a estadios más graves y peligrosos como es la cirrosis.

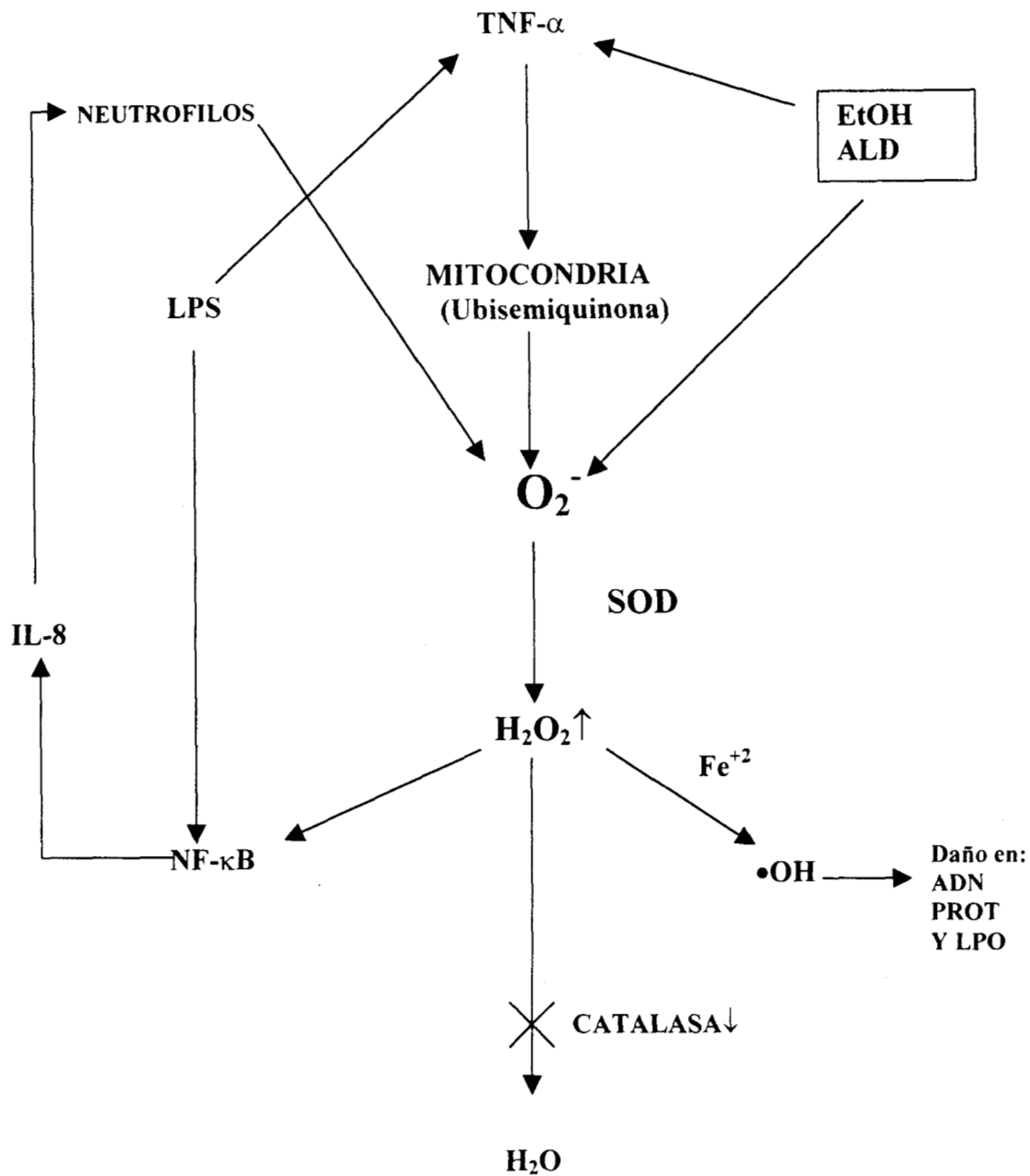


Figura 20 Representación del posible mecanismo de daño mediado por IL-8 y especies reactivas de oxígeno en hepatocitos tratados con EtOH, ALD y LPS.

