

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

---

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**ESTUDIO DE LA ENDOTOXEMIA COMO UN POSIBLE  
FACTOR CO-MORBIDO EN LA PATOGENESIS DEL  
DAÑO HEPATICO INDUCIDO POR ETANOL EN UN  
SISTEMA MODELO *IN VITRO***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A :**

**BIOLOGA SILVIA CLAUDIA QUIROZ AMBRIZ**

MEXICO, D. F.

1999

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo dirección de la **Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz** y con la asesoría del **Dr. David Kersenobich** del Instituto Nacional de la Nutrición.

Agradezco al **CONACYT** el apoyo brindado durante mis estudios por medio de la beca con número de registro 91613. Asimismo, el presente proyecto contó con el apoyo del **CONACYT** con número de convenio 400200-5-0442PM y 400200-5-25175M.

---

A la Dra. **Concepción Gutiérrez**:

Gracias por su comprensión, confianza y por aceptarme en su laboratorio para la realización de este trabajo experimental. Aunque hubo algunos contratiempos con su ayuda logré terminar este trabajo.

“Todo éxito, por mínimo que sea, es digno de valorarse”.

Agradezco sinceramente a la **Dra. Teresa I. Fortoul Vandergoes**, al M. C. **Adrián Roldán Zarate**, al M. C. **Silvia Antuna Bizarro** y al fotógrafo **Francisco Pasos** del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el apoyo para la realización de las micrografías de microscopio electrónica de transmisión.

*La duda ha sido la guía en el sendero de la Ciencia*

---

## Dedicatorias

A mis hijos:

**Kitzia Walewska y Rafael** la razón de mi vida. Espero comprendan el tiempo que no les pude dedicar y valoren el esfuerzo que realice. Pero el buen éxito está en la satisfacción de lo alcanzado. "Gracias".

A mi esposo:

**Rafael**, a pesar de todos los contratiempos que se presentaron en el desarrollo de esta tesis, siempre ha estado a mi lado y con los frutos que la vida nos dio. Nuestro pasado y futuro no se pierde porque no lo tenemos. Aprovechemos el presente: éste si es nuestro y pensemos en el futuro para lograr mejores metas para nuestros hijos. Gracias por tu amor y comprensión.

A mis padres:

Salvador y Celerina, que pensaron que sería difícil llegar a un peldaño más, les puedo decir gracias por no dudar de mí.

A mis hermanos con cariño:

Martha, Lilián, Salvador, Francisco, Patricia, Rosalba.

A mis abuelitos:

Eduwiges y Gregorio con mucho afecto

---

A la Sra. Teresa y al Sr. Rafael:

Les agradezco el apoyo, confianza y experiencia que me han brindado.

A Diana Edna:

La inteligencia, antes debe enfrentar los retos de la vida para después definirla. Los logros alcanzados será la suma de tus esfuerzos.

A Ana María :

La gratitud solo exige un pago. "Gracias", por tu valiosa ayuda.

A la M. en B.E. **Irma Patricia Olivares Jiménez:**

Le agradezco su amistad, compañía, colaboración y asesoría técnica que me brindó para la realización de esta tesis.

Un ave en extinción. " Es la amistad "

A la Dra. **Leticia Bucio Ortiz:**

Gracias por el apoyo técnico y amistad que me proporcionó.

A la M. en C. **Elvira González:**

Le agradezco su asesoría para la determinación de colágena.

A mis compañeras de laboratorio:

Verónica, Elizabeth, Piedad, Cecilia, Carmen, Blanca.

---

## INDICE DE ABREVIATURAS

ACH	Acetaldehído
Acetil Co-A	Acetil Coenzima A
DHA	Deshidrogenasa Alcohólica
ADN	Acido Desoxirribonucleico
af	autofagosoma
aG	aparato Golgi
ALAT	Alanin Amino Transferasa
ANOVA	Análisis de Varianza
ASAT	Aspartato AminoTransferasa
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin Trifosfato
ATCC	American Type Cultive Collection
°C	Grado Centígrado
CD14	Glicoproteína
cit	citoplasma
clg	colágena
cm	cuerpo mielínico
cp	cisterna perinuclear
cr	cromatina
CYP2E1	Isoforma Citocromo P450 Especifico Etanol
D.S.	Desviación estándar
EDTA	Acido Etilendiamino-Tetra-Acético
en	envoltura nuclear
EtOH	Etanol
DTNB	5,5'- Ditiobis-Acido-Nitrobenzoico
g	gravedad
GSH	Glutati3n Reducido
GSSG	Glutati3n Oxidado
gl	gotas lípidos
glu	gluc3geno
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
h	hora
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LBP	Proteína Uni3n Lipopolisacárido

LDH	Lactato Deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacáridos
LPS+EtOH	Pretratamiento endotoxina con etanol
LPS+ ACH	Pretratamiento endotoxina con acetaldehído
m	mitocondria
mg	material granular
min	minutos
MEM	Medio Mínimo Esencial
MDA	Malondialdehído
MEOS	Sistema Oxidativo Microsomal
mp	membrana plasmática
mU	Miliunidades
n	núcleo
NAD	Nicotinamida Adenín Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Reducido
NF $\kappa$ B	Factor Nuclear Transcripcional
nm	nanómetro
P450	Citocromo P450
PBS	Solución Amortiguadora Fosfatos
p-DBA	Paradimetil Benzaldehído
pn	poros nucleares
r	cuerpos residuales
rpm	revoluciones por minuto
REL	Retículo Endoplásmico Liso
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
SDS	Dodecil Sulfato Sodio
-SH	Grupos Sulfhídricos
TBA	Acido Tiobarbitúrico
TCA	Acido Tricloroacético
TNF- $\alpha$	Factor Necrosis Tumoral alfa
v	vacuolas
vc	vesículas con clatrina

# INDICE

página

I.	<b>INTRODUCCION</b> -----	1
I. 1	Cirrosis- Problema de Salud Pública -----	1
I.2	Generalidades de endotoxinas -----	3
I.3.	Endotoxemia en alcohólicos -----	5
I.4.	Tipos celulares del hígado -----	8
I.5.	Metabolismo del etanol -----	11
I.6.	Mecanismo del daño hepático producido por etanol -----	13
I.6.1.	Lipoperoxidación -----	15
I.6.2.	Glutación -----	16
I.7.	Toxicidad del acetaldehído -----	18
I.8.	Toxicidad del etanol y acetaldehído, sobre la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular en hepatocitos y células estelares hepáticas -----	19
I.9.	Cultivos celulares como modelo de estudio -----	21
II.	<b>OBJETIVO</b> -----	24
III.	<b>JUSTIFICACION</b> -----	25
IV.	<b>HIPOTESIS</b> -----	27

---

V.	<b>MATERIAL Y METODO</b>	28
V. 1.	Cultivos celulares	28
V.2.	Tratamientos	29
V.2.1.	Determinación de la concentración del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas	29
V.2.2.	Tratamiento a corto plazo	30
V.2.3.	Tratamiento a largo plazo	30
V.2.4.	Pretratamiento con el lipopolisacárido (LPS)	31
V.3.	Microscopía	31
V.3.1.	Microscopía óptica	31
V.3.2.	Microscopía electrónica de transmisión	32
V.4.	Prueba citotoxicidad de células de la línea HepG2 y estelares hepáticas	32
V.5.	Determinación de las actividades enzimáticas	33
V.5.1.	Actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH)	34
V.5.2.	Actividad extracelular de Aspartato Amino Transferasa (ASAT)	34
V.5.3.	Actividad extracelular de Alanín Amino Transferasa (ALAT)	35
V.6.	Determinación del grado de lipoperoxidación	36
V.7.	Determinación del contenido de glutatión (-SH)	37
V.8.	Determinación del contenido de proteína por el método de Lowry	38
V.9.	Determinación cuantitativa de hidroxiprolina	39
V.10.	Análisis estadístico	40

---

VI.	<b>RESULTADOS</b>	41
VI.1	Línea celular a celular HepG2	41
VI.1.1	Prueba citotoxicidad (Ensayo de Rojo Neutro)	41
VI.2.	Determinación de las actividades enzimáticas en medios de cultivo	44
VI.2.1.	Determinación de la actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH)	44
VI.2.2.	Determinación de la actividad extracelular de Aspartato Amino Transferasa (ASAT)	46
VI.2.3.	Determinación de la actividad extracelular de Alanín Amino Transferasa (ALAT)	48
VI.3.	Determinación del grado de lipoperoxidación	50
VI.4.	Determinación del contenido de glutatión	52
VI.5.	Microscopía electrónica de transmisión	56
VI.6	Células estelares hepáticas (CFSC-2G)	68
VI.6.1	Prueba citotoxicidad (Ensayo de Rojo Neutro)	68
VI.7.	Determinación de las actividades enzimáticas en medios de cultivo	69
VI.7.1	Determinación de la actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH)	69
VI.8.	Determinación del grado de lipoperoxidación	71
VI.9.	Determinación del contenido de Glutatión	73
VI.10.	Determinación de colágena	76
VI.11.	Microscopía electrónica de transmisión	80
VII.	<b>DISCUSION</b>	91
VIII.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	107

# I. INTRODUCCION

## I.1. Cirrosis – Un Problema de Salud Pública

Las enfermedades hepáticas debidas al etanol son uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial. No es fácil evaluar el impacto actual del alcoholismo en México. Sin embargo, existen algunos indicadores que permiten suponer que el problema se ha incrementado en los últimos años.

La información médica con relación a la enfermedad por alcoholismo era limitada hace algunos años, porque no se apreciaba la toxicidad intrínseca del alcohol. Se le consideraba principalmente un problema social o de comportamiento. Sin embargo, la incidencia de un solo problema médico, la cirrosis hepática, ha llegado a tal magnitud que representa por sí misma, un problema de salud pública. En México, la cirrosis hepática se atribuye a la ingesta de etanol en un 64% de los casos y en menor proporción a infecciones virales (Dajer y col, 1978). En 1995, en nuestro país, la cirrosis hepática fue uno de los principales problemas de salud pública, ya que se consideró la sexta causa de mortalidad general y la tercera entre la población económicamente activa, principalmente en hombres de 15 a 64 años, después de los accidentes y los homicidios (Secretaría de Salud, 1995; Organización Panamericana de la Salud-México, 1997).

A nivel mundial, un consumo de etanol elevado *per capita* se ve asociado a tasas de mortalidad elevadas. México no parece apegarse a este patrón, ya que la mortalidad por cirrosis hepática, cuando es correlacionada al consumo de etanol, es cuatro veces mayor que en los Estados Unidos de Norteamérica y otros países (Dajer y col., 1978; Galambos, 1979).

La enfermedad hepática alcohólica es una consecuencia de la ingesta prolongada de etanol. Presenta un amplio espectro de lesiones, siendo las más características la esteatosis o hígado graso, la hepatitis alcohólica, la fibrosis y finalmente la cirrosis. Sin embargo, aunque la esteatosis es muy común entre

los alcohólicos, solo el 20% desarrollan enfermedades hepáticas más graves. Se ha reportado que las deficiencias alimenticias provocan que el daño hepático producido por el etanol progrese con mayor rapidez; sin embargo, el daño en el aspecto bioquímico y nutricional puede ser producido en animales intoxicados crónicamente con etanol y con un aporte nutricional adecuado (Lindros, 1995), por lo tanto, el etanol puede ser considerado por sí solo un agente hepatotóxico.

Se considera que una ingesta diaria de más de 80 g de etanol (equivalente a una botella de vino) más el número de años de consumo pueden incrementar el riesgo de desarrollar cirrosis hepática (Leibach, 1975; Kershenovich y Milke, 1996). Sin embargo, hay autores que han reportado, que no hay influencia entre el tiempo, la cantidad de etanol y tipo de bebida consumida con la incidencia en el desarrollo de la cirrosis (Sørensen, 1989). En la actualidad, no se ha encontrado un marcador genético, así como tampoco se han logrado identificar con certeza factores de riesgo ambientales específicos. No obstante, es probable que tanto los factores genéticos como ambientales contribuyan a la expresión de problemas relacionados con el consumo de etanol en cada individuo (Kershenovich y Milke, 1996). Así, queda sin responder el por qué el hígado de una gran mayoría de alcohólicos sufre un daño menor a pesar de los muchos años de ingerirlo, mientras otros desarrollan cirrosis después de pocos años de consumirlo.

La cirrosis hepática es la expresión final de diversas enfermedades del hígado, provocada por varios agentes etiológicos: drogas hepatotóxicas como el etanol, infecciones virales y alteraciones inmunes o genéticas. Es un proceso difuso caracterizado por fibrosis y alteración de la arquitectura normal sinusoidal del hígado con formación de nódulos de regeneración. La fibrogénesis hepática es un proceso dinámico que se inicia por el daño agudo y se continúa por un proceso crónico degenerativo. Se caracteriza por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular principalmente colágena tipo I y III, las cuales son sintetizadas y secretadas por las células estelares hepáticas, y otros tipos de proteínas de matriz como: proteoglicanos

(dermatán y sulfato de condroitina), glicoproteínas incluyendo fibronectina, laminina y tenascina (Arthur, 1995, Friedman, 1999). Estos hallazgos indican que las células estelares y otras células sinusoidales del hígado pueden contribuir en la patogénesis de la fibrosis post-alcohólica, regulando la degradación de la matriz extracelular en el hígado. Se considera que esta acumulación se produce tanto por un incremento en la síntesis de estas proteínas, como por una disminución en su degradación. Se ha reportado que el hígado cirrótico llega a contener aproximadamente 6 veces más de colágena y proteoglicanos que el hígado normal (Gressner y Bachem, 1995).

## **I.2. Generalidades de endotoxinas**

Las endotoxinas son componentes de la pared externa de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. Producen múltiples alteraciones patofisiológicas, siendo una de las más características la respuesta inflamatoria aguda. La estructura química de las endotoxinas contiene polisacáridos y lípidos; por lo que se les ha denominado lipopolisacáridos (LPS) (Rietschel y Brade, 1992; Rietschel y col., 1994).

Los LPS de todas las familias de las bacterias Gram-negativas contienen un lípido altamente conservado, la región antigénica denominada lípido-A, la cual es capaz de mimetizar efectos biológicos de los lipopolisacáridos (Galanos y col., 1985), este lípido representa el centro endotóxico de los LPS que producen la infección (Rietschel y col., 1994; El-Samalouti y col., 1997).

Se ha reportado que los LPS de las bacterias Gram-negativas inducen daño en varios órganos, provocando estrés oxidativo debido al incremento de especies reactivas de oxígeno y daño lipoperoxidativo de las membranas celulares (Bautista y col., 1990; Kovacheva y Rivarov, 1996), en corazón (Manson y col., 1985) y el tracto gastrointestinal (Arvidsson y col., 1985). La endotoxina se puede acumular en tejidos donde se encuentran células del

sistema reticuloendotelial, como es el caso del hígado y el bazo (Sugino y col., 1987).

El mecanismo de transducción de la señal del receptor de la endotoxina se lleva a cabo, mediante la interacción de glicosilfosfatidil inositol (GPI) anclado a una glicoproteína (CD14) en la superficie de las células, cuando está presente la proteína unidora (LBP) del LPS (Martin y col., 1992). Estas dos glicoproteínas están implicadas en la interacción celular y molecular de la endotoxina y las células de Kupffer. La primera, la proteína unidora de los LPS, presente en suero normal, reconoce y une a la endotoxina con una afinidad alta a través del lípido-A. El complejo LPS-LBP activa a las células a través de una segunda glicoproteína, la CD14, la cual se encuentra en la membrana de las células de Kupffer. Incrementos en la expresión del LBP y CD14 se correlacionan con la presencia de cambios necro-inflamatorios en modelos experimentales de la enfermedad hepática alcohólica (Lands, 1995).

Se ha observado que cantidades picomolares a nanomolares de endotoxina pueden interaccionar con el CD14 en la superficie de las células de Kupffer cuando el receptor LBP está presente (Martin y col., 1992). El señalamiento intracelular procede rápidamente a través de una tirosín-cinasa, el factor nuclear transcripcional  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y dos proteín-cinasas (Han y col., 1993; Ulevich y Tobias, 1994). Las tirosín-cinasas participan en la transducción de las señales celulares y son reconocidas como los mediadores de señales receptoras celulares que inducen la expresión génica (Avruch y col., 1994). Este patrón de señalización parece estar estrechamente relacionado con la red de señales participantes en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.

El factor NF $\kappa$ B presente en el citoplasma de las células de Kupffer de forma inactiva, puede activarse por estímulos como la endotoxina y mediante estrés oxidativo. Una vez activado el complejo, entra al núcleo y se une a su secuencia consenso activando determinados genes. El complejo NF $\kappa$ B actúa sobre genes de las citocinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas que

generan mediadores de inflamación, receptores y moléculas de adhesión que juegan un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación. Así, el incremento coordinado en la expresión de muchos genes causa la liberación de productos que median respuestas inflamatorias e inmunes.

### **1.3. Endotoxemia en alcohólicos**

La endotoxemia es producida por la presencia de endotoxinas en el torrente circulatorio, que son componentes lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; producidas en el intestino por la flora normal, se encuentran en la circulación portal en bajas concentraciones y son generalmente removidas del sistema reticuloendotelial hepático. Los lipopolisacáridos son los responsables de algunos efectos pato-fisiológicos como la respuesta sistémica inflamatoria aguda y pueden inducir daño hepático activando a las células de Kupffer (Sadd y col., 1995).

Se ha reportado que pacientes y animales de experimentación con daño hepático frecuentemente presentan endotoxemia en la circulación portal y sistémica (Le Moine y col., 1995; Thurman, 1998; Keshavarzian y col., 1999). Se ha observado que niveles elevados de endotoxina en la circulación portal causan daño en el tejido hepático. El mecanismo de daño de la endotoxemia está pobremente entendido, pero se ha relacionado con la recaptura del LPS por el intestino. El mecanismo del incremento en la permeabilidad intestinal en alcohólicos, quienes desarrollan cirrosis, no está esclarecido; sin embargo, se considera que el cambio de pH y la permeabilidad de la mucosa intestinal causada por la exposición aguda de etanol, incrementan la liberación de la endotoxina del intestino hacia la circulación y posteriormente dentro del hígado se inicia la cascada necro-inflamatoria hepática. Este cambio en la permeabilidad puede deberse a factores genéticos o ambientales tales como el estado de la flora intestinal (Mao y col., 1996).

Algunos reportes establecen que hay una relación entre el desarrollo del daño hepático producido por etanol y la endotoxemia sistémica (Nolan, 1981; Nolan y col., 1986, Bode y col., 1987; Arai y col., 1989; Fukui y col., 1991). Sin embargo, el mecanismo por el cual el etanol induce endotoxemia puede ser multifactorial. El incremento en la concentración de la endotoxina se puede explicar posiblemente por una alteración del pH de la mucosa intestinal que resulta en un aumento de la permeabilidad a las endotoxinas (Bay y col., 1995; Lands, 1995), así como, por una reducción de la capacidad de las células de Kupffer para detoxificar a la endotoxina. Se considera que el incremento en la concentración de la endotoxina en la flora intestinal puede ser importante en la iniciación del agravamiento de la enfermedad alcohólica. Se ha reportado que en pacientes alcohólicos se incrementan las concentraciones plasmáticas de endotoxina, correlacionándose con el daño hepático (Bode y col., 1987; Fukui y col., 1995).

El mecanismo de endotoxemia y la cirrosis es un proceso dinámico, el cual puede ser explicado por la alteración en el sistema de inactivación de la endotoxina en la sangre de pacientes cirróticos, en asociación con las proteínas de unión a la endotoxina. Las proteínas que son necesarias para la unión de la endotoxina son las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ulevich y col., 1979), transferrina (Berger y Berger, 1987), y la proteína de unión del lipopolisacárido (LBP) (Schuman y col., 1990). La mayoría de las proteínas de unión para la endotoxina son sintetizadas por los hepatocitos.

Fukui y col. (1994), reportaron que se presenta un incremento en la producción de la proteína unidora (LBP) del lipopolisacárido, cuando se agregó a hepatocitos el medio condicionado de células de Kupffer las cuales fueron tratadas con etanol. Estos resultados sugieren que el etanol puede potenciar la producción de proteínas de unión a la endotoxina. Este efecto puede atribuirse a mediadores liberados de las células de Kupffer, debido a que el etanol no puede alterar directamente la producción de proteínas de unión a la endotoxina en un sistema de cultivo en hepatocitos.

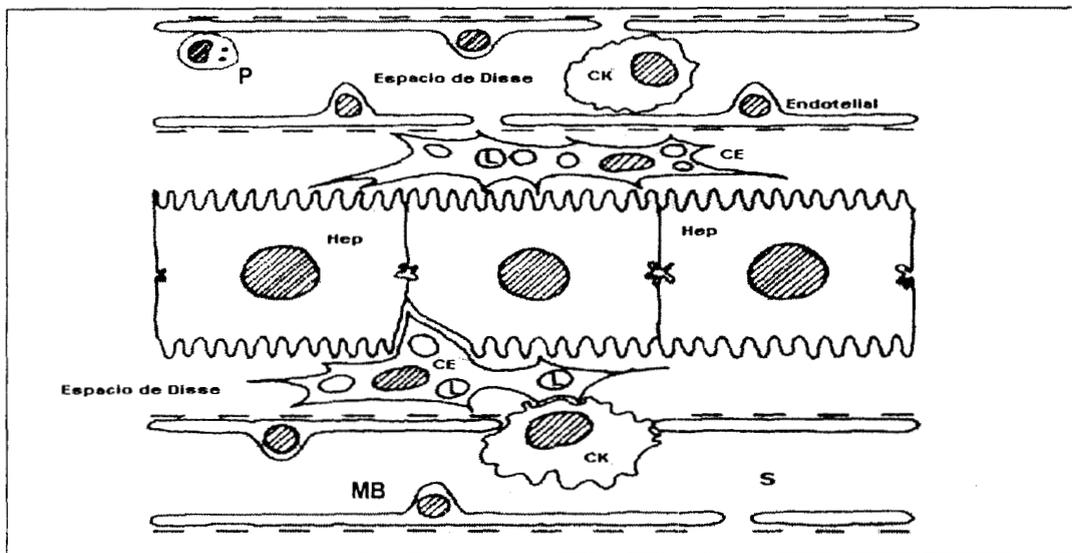
Algunas investigaciones apoyan la hipótesis de que las células de Kupffer están involucradas en el daño hepático causado por etanol. Existen evidencias de que los LPS pueden participar en procesos de patogénesis a nivel celular activando a las células de Kupffer, las cuales liberan productos reactivos que dañan a los hepatocitos. Este tipo celular desempeña un papel importante en el mecanismo de defensa contra el efecto tóxico de la endotoxina (Toth y Thomas, 1992; Lindros, 1995); la proteína de unión del lipopolisacárido (LBP) sintetizada en los hepatocitos explica la participación de las células de Kupffer y los hepatocitos en el proceso de limpieza de la endotoxina.

En la literatura se menciona la importancia de los LPS en la enfermedad alcohólica hepática, en donde se ha reportado que el suero en 35 de 41 pacientes con alteración hepática producida por etanol contiene títulos elevados de IgA antilípido-A (Nolan, 1989). Bhagwandeem y col. (1987), encontraron que ratas con una dieta equilibrada adecuada conteniendo etanol más LPS desarrollan hepatitis con puntos focales de necrosis, mientras que los animales que no recibieron LPS únicamente presentaron esteatosis sin lesiones. Asimismo, se ha reportado que en ratas la administración de LPS produce daño hepático que incluye necrosis en las células del parénquima y en los neutrófilos, los cuales están involucrados en la génesis del daño hepatocelular (Jaeschke y col., 1996).

Se ha reportado que los LPS de las bacterias Gram-negativas inducen lesiones focales necróticas en la parte central del lóbulo hepático en ratas a las que se les administró etanol (Shibayama y col., 1991; Boron-Kaczmarska y col., 1992). Existe una correlación entre los niveles plasmáticos de la endotoxina y la severidad del daño hepático inducido por el etanol (Nanji, 1993). Adachi y col. (1995), reportaron que el LPS disminuye el proceso de detoxificación en células de Kupffer bajo condiciones tempranas de ingesta de etanol; sin embargo, el bloqueo de la producción de la endotoxina puede disminuir el daño hepático. Estos sucesos explican la acción de la endotoxina asociado con la enfermedad hepática alcohólica y la intervención temprana sobre este evento puede disminuir el subsiguiente daño hepático.