VII REFERENCIAS

Adachi, Y., Moore, L.E., Beadford, B.U., Gao W, Thurman R.G.(1993) Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. **108**:218-224

Albano, E., French, S.W., Ingelman-Sundberg, M. (1999) Hidroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front. Biosci.* **4**: d533-540.

Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo H.G., Kusya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N. (1995) Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **270**: 21035-21039.

Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**:133-139

Bhagwandeem, B., Apte, M., Manwarring, L., Dickenson , J., Endotoxin induced hepatic necrosis in rats on al alcoholic diet. *J. Pathol.* **151**: 47-53.

Borenfreud E., Puerner J.A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absortion. *Toxicol. Lett.* **24**: 119-124.

Buege J.A., Aust,S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302-310.

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.

Chomczynski, P.A. (1993) Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques* **15**: 532-536.

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.

Damme, J.V. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. En: The cytokine handbook, Thomson, A.W. Editor. Academic Press, pp. 185-208.

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.

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.

Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, Fukui, H., Kitano, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., Kikukawa, M., Gressner AM, Bachem MG. (1995). Molecular mechanism of liver fibrogenesis – A homage to the role of activated fat storing cells. *Digestion*; **1158**:287-246.

Gutiérrez-Ruiz, M.C., Quiroz, S.C., souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Olivares, I.P., Llorente, L., Vargaz-Vorácková, F., Kershenovich, D. (1999) Cytokine growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. *Toxicology*. **134**: 197-207.

Haisara, K., Moffatt, P., Denizeau, F. (1999) Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **49**: 297-305.

Hernández-Pando, R., Arriaga, K., Panduro, C.A., Orozco, E.H., Larriva-Sahd, J., Madrid-Marina, V. (1998) The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. *Exp. Mol. Path.* **65**, 25-36.

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.

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.

Jayatileke, A., Shaw, S. (1998) Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol* **16**: 119-123.

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.

Kayama, F., Yoshida, T., Kodama, Y., Matsui, T., Matheson, J.M., Luster, M.I. (1997) Pro-inflammatory cytokines and interleukin 6 in the renal response to bacterial endotoxin. *Cytokine* **9**: 688-695.

Keelan, A., Sato, T., Mitchell, D.M. (1997) Interleukin (IL-)6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacteria lipopolysaccherride *Biol. Reproduction* **57**: 1438-1444.

Klotz, U., Ammon, E. (1998) Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **54**: 7-12.

Laham, N., Brennecke, S.P., Rice, G.E. (1997) Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: the effects of lipopolysaccharide and cytokines *Biol. Reproduction* **57**: 616-620.

Lands, W.E.M. (1995) Cellular signals in alcohol-induced liver injury: A Review. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* **19**:928-938.

Lawrence, R. A., Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71**: 952-958.

Lechner, A.J., Velasquez, A., Knudsen, R., Johanns, C.A., Tracy, T.F., Matuschak, M. G. (1998) Cholestatic liver injury increases circulating TNF- α and IL-6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia. *Am. J. Resp. Crit. Care Med* **157**: 1550-1558.

Li, C.P. Lee, F.Y., Tsai, Y.T., Lin, H.C., Lu, R.H., Hou, M.C., Wang, S.S., Lee, S.D. 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.

Lieber, C.S. (1984) Alcohol and the liver, update. *Hepatology* **4**:1243-1460

Lindley, I.J.D. (1998) Interleukin-8. En: Cytokines, Academic Press pp. 126-140.

Locati, M., Murphy, P.M. (1999) chemokines and chemokine receptors. Biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev. Med.* **50**: 425-440.

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.

Maltby, J., Wight, S., Bird, G., Sheron, N. (1996) Chemokine levels in human liver homogenates: Associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. *Hepatology* **24**: 1156-1160

Manna, S.K., Aggarwal, B.B. (1998) Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor mediated apoptosis, NF- κ B, AP-1 and c-jun N-terminal kinase. *J.Biol.Chem.* **273**: 33333-33341.