#### I. 4. Tipos celulares del Hígado

El hígado es la glándula más grande del organismo, está formada por células del parénquima o hepatocitos (células epiteliales) y cuatro tipos celulares no parenquimatosos asociados con los sinusoides: las células endoteliales, las células de Kupffer, las células "pit" y las células estelares hepáticas, los cuales se representan en la figura 1.



**Figura 1.-** Esquema que representa la estructura de los componentes hepáticos, constituidos por elementos de membrana basal (MB), células del parénquima (Hep). Las células endoteliales forman una capa fina de los sinusoides (S). Las células de Kupffer (CK) que son macrófagos, las células "pit" con actividad de células natural killer (P), y las células estelares hepáticas (CE) localizadas en el espacio perisinusoidal de Disse, éstas últimas almacenan en el citoplasma el 80% de los retinoides de todo el organismo en forma de palmitato de retinol en gotas de grasa (L).

Los hepatocitos son la unidad funcional del hígado. Se encuentran empaquetados en forma de malla en el plano central del canalículo biliar y están rodeados por sinusoides en ambos lados. A este respecto, el hígado

tiene la estructura de una glándula endocrina. El citoplasma de estas células muestra una variación considerable que depende de la actividad funcional, en particular del almacenamiento de glucógeno y grasa. Los hepatocitos son los responsables del metabolismo hepático participando en las vías metabólicas del ciclo de la urea, regulación específica del metabolismo de los lípidos, formación de bilirrubina y ácidos biliares. Estructuralmente el hepatocito está constituido por 3 regiones: 1) superficie basolateral (perisinusoidal y paracelular); 2) la región contigua o intercelular; 3) el canalículo biliar. A su vez, con base en la circulación, presenta una zona periportal (zona 1 del acino) y perivenosa (zona 3, centrolobular) estableciéndose una regionalidad metabólica en función del flujo sanguíneo, como resultado de una disminución gradual del sustrato disponible y de oxígeno. Los hepatocitos se mueven lentamente de la zona periportal, en donde ocurre la división, hacia la zona perivenosa. El movimiento transzonal depende de la vida media de los hepatocitos. En ausencia de daño es aproximadamente una tercera parte de la vida media del organismo. La secreción exocrina de la bilis, se lleva a cabo en la región del polo apical del hepatocito presente en la membrana canalicular alrededor de la periferia de las células parenquimatosas. Esta polaridad del complejo de señales intracelulares es capaz de dirigir correctamente los procesos de síntesis y secreción del tejido hepático.

Las células endoteliales se encuentran en el límite externo de los sinusoides. Tienen numerosas funciones entre las que se encuentran: el transporte activo de distintos sustratos, la coagulación, la respuesta inmune, etc. Las células de Kupffer se localizan en la zona periportal y están ancladas al endotelio de los sinusoides. Son macrófagos y componentes del sistema de fagocitos mononucleares. Las células "pit", están localizadas en el límite endotelial, y son linfocitos granulares grandes con actividad de células natural killer. Juegan el papel de defensa contra infecciones virales y metástasis.

Las células perisinusoidales, de Ito, lipocitos o estelares hepáticas se localizan en el espacio perisinusoidal de Disse, adyacentes a los hepatocitos y a la capa de células endoteliales sinusoidales; son fisiológicamente las encargadas del almacenaje y metabolismo de retinoides. Este tipo celular puede transformarse a miofibroblastos por una variedad de estímulos. Cuando hay un daño hepático, las células estelares hepáticas se activan estimulando su proliferación, presentan una transformación fenotípica, pasan de células quiescentes a miofibroblastos, adquieren contractilidad en respuesta a endotelina 1 y eicosanoides, expresan citocinas y factores de crecimiento pro-inflamatorios y fibrogénicos, y el contenido de vitamina A disminuye. Las células estelares parecen jugar un papel relevante en la fibrosis hepática, ya que no solo producen y secretan componentes de la matriz extracelular, sino también enzimas para su degradación (Arthur, 1992; Friedman y col. 1992; Friedman, 1999). El significado pato-bioquímico de este tipo celular es su habilidad para cambiar en áreas de necro-inflamación a miofibroblastos  $\alpha$ -actina positivos, los cuales expresan y secretan activamente un amplio espectro de componentes de matriz extracelular: como colágena, proteoglicanos, fibronectina, laminina, nidogen/entactina, tenascina y ácido hialurónico. La velocidad de síntesis de los componentes de matriz se incrementa y sus perfiles cambian en paralelo con la transformación de estas células a miofibroblastos, semejando el perfil de producción de colágena en cirrosis humana avanzada. La transformación de las células estelares hepáticas, asociada a la amplificación de la producción de proteínas de matriz extracelular (conocida como "activación") es reconocida como el evento central de la fibrogénesis hepática.

Las proteínas liberadas de los hepatocitos dañados pueden actuar como agentes mitogénicos, parácrinos, pre-inflamatorios sobre las células estelares hepáticas. Este primer paso de la iniciación de la activación perisinusoidal es seguido por la multiplicación y transformación de las células estelares, bajo la influencia de las citocinas liberadas de las plaquetas, macrófagos y células inflamatorias, generando un incremento en la síntesis y secreción de colágena y varios componentes de la matriz extracelular (Friedman, 1999,

Tsukamoto, 1993). Las células endoteliales, de Kupffer, hepatocitos y epiteliales del ducto biliar parecen contribuir escasamente en la producción de matriz extracelular.

### **1.5. Metabolismo del etanol**

El etanol es una molécula pequeña, que presenta una distribución asimétrica de sus cargas lo que lo hace ser parcialmente polar. Debido a ello, es miscible en agua y en los lípidos. Todas estas características le permiten moverse por difusión simple a través de las membranas celulares, de tal manera que su concentración se equilibra rápidamente entre la sangre y los tejidos. Después de ser ingerido se absorbe en el tracto gastrointestinal, principalmente en el estómago e intestino delgado y en menor grado en el colón (Geokas y col., 1981; Crabb y col., 1987; Caballeria, 1991).

El principal órgano humano involucrado en el metabolismo del etanol es el hígado, en él se lleva entre un 80-90% de su oxidación (Rubin y Lieber, 1981). Después de su absorción en el intestino, el etanol pasa a la circulación portal y posteriormente a la circulación sistémica; difundiendo rápidamente a través de los capilares, otras membranas y tanto en los espacios extra como los intracelulares (Kopun y col., 1977). Del etanol absorbido solamente se elimina de un 2 a un 10 % mediante la orina y la respiración (Lieber, 1980). La especificidad del hígado para metabolizar el etanol explica las alteraciones metabólicas severas que el etanol puede producir en éste órgano.

El hepatocito posee tres sistemas enzimáticos para metabolizar el etanol: el sistema de la Deshidrogenasa Alcohólica (DHA), localizada en el citosol; el sistema Oxidativo Microsomal del Etanol (MEOS), ligado al retículo endoplásmico liso y el Sistema de la Catalasa, ubicado en los peroxisomas (figura 2). Estos tres sistemas llevan a cabo la conversión del etanol a acetaldehído, el cual a su vez, es el sustrato de la deshidrogenasa aldehídica localizada en el citosol y en las mitocondrias hepáticas, que genera el acetato.

El acetato se transforma finalmente a acetil-CoA que se incorpora al ciclo del ácido tricarboxílico que es el principal sistema celular productor de enlaces químicos de alta energía (Rubin y Lieber, 1981).

La deshidrogenasa alcohólica (DHA) oxida el 90% del etanol ingerido para convertirlo en acetaldehído considerándose la principal vía del metabolismo del etanol. La DHA se localiza en el citosol de los hepatocitos, pero también está presente en el tracto gastrointestinal, riñones y pulmones. La DHA constituye un sistema enzimático complejo en el cual se encuentran diferentes isoenzimas (Jönval, 1994).

El sistema oxidativo microsomal del etanol está relacionado funcionalmente con el citocromo P-450 y con la enzima NADPH-citocromo-C-reductasa, ambos participan en el metabolismo y en la eliminación de fármacos y sustratos endógenos (Lieber, 1990).

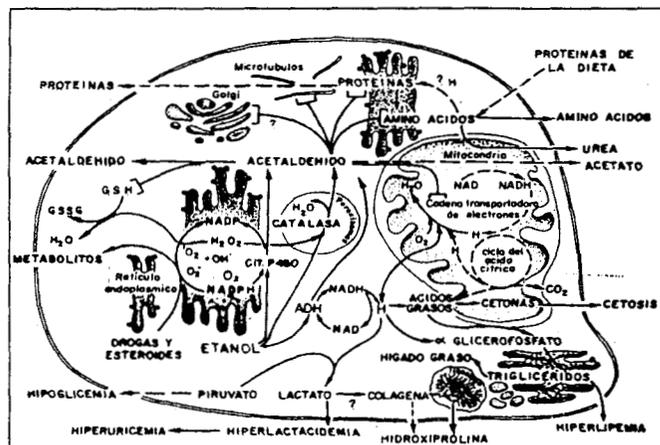


Figura 2. Esquema que representa el mecanismo de Oxidación del etanol en el hepatocito, el cual puede ser metabolizado por el Sistema de la Deshidrogenasa Alcohólica (DHA), que se encuentra en el citosol, el Sistema Oxidativo Microsomal (MEOS), localizado en el retículo endoplásmico liso y el Sistema de la Catalasa, ubicado en los peroxisomas. (Tomado de Lieber y col., 1991).

Nomura y col. (1983) y Perrot y col. (1989), demostraron que la actividad del sistema MEOS se incrementa después de la administración crónica de etanol en humanos y macacos. Se ha sugerido que existe una inducción de una isoforma del citocromo P-450, el CYP2E1 específico para el etanol (Lieber, 1984; Nanji y col., 1992). El análisis molecular del CYP2E1 reveló que el gen que codifica esta proteína en el humano se encuentra en el cromosoma 7 (Song y col., 1988). Estas evidencias demuestran que el etanol induce la actividad del CYP2E1 por un mecanismo pos-transcripcional y/o transcripcional (Song y col., 1988; Kubota y col., 1988).

El sistema de la catalasa se localiza en los peroxisomas y puede oxidar el etanol a acetaldehído y agua, cuando existe peróxido de hidrógeno presente en el medio. Lieber (1984), reportó que menos del 2% de etanol ingerido es oxidado por este sistema, por lo que se considera que contribuye en forma mínima al metabolismo del etanol (Handler y col., 1990).

#### **1.6. Mecanismo del daño hepático producido por etanol**

En los últimos años han surgido grandes avances en la comprensión del mecanismo por el que se produce el daño hepático debido a la ingestión de etanol. Se considera un proceso complejo, en el cual están involucrados distintos tipos celulares hepáticos que incluyen a los hepatocitos, las células de Kupffer, las células estelares hepáticas, los monocitos, los neutrófilos y las células endoteliales. Los cambios en la abundancia y función de estas células y de sus matrices dentro de la región perisinusoidal del hígado, constituyen una patología crónica progresiva. El entendimiento de estos cambios en las funciones celulares requiere de una interpretación cuidadosa de como las señales intercelulares e intracelulares provocan cambios acumulativos lentos que llevan de las interacciones normales a las patológicas. Datos recientes indican que la fibrogénesis es una reacción pato-bioquímica compleja, que

involucra la comunicación de tipos celulares parenquimatosos y no parenquimatosos con la matriz extracelular que los rodea, la cual provee múltiples señales que inducen anclaje (integrinas) para las células suspendidas y un reservorio para los factores de crecimiento (Gressner, 1996, Friedman, 1999). La cooperación de los diferentes tipos celulares opera no solo físicamente por el contacto de célula-célula, sino también químicamente por la producción (células efectoras) de señales celulares (citocinas y factores de crecimiento), las cuales inducen respuestas específicas en células blanco vecinas y distantes. Los tipos celulares residentes y circulantes, que son reclutados en el sitio de la inflamación, expresan una gran variedad de factores peptídicos de crecimiento; cada uno tiene funciones celulares específicas como: diferenciación celular, actividad mitótica, migración, contracción, expresión de receptores de superficie y síntesis o degradación de proteínas de matriz extracelular.

Se ha reportado que en el proceso de daño producido por el etanol y su metabolito, el acetaldehído, se producen especies reactivas de oxígeno generando daño lipoperoxidativo. Las células presentan alteración en su estado redox, hay daño en las mitocondrias, además de la liberación de enzimas como lactato deshidrogenasa, aspartato amino transferasa y alanín amino transferasa, consideradas como marcadores de daño hepático (Lieber, 1990; Koch, 1994; Kershenobich, 1995).

Se ha descrito que el mecanismo de daño producido por el etanol implica dos eventos: el proceso inflamatorio y el daño hepatocelular (French y col., 1993). El proceso inflamatorio se produce debido a que el etanol induce estrés oxidativo, caracterizado por un daño lipoperoxidativo en la membrana, así como por la disminución en el contenido de glutatión. De esta forma se activan las células de Kupffer, generando una serie de señales celulares produciendo la expresión y liberación de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 (IL-1) y los eicosanoides. A su vez, el etanol puede provocar un incremento en los niveles de la endotoxina, debido a que se forma el complejo

LPS-LBP que interacciona con el receptor CD-14 de las células de Kupffer que incrementan la secreción de citocinas pro-inflamatorias. En este evento inflamatorio intervienen otros factores como la transformación del etanol a acetaldehído en donde se forman aductos (aldehído-proteína) que inducen una respuesta inmunológica, y por otra parte, en las células estelares hepáticas se produce el incremento en la producción de proteínas de matriz extracelular. En lo que respecta al daño hepatocelular el etanol produce hipoxia que puede contribuir a la fibrosis pericentral en la enfermedad hepática alcohólica, altera la cadena respiratoria produciendo disfunción mitocondrial y la consecuente disminución en la síntesis de ATP.

### 1.6.1. Lipoperoxidación

El proceso de lipoperoxidación ha sido relacionado con fenómenos como la inflamación, el envejecimiento, el cáncer y la toxicidad de agentes químicos (Halliwell y Gutteridge, 1985). Existen evidencias que apoyan que el incremento en la producción de intermediarios de especies reactivas de oxígeno, contribuyen al daño hepático generado por etanol. Los eventos bioquímicos del estrés oxidativo se relacionan con la generación de radicales libres y la subsiguiente peroxidación de los lípidos de membrana, la alteración en la homeostasis del calcio intracelular y las alteraciones en el ADN.

Se considera que el etanol incrementa la lipoperoxidación de las membranas de hepatocitos. La mayor parte de los estudios experimentales tienden a demostrar este efecto, por determinaciones *in vitro* de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (Koch, 1991), formación de dienos conjugados y quimioluminiscencia (Boveris y col.,1983; Videla y col.,1983), exhalación de alcanos o la eliminación biliar de glutatión oxidado.

El aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno producidas por etanol han sido demostrados en fracciones microsomales en forma directa o por medio de la inducción de la isoenzima del citocromo P450

(CYP2E1). Valenzuela y col. (1980), reportaron niveles elevados de malondialdehído y dienos conjugados en membranas de células de animales intoxicados crónicamente con etanol, así como la disminución de los niveles hepáticos de glutatión (Shaw y col., 1983; Fernández-Checa y col., 1993; Tsukamoto, 1993) y de otros antioxidantes como la vitamina E y el selenio (Tanner y col., 1986; Sadrzadeh y col., 1994). Se ha sugerido que la lipoperoxidación podría ocurrir como resultado de la producción de aniones superóxido durante la transformación metabólica de etanol debido a la intervención del sistema oxidativo microsomal y de la aldehído deshidrogenasa (Litov y col., 1978, Koch y col., 1994). Las mitocondrias y los peroxisomas también pueden contribuir a la generación de radicales libres, debido al consumo de etanol. Estos hallazgos sugieren que el proceso de lipoperoxidación es un evento crítico en la patogénesis de la fibrosis hepática alcohólica.

### **1.6.2. Glutatión**

Las células de los mamíferos presentan mecanismos para minimizar el daño oxidativo que resulta de la exposición de agentes hepatotóxicos y de productos tóxicos del metabolismo. La molécula de protección contra oxidantes endógenos y exógenos es el glutatión .

El glutatión es un tripéptido, constituido de tres aminoácidos esenciales: glutamato, cisteína y glicina, es también llamado L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-L-glicina, el cual es esencial para la supervivencia de las células aeróbicas. El contenido celular de glutatión es la suma de: el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG) y las mezclas de conjugados disulfuros unidos a proteínas, xenobióticos o endobióticos.

La síntesis de glutatión se realiza principalmente en el hígado, de donde posteriormente es transportado al resto de las células. Puede ser también sintetizado en el riñón, el cerebro, el intestino, el músculo y los eritrocitos. El

glutación en las células de los mamíferos se encuentra en concentraciones cercanas al rango de 0.1 a 10 mM. El 95% del glutación celular total se ha encontrado en forma reducida y en menor proporción el glutación oxidado. Las concentraciones de glutación total que se encuentran en sangre y en plasma de humano son de 1-3  $\mu\text{mol/ml}$  (Akerboom y Sies, 1981).

El glutación es un agente protector en la célula, debido a que mantiene a los grupos sulfhídrilos (SH) en su forma funcional reducida y actúa directamente como protector de las membranas celulares. En su forma reducida desempeña un papel importante en la detoxificación, al reaccionar con peróxidos de hidrógeno y con peróxidos orgánicos (Fernández-Checa y col., 1997), evita la lipoperoxidación de las membranas y modula el ciclo celular (Poot y col., 1995).

El estrés oxidativo endógeno es una consecuencia del metabolismo aeróbico. En los eucariontes ocurre en la mitocondria, ya que este organelo presenta la mayor sensibilidad a especies reactivas, debido a que la cadena transportadora de electrones consume del 85-90% de oxígeno en la célula (Chance y col., 1979; Abate y col., 1990; Shigenaga y col., 1990; Demple y Amabilis-Cuevas, 1991). La reducción de oxígeno en la cadena respiratoria involucra la formación de intermediarios de oxígeno, tóxicos para la célula.

Se ha establecido que la administración aguda de etanol disminuye los niveles de glutación en el hígado (Wlodek y Rommelspacher, 1994). En la enfermedad hepática alcohólica la mitocondria parece ser el blanco del efecto deletéreo del etanol (Fernández-Checa y col., 1997). Investigaciones en modelos experimentales con animales sometidos a una dieta con etanol, indican que la disminución en el glutación mitocondrial puede ser un factor en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica (Tsukamoto, 1993). Las mitocondrias de células hepáticas provenientes de ratas sometidas a una dieta de etanol del tipo de Lieber-DeCarli, desarrollan una alteración en el acarreador del glutación mitocondrial (Ames y col., 1990), debido a que la mitocondria no

puede transportar el glutatión del citosol hacia la matriz mitocondrial y en consecuencia se presenta un mayor daño lipoperoxidativo.

### **1.7. Toxicidad del acetaldehído**

El acetaldehído, metabolito del etanol, es una molécula altamente reactiva, dada su naturaleza electrofílica. Por lo tanto, su acumulación en el organismo después de la ingestión del etanol puede producir muchas alteraciones patológicas, debido a que presenta una alta toxicidad comparado con el etanol (Lindros, 1978; Salaspuro y col., 1985; Lauterberg y col., 1988).

La concentración del acetaldehído en los tejidos y en la circulación sistémica después de una ingestión aguda de etanol es baja, aún en el hígado (Lindros y col., 1978). En casos de ingestión crónica se incrementa la concentración de este tóxico (Lieber, 1984; Lieber, 1988), lo que indica que podría existir un aumento en la producción de acetaldehído a partir de la oxidación del etanol o bien una disminución del catabolismo del acetaldehído. Se ha demostrado que la actividad de la aldehído deshidrogenasa total y mitocondrial disminuye significativamente en alcohólicos, en comparación con grupos de individuos controles sanos, o bien, con enfermedades hepáticas cuya etiología no es el etanol.

El acetaldehído induce cambios mitocondriales que incluyen daño estructural, fragilidad y alteración en la integridad de la membrana interna (Cederbaum y Rubin, 1974). *In vitro* se ha demostrado que el acetaldehído tiene varios efectos sobre el metabolismo mitocondrial. Inhibe el sitio I de la fosforilación oxidativa y por tanto, disminuye el consumo de oxígeno. Las mitocondrias hepáticas son más susceptibles a la acción del acetaldehído después de una ingestión crónica con etanol.

Estudios de microscopía electrónica de transmisión en muestras de hígado de individuos alcohólicos, presentan alteraciones mitocondriales como

son el hinchamiento y daño en la matriz, que se ha relacionado con cambios funcionales tales como disminución en la oxidación de ácidos grasos y del metabolismo del acetaldehído (Hasumura y col., 1976).

Olivares y col. (1997), reportaron que en la línea celular, hepática fetal humana (WLR-68), el tratamiento agudo con etanol (200 mM) durante 120 min, provocó un incremento en el daño lipoperoxidativo con respecto al acetaldehído. Sin embargo, el contenido de glutatión reducido fue similar al control. Mientras que el tratamiento agudo con acetaldehído (10 mM) por un periodo de 120 min, produjo una disminución en el contenido de glutatión. La mayor disminución del glutatión reducido en las células tratadas con acetaldehído puede ser explicada, como una consecuencia del daño mitocondrial y el daño lipoperoxidativo producido por estos tóxicos.

#### **1.8. Toxicidad del etanol y acetaldehído, sobre la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular en hepatocitos y células estelares hepáticas**

La investigación biomédica durante los últimos años ha permitido conocer, de manera más fina, algunos mecanismos por los cuales se produce el daño hepático debido a la ingesta de etanol. En la actualidad, se considera que hay una red de señales intercelulares e intracelulares muy complicada durante el desarrollo del daño hepático producido por el etanol. En condiciones normales las proteínas que principalmente conforman la matriz extracelular del hígado son: colágenas, proteínas de tipo no colágena, proteoglicanos y glucosaminoglicanos.

La fibrogenesis es una reacción pato-biológica altamente compleja que involucra la participación de tipos celulares parenquimatosos y no parenquimatosos y la matriz extracelular que los rodea dando múltiples señales a las células contiguas. Es un proceso que se caracteriza por la presencia de células inflamatorias y la activación de las células de Kupffer, por

la proliferación, transformación y migración de células estelares hepáticas, así como por un incremento en la producción de proteínas de la matriz, principalmente: colágenas, proteoglicanos, hialuronatos y glucoproteínas estructurales, lo cual da como resultado una matriz extracelular fibrótica (Arthur, 1995, Friedman, 1999). Durante la fibrosis hepática el contenido de matriz extracelular de colágenas de tipo I y III, puede incrementarse 6 veces más que en el estado normal, cambiando no solo la cantidad sino también la distribución de estas proteínas, así como la morfología y funcionamiento del hígado (Iredale y col., 1992; Greenwel, 1999).

Durante el daño hepático las señales celulares y moleculares convergen en la célula estelar hepática, la cual como resultado de una agresión lleva a cabo la transformación fenotípica y llega a ser la mayor fuente de matriz extracelular. Diversos reportes señalan que este tipo celular está involucrado en la producción de colágena, tanto en condiciones normales, como en condiciones patológicas (Friedman, 1999). La progresión de la fibrosis hepática resulta de un cambio en la degradación de la matriz extracelular (fibrólisis), además de los cambios en la síntesis (fibrogenesis).