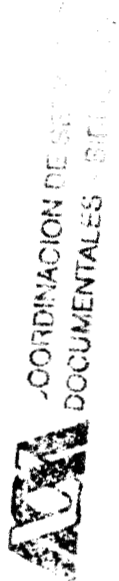
Marie, C., fitting, C., Muret, J., Payen, D., Cavaillon, UJ.M. (1999) Interleukin 8 production in whole blood assays: is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* **12**: 55-60.

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.

Maulik, N., Watanabe, m., Engelman, D., Engleman, R.M.,Kagran, V.E., Kisin, E., Tyurin, V., Cordis, G.A., Das, D.K. (1995) Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am. J. Physiol.* **269**: C907-C916.

Miranda, M., Marí, M., Ardite, E., Morales, A. (1997) GSH transport in itochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* **273**: G7-G17

Morimura, M., Tsujita, S., Nagamoto, I., Nakatani, T., Tsuji, T. (1994) Effect of alcohol on the endotoxin binding protein produced in the liver. *Alcohol and Alcoholism.* **29**: 87-91.



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

Niemelä, O. (1999) Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front. Biosci.* **4**:d506-513.

Nolan, J., Camara, D., DeLissio, m., Feind, D., Gagliardi, N. (1986) IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet.* **8474**:176-179.

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.

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.

OMS, Organización Mundial de la Salud. Informe del Comité de expertos de la OMS en la Serie de Informes técnicos núm. 650. GINEBRA 1980 (En línea).

Portolés, M.T., Ainaga, M.J., Pagani, R. (1993) The induction of lipid peroxidation by *E. coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochem. Biophys. Acta* **1158**: 287-292.

Raetz, C.R.H. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:129-270

Schenker, S., Bay, M.K. (1995) Alcohol and endotoxin: another path to alcoholic liver injury. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **19**:1364-1366.

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

Sekharam, M., Trotú, A., Cunnick, J.M., Wu, J. (1998) Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-acetylcysteine *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **149**:210-216

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

Shibayama, Y., Asaka, S., Nakata, K. (1991) Endotoxin hepatotoxicity augmented by ethanol. *Exp. Mol. Pathol.* **55**: 196-202.

Shimada, T., Watanabe, N., Hirashi, H., Terano, A. (1999) Redox regulation of interleukin 8 expression in MKN28 cells. *Dig. Dis. Sci.* **44**: 266-273.

Shiratori, Y., Takada, H., Hikiba, Y., Nakata, R., Okano, K., Komatsu, Y., Niwa, Y., Matsumura, M., Shiina, S., Omata, M., (1993) Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology.* **18**:1417-1482.

Simpson, K.S., Lukacs, N.W., Colletti, L., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. (1997) Cytokines and the liver. *J hepatol* **27**:1120-1132

Su, G.L., Rahemtulla, a., Thomas, P., Klein, R.D., Wang, S.C., Nanji, A.A. (1998) CD14 and lipopolisaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am. J. Pathol.* **152**:841-849.

Tietze, F.(1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.

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 lipopolysaccharide. *Alcoholism: Clin Exp Res* **19**:387-393.

Watson, A.M., Warren, G., Howard, G., Shedlofsky, S.I., Blouin, R.A. (1999) Activities of conjugating and antioxidant enzymes following endotoxin exposure. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**:63-69.

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.

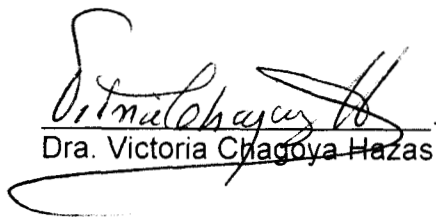
Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complex of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433.

Yoshida, A., Rzhetski, A., Hsu, L.C., Chang, C. (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* **251**:549-557.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis el día 3 de julio del 2000.



Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz



Dra. Victoria Chagoya Hazas

Dra. Florencia Vargas Vorácková