Lieber y col. (1990), han reportado que mientras el etanol no parece alterar la producción de colágena III y laminina en hepatocitos cultivados y en células estelares hepáticas; la presencia del acetaldehído en el medio de cultivo en células estelares hepáticas incrementa significativamente la producción de colágena tipo I, o bien estimula la transcripción del gen procolágena- $\alpha$ (I) y el RNAm de fibronectina por un mecanismo post-transcripcional. Asimismo, (Casini y col., 1993; Gressner y col., 1995), reportaron que se observa un cambio en la degradación de colágena como resultado de la exposición al etanol y/o acetaldehído. Greenwel (1999), demostró que en cultivos de células estelares hepáticas el acetaldehído induce la regulación de colágena tipo I. Algunas evidencias han establecido que el primer metabolito del etanol, el acetaldehído es altamente fibrogénico e incrementa los depósitos de componentes de matriz extracelular en células estelares hepáticas (Maher y col., 1994), sin embargo, esta actividad

fibrogénica ocurre primariamente en células activadas. Estos resultados sugieren que el acetaldehído es un metabolito fibrogénico que participa en el desarrollo de la fibrosis hepática inducida por etanol.

### **1.9. Cultivos celulares como modelo de estudio**

La valoración directa en sistemas celulares de los efectos que produce el etanol y los productos de su metabolismo son difíciles de analizar debido a la complejidad que presentan los sistemas *in vivo*, en algunas ocasiones resulta muy difícil la interpretación de los resultados obtenidos en ellos y la posibilidad de resolver algunas interacciones a nivel celular. Es por ello, que los cultivos celulares constituyen un modelo de estudio, ya que la respuesta que se obtiene es directa, sin interferencia de otros sistemas que se presentan en un animal completo.

Entre los modelos *in vitro* a nivel celular se han descrito: hepatocitos aislados, mantenidos en suspensión; cultivos primarios y líneas celulares. En algunos estudios los hepatocitos aislados y mantenidos en suspensión, son elegidos sobre los cultivos celulares. Sin embargo, la actividad metabólica y la viabilidad de estas células se limita a unas pocas horas. Debido al estrés que se provoca durante el aislamiento, algunas de sus funciones se alteran drásticamente y no se tiene la seguridad de si el efecto producido por la presencia del agente tóxico es debido a él o bien está superpuesto con el daño presente en la célula por el aislamiento. Los cultivos primarios proporcionan un sistema en el cual, la exposición a agentes tóxicos puede ser controlado con mayor posibilidad que en animales intactos y se utilizan para evaluar el potencial tóxico de algunas sustancias y sus metabolitos (Kremers y col., 1988). Estudios del efecto crónico de los tóxicos no puede llevarse a cabo, ya que en un tiempo de 7 a 10 días se pierden las funciones hepatocelulares y empiezan a degenerar presentando cambios fenotípicos, desdiferenciación y disminución de la capacidad inicial para metabolizar los fármacos (Kremers y col., 1994).

Las líneas celulares son un modelo *in vitro* que presenta varias ventajas. Algunas de ellas son: fácil manejo, inmortalidad, así como estabilidad fenotípica, debido a que se obtienen poblaciones celulares en grandes densidades, y pueden criopreservarse (Dierick, 1989; Donato y col., 1991). Los resultados de la citotoxicidad basada en estos modelos, pueden proveer información acerca de la potencia y mecanismos de acción de los xenobióticos, con mayor número de parámetros controlables en un menor tiempo y reducción de costos (Porquet y col., 1992).

Entre las líneas celulares de origen hepático se encuentra la HepG2, la cual fue derivada de un hepatoblastoma humano (Aden y col., 1979 ) y ha sido propuesta como una alternativa para modelos celulares de cultivo primario de hepatocitos en el estudio de la toxicología hepática (Duthie, 1994). Esta línea celular presenta muchas características de los hepatocitos normales, como receptores asialoglicoproteínas, sintetiza y secreta casi todo el espectro de proteínas de fase aguda como albúmina, transferrina, lipoproteínas, fibrinógeno y algunos factores de coagulación (Kelly y Darlington, 1989). Además, presenta actividad de CYT-P450. Respecto al metabolismo de ciertos tóxicos, la actividad enzimática no disminuye durante el cultivo, como ocurre con cultivos primarios de hepatocitos humanos (Duthie, 1994).

Las células estelares hepáticas son un modelo *in vitro* que permite estudiar factores de regulación y producción de componentes de matriz extracelular en hígado normal y cirrótico. En el hígado humano y de rata, las células estelares hepáticas almacenan vitamina A y expresan desmina y citoqueratina (Blomhoff y Wake, 1991). Las células estelares en cultivo, disminuyen su contenido de gotas de lípidos y vitamina A y adquieren las características de miofibroblastos. En el desarrollo de métodos de aislamiento de cultivos de células estelares hepáticas, varios investigadores han determinado que este tipo celular produce: factores de crecimiento, citocinas, colágena y fibronectina, así como la expresión de genes que codifican los transcritos de componentes de la matriz extracelular muy semejantes a los descritos en los miofibroblastos. Las células estelares aisladas en fresco no

expresan el RNAm de colágena tipo I (Geerts y col., 1990; Maher y McGuire, 1990; Weiner y col., 1990), pero cuando se cultivan durante unos días se expresa esta proteína y cambian al fenotipo de miofibroblastos, lo que sugiere un evento similar al de la transformación de las células estelares hepáticas *in vivo* (Greenwel y col., 1991).

Los cultivos primarios de células estelares de hígado cirrótico de rata (CFSC) caracterizadas por microscopía electrónica e inmunohistoquímica responden a factores de crecimiento, producen interleucina-6 y expresan transcritos de componentes de la matriz extracelular como colágena tipo I y III, la cadena B1 de laminina y fibronectina (Greenwel y col., 1991). Las observaciones por microscopía electrónica indican que las células CFSC de hígados cirróticos de ratas, a las cuales se les indujo cirrosis con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) por 5 semanas y se obtuvieron por inmortalización, presentan poco contenido de gotas de lípidos con características de miofibroblastos y solo algunos clones se encuentran inactivados.

Por lo antes expresado, se consideró que la línea celular HepG2 y estelares hepáticas de hígado cirrótico de rata CFSC del clon -2G, son un modelo de estudio para evaluar el efecto tóxico del pretratamiento con la endotoxina, así como valorar la toxicidad del LPS, etanol y su metabolito el acetaldehído, para establecer el posible mecanismo de acción de estos xenobióticos, principalmente de la endotoxina en células hepáticas.

## II. OBJETIVO

Evaluar el posible efecto co-mórbido del pretratamiento con el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas sobre el daño hepático inducido por el etanol y productos de su metabolismo como el acetaldehído, en células estelares hepáticas de rata (CFSC-2G) y en una línea celular hepática de hepatoblastoma humano (HepG2).

### **Objetivos particulares:**

- Determinar las actividades enzimáticas de Lactato Deshidrogenasa, Aspartato Amino Transferasa, Alanín Amino Transferasa como marcadores de daño hepatocelular, en medios de cultivo de células de la línea HepG2 en los tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS, etanol, acetaldehído y el pretratamiento con la endotoxina el etanol o el acetaldehído.
- Evaluar la actividad enzimática de Lactato Deshidrogenasa como marcador de daño hepatocelular en medios de cultivo de células estelares hepáticas (CFSC-2G) con los diferentes tratamientos.
- Determinar el grado de lipoperoxidación y el estrés oxidativo mediante la cuantificación de glutatión en células de la línea HepG2 y estelares hepáticas con los diferentes tratamientos.
- Cuantificar el contenido y secreción de la colágena, en células estelares hepáticas con los diferentes tratamientos.

### III. JUSTIFICACION

El trabajo experimental desarrollado en los últimos años ha permitido presentar nuevas perspectivas acerca del mecanismo por el cual el etanol produce un efecto deletéreo en el hígado. Cuando la intercomunicación celular dentro del hígado fue reconocida como una red compleja de señales que regulan sus distintas funciones, se encontró un nuevo enfoque para poder estudiar las enfermedades hepáticas producidas por el etanol, es decir, la posible interferencia del etanol con los procesos involucrados en la comunicación intercelular dentro del órgano.

La enfermedad hepática inducida por el etanol es una alteración crónica de largo plazo con múltiples aspectos patológicos como: la hepatitis, vasoconstricción, hipoxia y necrosis focal, así como la fibrosis progresiva y la consecuente cirrosis. El mecanismo preciso de la enfermedad hepática alcohólica aún no se ha esclarecido, aunque se conoce que es un proceso multifactorial. El empleo de modelos experimentales en animales y en humanos, ha permitido realizar estudios más detallados que involucran la identificación de señales intercelulares con el objeto de comprender los mecanismos que participan en la enfermedad hepática alcohólica.

La cirrosis hepática ocupó el sexto lugar como causa de muerte hospitalaria en México (Secretaría de Salud, 1995; Organización Panamericana de la Salud-México, 1997). En la actualidad, a pesar de que se tienen innumerables estudios sobre el efecto que el etanol produce en el hígado, no se conoce el mecanismo por el cual se produce el daño. En nuestro país la incidencia de la cirrosis es más alta con respecto a otros países (a consumos iguales de etanol), lo que conduce a pensar en la posibilidad de factores co-mórbidos, como: el tipo de bebida ingerida, patrones de consumo de alcohol, susceptibilidad genética, etc. Destacando entre ellos la alta frecuencia por infecciones Gram-negativas enteroinvasoras. Se ha reportado que la endotoxemia puede ser un factor importante en la iniciación y agravamiento de las enfermedades hepáticas inducidas por el etanol. Los niveles plasmáticos de

los LPS se incrementan después de la ingestión aguda de etanol y en pacientes con enfermedad hepática alcohólica (Fukui y col., 1995). El mecanismo de la endotoxemia en los alcohólicos se debe a la disminución en la capacidad de destoxificación de la endotoxina por las células de Kupffer, incremento en la permeabilidad de la membrana de la mucosa gástrica para la endotoxina y al incremento de las bacterias Gram-negativas en la flora intestinal, las cuales pueden proveer reservorios importantes para el aumento de la producción de la endotoxina.

Sin embargo, no se ha evaluado el potencial dañino a nivel celular que pueden producir los tóxicos LPS con etanol y/o acetaldehído de manera simultánea. Por lo antes expresado, en este estudio se utilizaron células de la línea HepG2 y células estelares hepáticas CFSC-2G como modelos experimentales *in vitro*. Se expusieron a los dos tipos celulares hepáticos al pretratamiento con endotoxina bacteriana en presencia de etanol y su metabolito acetaldehído, para evaluar si existe un efecto producido por ésta sobre el daño hepático, o bien con los tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS a una concentración de 1µg/ml, etanol 50 mM y/o acetaldehído a una concentración de 175 µM.

#### **IV. HIPOTESIS**

Se ha reportado que los lipopolisacáridos de las bacterias Gram-negativas favorece un proceso inflamatorio y fibrogénico en el hígado, semejante al producido por la ingesta de etanol, entonces, la presencia de la endotoxina junto con el etanol y su metabolito, el acetaldehído pueden incrementar el daño hepático, por un aumento en el estrés oxidativo, y del contenido y secreción de colágena por las células estelares hepáticas.

## V. MATERIAL Y METODOS

### V.I. Cultivos celulares

La línea celular hepática HepG2 obtenida de un hepatoblastoma humano fue adquirida comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC) (Maryland, USA) en el pasaje número 79. Las células estelares hepáticas CFSC-2G fueron obtenidas de rata en el laboratorio del Dr. Marcos Rojkind, en Nueva York (USA), quien gentilmente las donó.

Las células de la línea HepG2 se mantuvieron en medio de Williams (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hy-clone), penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Microlab), en lo sucesivo el medio así preparado será denominado medio normal. Las células de la línea HepG2 se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Costar) y el medio de cultivo se les cambio cada tercer día. Las células se cosecharon una vez a la semana con tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma), diluyendo el cultivo en una proporción 1:3. Las células se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación y una temperatura de 37°C (Aden y col., 1979).

Las células estelares hepáticas CFSC-2G se mantuvieron en Medio Mínimo Esencial (MEM) de Dulbecco, suplementado con 10% suero fetal bovino (Hy-clone), aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina al 2%, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Microlab), en lo sucesivo el medio así preparado será denominado medio normal. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Costar) y el medio de cultivo se les cambio cada tercer día. Las células se cosecharon con tripsina-verseno al 0.025% (Microlab) una vez a la semana, resembrándose nuevamente a una dilución 1:3. Las células se mantuvieron en una incubadora

con 5% de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación y una temperatura 37°C (Greenwel y col. , 1991).

Todos los experimentos se realizaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico, y entre los pasajes 79-90 para la línea HepG2 y 13-27 para células estelares hepáticas CFSC-2G. Las células se observaron diariamente en un microscopio invertido con contraste de fases, para seguir su desarrollo y crecimiento celular.

Los medios de cultivo Williams y MEM para los tratamientos con los diferentes tóxicos se prepararon con las mismas concentraciones de micronutrientes que el medio normal, a excepción de que se les adicionó suero fetal inactivado, el cual fue sometido a una temperatura de 56°C y en ausencia de antibióticos, a estos medios en lo sucesivo se les denominará medio con suero fetal inactivado. Todos los tratamientos se iniciaron 24 h después de haber sido sembradas las células.

## **V.2. TRATAMIENTOS**

### **V.2.1. Determinación de la concentración del lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas**

Las células de la línea HepG2 y estelares hepáticas de la línea CFSC-2G, después de 24 h de resembradas en multicámaras de 24 pozos (Nunc), se les adicionó medio con diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 5 y 10 µg/ml) del lipopolisacárido Gram-negativo (LPS) de la bacteria *Salmonella typhymurum* (Sigma, St. Louis, Mo.). Las células se dejaron incubando durante 48 h con las diferentes concentraciones de LPS y pasado el tiempo de exposición a la endotoxina se realizó el ensayo de rojo neutro. Las células control se sembraron en medio con suero fetal inactivado bajo las mismas condiciones experimentales.

### **V.2.2. Tratamiento a corto plazo**

Se sembraron células de la línea HepG2 y estelares hepáticas y se dejaron en medio de cultivo normal durante 24 h. Después de ese tiempo, se cambió el medio con suero fetal inactivado y se incubó durante 48 h. Transcurrido este periodo los medios se cambiaron por otros conteniendo LPS a una concentración de 1µg/ml, etanol (EtOH) 50 mM y acetaldehído (ACH) 175 µM los cuales se mantuvieron por 24 h. Las botellas de cultivo se sellaron con parafilm para evitar la evaporación del etanol y el acetaldehído.

Por otra parte, en botellas de cultivo por separado fueron sembradas células con medio normal, el cual fue sustituido por otro conteniendo suero fetal inactivado a los mismos tiempos que las células tratadas, considerándose estos cultivos como grupo control.

### **V.2.3. Tratamiento a largo plazo**

A células de la línea HepG2 y estelares hepáticas, después de 24 h de sembradas con medio de cultivo normal, se les cambió el medio por uno conteniendo LPS 1µg/ml, o EtOH 50 mM, o bien ACH 175 µM el cual se dejó en contacto durante 48 h. Al cabo de 24 h se cambió el medio por uno nuevo con las mismas condiciones experimentales.

De la misma manera se sembraron por separado células con medio de cultivo normal, después se cambió el medio por uno conteniendo suero fetal inactivado bajo las mismas condiciones que las células tratadas, a estos cultivos se les denominó grupo control.

### **V.2.3. Pretratamiento con el lipopolisacárido (LPS)**

Se sembraron células de la línea HepG2 y estelares hepáticas en botellas de cultivo y se dejaron crecer por 24 h en medio de cultivo normal. Después de ese periodo se les cambió el medio por uno que contenía medio de LPS 1 µg/ml el cual fue sustituido a las 48 h por otro preparado con la misma concentración de LPS más EtOH 50 mM o ACH 175 µM, los cuales se dejaron en contacto con las células durante 24 h.

Por otra parte, se sembraron células con medio normal, el cual posteriormente fue cambiado por uno conteniendo suero fetal inactivado, a los mismos tiempos que las células del pretratamiento, considerándose a estos cultivos como control.

Al terminar el tiempo de exposición a los tóxicos en todos los tratamientos antes descritos, se colectó el medio de cultivo en tubos de plástico (Costar) y las células se levantaron con un gendarme de goma y se colocaron en tubos Ependorff y se almacenaron a 4°C para posteriormente utilizarse en los ensayos que se realizaron en los diferentes estudios.

## **V.3. MICROSCOPIA**

### **V.3.1. Microscopía óptica**

Se sembraron células de la línea HepG2 y estelares hepáticas CFSC-2G a densidad en cajas de cultivo bajo las condiciones experimentales descritas y se observaron diariamente en un microscopio invertido con contraste de fase (Zeiss), con la finalidad de seguir su crecimiento y desarrollo celular.

### **V.3.2. Microscopía electrónica de transmisión**

Se sembraron 30,000 células de la línea HepG2 y/o estelares hepáticas sobre cubreobjetos de plástico Termanox en multicámaras de 4 pozos de manera independiente con los diferentes tratamientos. Después del tiempo de los tratamientos se les retiró el medio de cultivo, se agregó una solución para fijarlas conteniendo glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos pH 7.4 durante 15 min a una temperatura de 4°C. Pasado este tiempo se cambió esta solución por una igual y se dejó en contacto a las células por 105 min. Las muestras se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, suplementado con sacarosa 0.25 M. La post-fijación se hizo con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 20% en amortiguador de fosfatos. Las muestras se deshidrataron con una serie gradual de concentraciones de etanol y se embebieron en Epon 812, se realizaron cortes finos y se contrastaron las rejillas. La observación de células se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM109) en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### **V.4. Prueba de citotoxicidad de células de la línea HepG2 y estelares**

#### **Hepáticas. Ensayo de Rojo neutro**

La prueba de citotoxicidad de rojo neutro (3-amino-7 dimetil-2-metilfenazina hidrocloreuro), se realizó de acuerdo al método descrito por Borenfreund y col. (1985), el cual se basa en la captación de rojo neutro por los lisosomas de las células viables. Las células de la línea HepG2 y las estelares hepáticas se sembraron a una densidad de 80,000 y 40,000 células respectivamente en multicámaras de 4 pozos con medio de cultivo con suero inactivado y con los diferentes tóxicos. Finalizado el tiempo de tratamiento, el medio fue sustituido por otro que contenía 40 µg/ml de rojo neutro, el cual previamente fue incubado por 24 h a una temperatura de 37°C y centrifugado por 10 min a 1500 g para remover los cristales precipitados. Las células fueron incubadas con el medio de rojo neutro durante 3 h.

Posteriormente, se retiró este medio y las células fueron lavadas con una solución que contenía cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 1%, formaldehído 0.5% para fijar las células y etanol al 50% para extraer el colorante. Las multicámaras conteniendo esta solución se agitaron por 10 min a temperatura ambiente en un baño de incubación (Shaking Water Bath- Precission). Se tomó el volumen total en una celda de 800  $\mu\text{l}$  de capacidad y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU-640) a una longitud de onda de 540 nm. El control que contenía las células incubadas con medio normal, se utilizó como blanco para calibrar el espectrofotómetro.

#### **V.5. Determinación de las actividades enzimáticas**

Se sembraron células de la línea HepG2 y estelares hepáticas (CFSC-2G) en botellas de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  a una densidad de  $2 \times 10^6$  células, con 8 ml de medio de cultivo normal. Posteriormente, el medio fue sustituido por los tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h), así como el pretratamiento con endotoxina. Las actividades enzimáticas se cuantificaron con ensayos de Diagnostico de la casa comercial Merck. Al terminar el periodo de exposición a los tóxicos, las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se despegaron con tripsina para ser contadas en un contador de células (Coulter Counter) modelo ZM para obtener el número de células al final de los tratamientos. Al finalizar el experimento los medios de cultivo se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para quitar las células muertas, las cuales se desecharon y se almacenó el medio para cada tratamiento a 4°C hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los resultados de las actividades enzimáticas específicas se expresaron en mU (nmoles de producto formado por minuto) por ml de medio de cultivo celular, por  $10^6$  células.

### V.5.1. Actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa ( LDH )

De los medios de cultivo de células de la línea HepG2 y estelares hepáticas se determinó la actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH), la cual se basa en la reducción de piruvato en presencia de NADH<sub>2</sub> por acción de la LDH para formar lactato y NAD<sup>+</sup>. La velocidad de aparición de NADH<sub>2</sub> se midió espectrofotométricamente en la región ultravioleta cercana a 340 nm.

Se preparó la solución reactiva con los siguientes compuestos: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5, piruvato de sodio 0.6 mM, NADH<sub>2</sub> 0.18 mM y se incubó a 37°C durante 2 min. En una celda espectrofotométrica se colocaron 750 µl de solución reactiva y 25 µl de medio de cultivo. Se determinó el cambio de absorbancia a 340 nm, tomando la lectura cada minuto durante 5 min.

La actividad de la enzima se determinó con el promedio de las variaciones de extinción por minuto ( $\Delta E/\text{min}$ ), aplicándose la siguiente fórmula de cálculo:

$$\text{Actividad por volumen} = \Delta E / \text{min} \times 4921 \text{ mU} / \text{ml}$$

Los resultados de la actividad de la enzima fueron expresados en mU /10<sup>6</sup> células.

### V.5.2. Actividad extracelular de Aspartato Amino Transferasa (ASAT)

La actividad de Aspartato Amino Transferasa (Glutamato-oxalacetato-transaminasa GOT), se determinó en los medios de cultivo de células de la línea HepG2, la cual se basa en la hidrólisis de  $\alpha$ -cetoglutarato en presencia de aspartato por acción de la GOT para formar glutamato y oxalacetato. El

oxalacetato producido se transforma enzimáticamente en malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) por medio de NADH. La velocidad de consumo del NADH<sub>2</sub> puede medirse en la región del ultravioleta (340 nm). Se preparó una solución reactiva que contenía amortiguador de fosfatos 80 mM pH 7.4, L-aspartato 200 mM, α-cetoglutarato 12 mM, NADH<sub>2</sub> 0.18 mM, LDH > 1.2 U/ml, MDH > 0.6 U/ml y se incubó a 37°C durante 2 min. En una microcelda espectrofotométrica se colocaron 500 μl de solución reactiva y 125 μl de medio de cultivo, se mezcló y se leyó el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Para determinar la actividad de la enzima se aplicó la siguiente relación:

$$\text{Actividad por volumen} = \Delta E / \text{min} \times 794 \text{ mU} / \text{ml}$$

Los resultados de la actividad de ASAT fueron expresados en mU/10<sup>6</sup> células.

### V.5.3. Actividad extracelular de Alanín Amino Transferasa (ALAT)

La actividad de Alanín Amino Transferasa (ALAT) se determinó en los medios de cultivo de células de la línea HepG2, la cual se basa en la hidrólisis de α-cetoglutarato en presencia de L-alanina por acción de la ALAT para formar glutamato y piruvato. El piruvato formado se transforma enzimáticamente en lactato por medio de lactato deshidrogenasa en presencia de NADH<sub>2</sub>. La velocidad de desaparición de este sustrato se midió espectrofotométricamente en la región del ultravioleta cercano a 340 nm. Se preparó una solución reactiva con los siguientes compuestos: amortiguador de fosfatos 80 mM pH 7.4, L-alanina 80 mM, α-cetoglutarato 18 mM, NADH<sub>2</sub> 0.18 mM, LDH > 1.2 U/ml y se incubó a 37°C durante 2min. En una microcelda espectrofotométrica se adicionaron 500 μl de solución reactiva y 125 μl de medio de cultivo de las células de cada uno de los tratamientos, se mezcló y se

leyó el cambio de absorbancia a 340 nm. La actividad de la enzima se determinó con la siguiente relación:

$$\text{Actividad por volumen} = \Delta E \text{ min} \times 794 \text{ mU / ml}$$

Los resultados de la actividad de la enzima fueron expresados en mU/10<sup>6</sup> células.

#### V.6. Determinación del grado de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación se determinó por el método de Buege y Aust (1978), el cual se basa en la formación de Malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. Se sembraron células a una densidad de  $2 \times 10^6/\text{cm}^2$  en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Después de los tratamientos respectivos, las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y con ayuda de un gendarme de goma se levantaron de la botella de cultivo. Al momento de realizar la prueba las células se lisaron en nitrógeno líquido y de los lisados celulares se tomaron 0.1 ml para determinar la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (1951) y a los volúmenes restantes se les adicionó 2 ml de una solución reactiva formada por ácido tricloroacético (TCA) al 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N. Se mezcló vigorosamente y las muestras se incubaron en baño de agua a una temperatura de 100 °C, durante 25 min. Se dejó enfriar la mezcla, se centrifugó a 3500 g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante fue leída contra un blanco (solución reactiva) a una longitud de onda de 535 nm. La concentración de MDA se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar con la siguiente relación:

$$C = A / \epsilon l$$

Donde **C** es la concentración de MDA, **A** es la absorbancia, **E** el coeficiente de extinción molar ( $1.56 \times 10^5$  /cm M) e **l** es el grosor de la celda. Los datos fueron reportados en nmoles de MDA por mg proteína.

#### **V.7. Determinación del contenido de glutatión ( -SH )**

Para determinar el contenido de grupos tioles (-SH) se utilizó la técnica de Tietze y col. (1969), con el reactivo de Ellman la cual se basa en la reducción del 5', 5' Ditiobis-Acido-2-Nitrobenzoico (DTNB), en presencia de grupos tioles, dando como resultado una reacción cuyo producto de coloración amarilla, puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 412 nm.

Se sembraron células de la línea HepG2 y/o estelares hepáticas a una densidad de 500,000/cm<sup>2</sup> en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, pasado el tiempo de cada uno de los tratamientos establecidos, las células se lavaron con PBS para formar un homogenado celular. Las células se despegaron de las botellas de cultivo utilizando un gendarme de goma y se resuspendieron con 1 ml de buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4. Las células se lisaron sometiéndolas a cambio de temperatura con nitrógeno líquido y se descongelaron a temperatura ambiente, este procedimiento se realizó dos veces. Del lisado celular se formaron dos alícuotas: una de 100 µl para cuantificar proteína por el método de Lowry y col. (1951) y la otra de 500 µl para la cantidad de grupos tioles totales. Para determinar el contenido de los grupos tioles-totales y glutatión reducido, del lisado celular se tomó una alícuota de 500 µl para cuantificar los -SH correspondientes a la parte soluble de (GSH) y se solubilizó con buffer TRIS 0.2 M, ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) 0.02 M suplementado con dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 1% a pH 8.2, se agitó con vortex durante 15 min. Al homogenado celular se le adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se agitó vigorosamente con vortex durante 15 min, para precipitar las proteínas las cuales no se cuantificaron. Posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 10 min a -4°C, el botón de las células se desechó, se tomaron 200 µl del sobrenadante y se agregaron en una celda de

espectrofotómetro junto con 800  $\mu$ l de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.5 y 30  $\mu$ l del reactivo de Ellman (DTNB). La solución se agitó suavemente y se leyó la absorbancia a 412 nm para determinar el glutatión-total y el glutatión reducido.

Para determinar el glutatión oxidado (GSSG) en la celda del espectrofotómetro se adicionó 200  $\mu$ l del sobrenadante solubilizado por el procedimiento descrito y se agregó 800  $\mu$ l de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.5, 100  $\mu$ l de NADPH<sub>2</sub> como cofactor, 5  $\mu$ l de glutatión reductasa con una actividad de 120 U/mg diluida 1:10 y 30  $\mu$ l de reactivo de Ellman (DTNB). La cuantificación de los grupos -SH se realizó con base a la curva estándar con concentraciones de 1.6, 3.2, 16.2, 32.5, 65.1, 81.4 y 162.8 nmoles GSH/ml, se determinó la cantidad de proteína en cada una de las muestras y los resultados se refirieron en nmoles de -SH por mg proteína.

#### **V.8. Determinación del contenido de proteína por el método de Lowry**

El contenido de proteína en las células, se determinó por el método de Lowry, y col. (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% (solución A) y otra con sulfato de cobre al 0.5% (solución B), se mezclaron tomando 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B para obtener una solución a la que se denominó C. A una alícuota de la muestras se le adicionaron 5 ml de la solución C y 0.5 ml de Folín 1 N y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 45 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 problemas se utilizó una curva estándar de albúmina de bovino a las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 mg/ml.

## V.9. Determinación cuantitativa de hidroxiprolina

El ensayo que se utilizó para la determinación cuantitativa de hidroxiprolina para obtener la cantidad de colágena en los medios de cultivo y en células fue el establecido por Woessner (1961). Se sembraron 500,000 células en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Al finalizar los tratamientos se recolectó el medio el cual fue de un volumen de 5 ml; las células se contaron en un contador de células (Coulter Counter) modelo ZM para obtener el número de células al final del experimento.

Se tomó una alícuota de 2 ml de los medios de cultivo, y el homogenado celular, los cuales fueron colocados en ampolletas de vidrio e hidrolizados con 2 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6N, se sellaron con un soplete (marca 3-A Blowpipe-Veriflo) y se mantuvieron a una temperatura de 110°C durante 24 h. Las muestras fueron lavadas con agua desionizada para eliminar el exceso de HCl y se evaporaron a sequedad en una parrilla. Una vez hidrolizadas las muestras y evaporados los medios fueron resuspendidos en 1 ml de agua desionizada de donde se tomó una alícuota de 100 µl para el ensayo.

La determinación del contenido de colágena se realizó en función de una curva estándar de hidroxiprolina con concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 y 0.1 µmol/ml, las cuales fueron preparadas a partir de una solución patrón de 0.1 µmol/ml de hidroxiprolina. Se pesó 0.0141g de cloramina-T y se disolvió con 0.2 ml de agua desionizada, 0.3 ml de metil celosolve, 0.5 ml de amortiguador de acetato a pH 6 (preparado con ácido cítrico, acetato de sodio, hidróxido de sodio y ácido acético), la curva estándar y las muestras problemas se preincubaron durante 20 min con la solución de cloramina-T y 5 min con ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 3M a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó paradimetil-benzaldehído (p-DAB) al 20% el cual se disolvió con metil celosolve y se incubó a 60°C por un periodo de 20 min. Se dejaron enfriar los tubos con

agua corriente y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 557 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de colágena / $10^6$  células.

#### **V.10. Análisis 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. El nivel de significancia utilizado fue de  $p \leq 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.1. Línea celular de hepatoblastoma humano (HepG2)**

#### **VI. 1.1. Prueba de citotoxicidad (Ensayo de Rojo Neutro)**

La prueba de rojo neutro se basa en la capacidad que tienen los lisosomas para absorber el colorante. Se ha establecido que cuando hay un daño, una menor cantidad de colorante es absorbido por los lisosomas, representando una disminución en la capacidad funcional de las células. Los valores de esta prueba se expresan como porcentaje de la absorbancia de las células control.

Lo primero que se evaluó fue la funcionalidad celular en presencia de diferentes concentraciones de LPS con el fin de determinar la concentración adecuada para los tratamientos. Las células de la línea HepG2 fueron expuestas a LPS con las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  por un periodo de 48 h (Tabla I). Los resultados indican que los porcentajes de captación lisosomal disminuyeron significativamente conforme se aumentó la concentración de la endotoxina.

De estos resultados se consideró que un tratamiento con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS era el adecuado para los tratamientos de este estudio, ya que se mantenía una funcionalidad celular elevada y la observación morfológica de las células por microscopía óptica no presentaba cambios aparentes en su morfología con respecto al control.

222865

**Tabla I. Captación lisosomal de rojo neutro en células de la línea HepG2 expuestas con diferentes concentraciones de lipopolisacárido (LPS) durante 48 horas**

Concentración LPS $\mu\text{g/ml}$	% Absorbancia (540 nm)
Control	100 $\pm$ 1.3
0.01	89 $\pm$ 1.9*
0.1	87 $\pm$ 2.9*
1	86 $\pm$ 1.4*
5	82 $\pm$ 2.7*
10	59 $\pm$ 1.5*

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  D.S. del porcentaje de la absorbancia del rojo neutro con respecto al control (n=9).

\*Diferencia significativa en comparación al control con una  $p \leq 0.05$ .

Todos los tratamientos se iniciaron 24 h después de haber sido sembradas las células, bajo las condiciones experimentales descritas en la metodología. Los datos de la prueba de rojo neutro en las células de la línea HepG2 con los diferentes tóxicos se presentan en la Tabla II. Los valores de esta prueba se expresaron como el porcentaje de la absorbancia considerándose las células control como el 100%.

Los resultados obtenidos con los tratamientos a corto plazo muestran que con LPS el porcentaje de absorbancia del rojo neutro, captado por los lisosomas disminuyó el 6%, con EtOH el 36% y con ACH el 40%, con respecto a las células control.

Los resultados de los tratamientos a largo plazo indican que con LPS la absorbancia del rojo neutro disminuyó el 25%, con EtOH el 32% y con ACH el 35%. No obstante, al comparar estos porcentajes de absorbancia del colorante con el de las células expuestas a EtOH y ACH a corto plazo no presentaron diferencia significativa con relación a estos tratamientos.

En el pretratamiento con LPS, el porcentaje de colorante captado por los lisosomas se redujo en un 37% en presencia del EtOH y con ACH el 40%, valores muy semejantes a los obtenidos con los tratamientos a corto plazo, por lo que parecería que las células no incrementan el daño lisosomal por el pretratamiento a la endotoxina en presencia de etanol y/o acetaldehído.

Estos resultados indican que la captación lisosomal de rojo neutro en las células HepG2 disminuye de manera significativa en los tratamientos a corto y largo plazo con etanol, acetaldehído y la endotoxina, así como con los pretratamientos a endotoxina y posterior al tratamiento con EtOH y ACH con respecto al control, no presentando diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla II. Captación lisosomal de rojo neutro en células de la línea HepG2 de los tratamientos con LPS, etanol, acetaldehído a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) y el pretratamiento con endotoxina.**

<b>Tratamiento</b>	<b>% Absorbancia (540nm)</b>
Control	100 ± 1.9
LPS 1 µg/ ml, 24h	84 ± 7.6*
EtOH 50 mM, 24h	64 ± 6.7*
ACH 175µM, 24h	60 ± 7.5*
LPS 1µg/ml, 72h	75 ± 5.6*
EtOH 50 mM, 72h	68 ± 2.1*
ACH 175 µM, 72h	65 ± 1.4*
LPS+EtOH	63 ± 5.4*
LPS+ACH	60 ± 1.4*

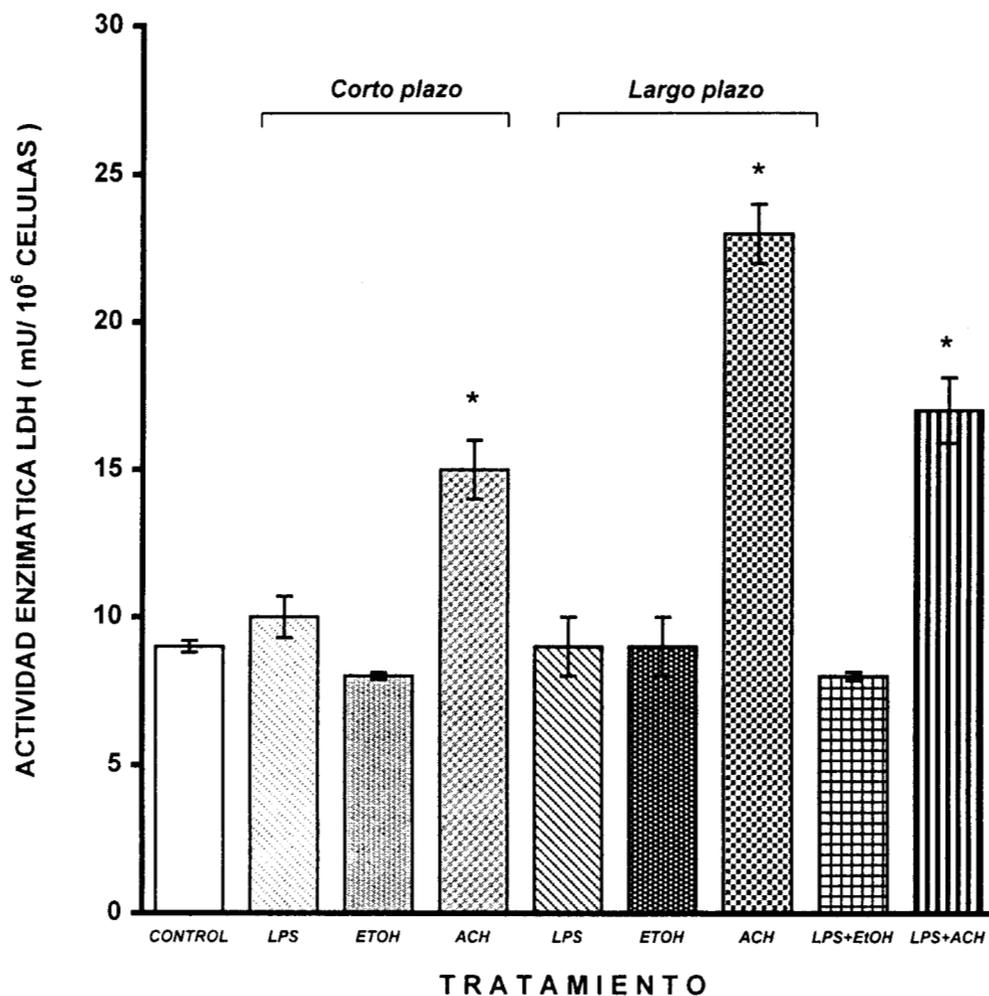
Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. del porcentaje de la absorbancia del rojo neutro con respecto al control (n = 9). \* Diferencia significativa en comparación a las células control con una  $p \leq 0.05$ .

## **VI. 2. Determinación de las actividades enzimáticas en medios de cultivo**

### **VI. 2.1. Determinación de la actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

El daño que presentaron las células con los diferentes tratamientos de los tóxicos fue evaluado por la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. La LDH es una enzima citosólica que se libera al medio de cultivo cuando hay daño hepatocelular. La actividad de la LDH expresada en  $\text{mU}/10^6$  células se representa en la figura 1, en donde se observa que para las células control el valor fue de  $9 \pm 0.13 \text{ mU}/10^6$  células.

Al analizar los resultados se observa que únicamente los tratamientos en presencia de ACH presentaron cambios significativos con respecto al control en este parámetro. El tratamiento a corto plazo con ACH produjo un incremento del 67% en la actividad de la enzima ( $15 \pm 1 \text{ mU}/10^6$  células), en el tratamiento a largo plazo se incrementó el 155% ( $23 \pm 1 \text{ mU}/10^6$  células) y en el pretratado con endotoxina la actividad presentó un valor de  $17 \pm 1 \text{ mU}/10^6$  células, produciendo un incremento del 88 % en la liberación de la enzima.



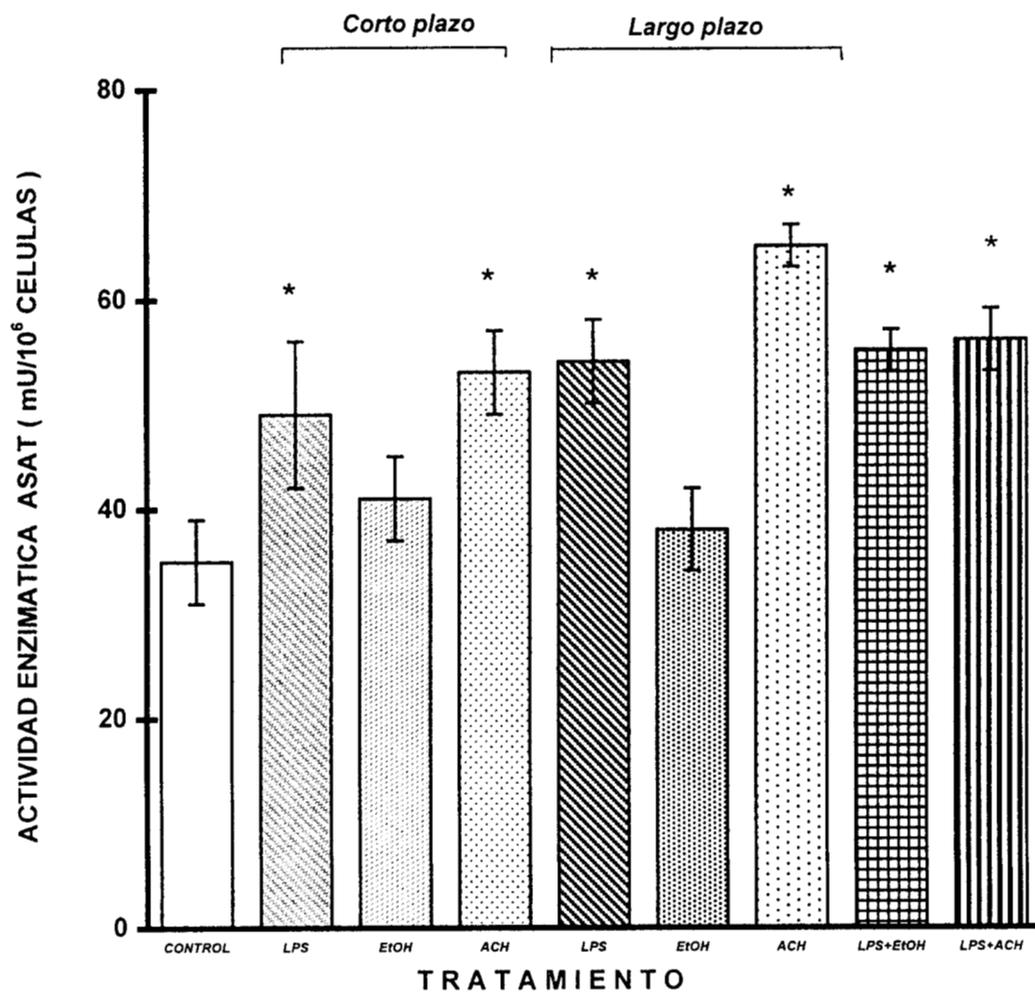
**Figura 1. Actividad enzimática de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en medios de cultivo de células de la línea HepG2, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 9). \*Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.**

## **VI .2.2. Determinación de la actividad extracelular de Aspartato Amino Transferasa (ASAT)**

La hepatotoxicidad inducida por los diferentes tratamientos de células de la línea HepG2, se cuantificó por la actividad enzimática de Aspartato Amino transferasa (ASAT) liberada al medio de cultivo. Esta enzima se evaluó por ser un marcador de necrosis hepatocelular. La actividad de la enzima expresada en mU/10<sup>6</sup> células se presenta en la figura 2, el valor obtenido de la actividad de la enzima en las células control fue  $35 \pm 4$  mU / 10<sup>6</sup> células.

Al analizar los datos de la exposición a corto plazo y largo plazo con acetaldehído y el pretratamiento de LPS con ETOH y/o ACH se produjo un incremento pequeño pero significativo en la actividad enzimática de la ASAT, con respecto al control. El valor máximo se obtuvo con el tratamiento con ACH a largo plazo, el cual tuvo un valor de  $65 \pm 2$  mU/10<sup>6</sup> células, correspondiente a un incremento del 86% en la liberación de la enzima.

Los resultados obtenidos indican, en los tratamientos con LPS a corto y largo plazo se produjo un incremento del 40% ( $49 \pm 7$  mU/ 10<sup>6</sup> células) y del 54% ( $54 \pm 4$  mU/ 10<sup>6</sup> células) respectivamente. Mientras que los tratamientos con EtOH no presentaron un cambio en la actividad de la enzima. Con relación al pretratamiento con LPS en presencia de etanol y acetaldehído no se obtuvo un efecto aditivo en la actividad de esta enzima. Sin embargo, se observa un aumento del 57% ( $55 \pm 2$  mU/10<sup>6</sup> células) en presencia de EtOH y el resultado obtenido después de la exposición a ACH presentó el mismo valor, estos resultados se compararon con respecto a las células control.



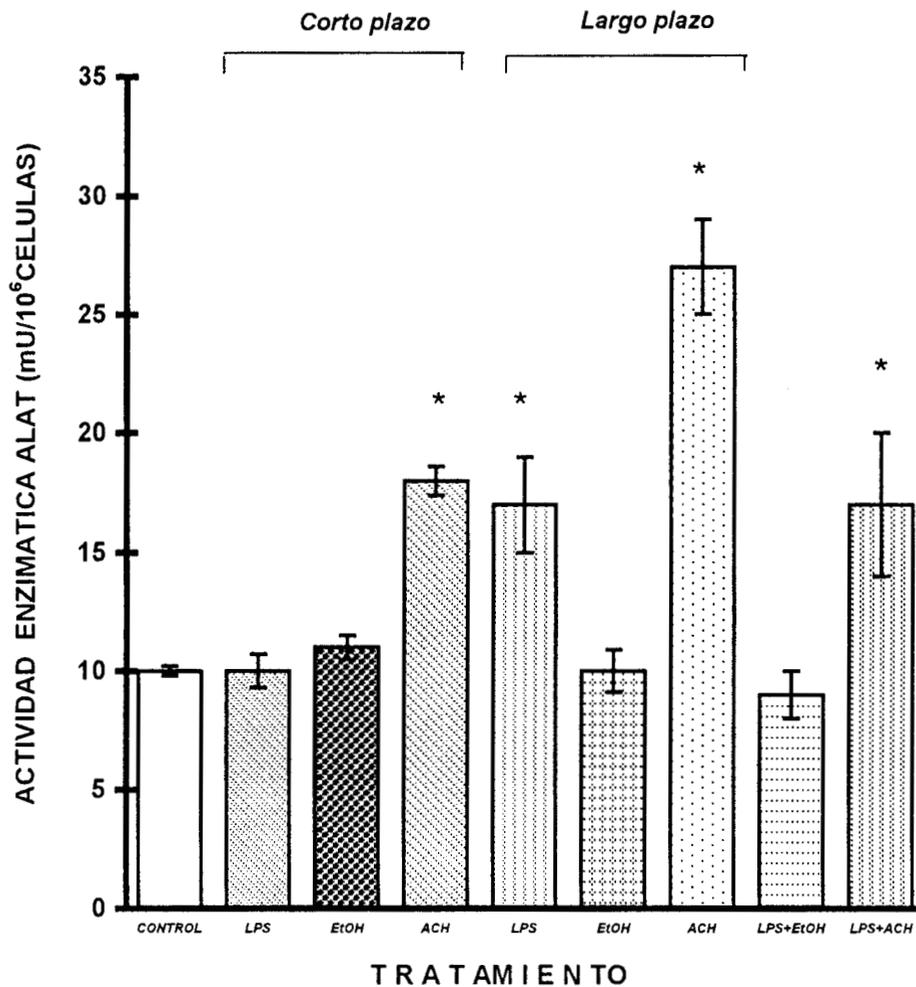
**Figura 2. Actividad enzimática de Aspartato Amino Transferasa (ASAT) en medios de cultivo de células de la línea HepG2, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 9). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.**

### **VI.2.3. Determinación de la actividad enzimática de Alanín Transferasa (ALAT)**

Se evaluó la actividad de Alanín Amino Transferasa (ALAT) mediante la determinación espectrofotométrica de la enzima en el medio de cultivo. Esta enzima es un indicador de necrosis hepatocelular. La actividad específica de la ALAT expresada en  $\text{mU}/10^6$  células se representa en la figura 3, en donde se observó un valor de  $10 \pm 0.1 \text{ mU} /10^6$  células en el grupo control.

Los resultados obtenidos indican que se presentaron cambios en la actividad enzimática de ALAT con respecto al control, en todos los tratamientos donde está presente el acetaldehído y con el tratamiento con LPS a largo plazo. Las células expuestas a un tratamiento con ACH a corto plazo presentaron un incremento significativo de un 80% ( $18 \pm 0.6 \text{ mU}/10^6$  células), mientras que las células que se expusieron a largo plazo al mismo tóxico presentaron un incremento del 170% ( $27 \pm 2 \text{ mU}/10^6$  células). En el caso del tratamiento a largo plazo con LPS y el pretratamiento con la endotoxina en presencia de ACH la actividad de la ALAT se incrementó un 70 % ( $17 \pm 3 \text{ mU} /10^6$  células) con referencia a las células control.

Los resultados obtenidos en este estudio indican, que la actividad de la enzima en los medios de cultivo de células de la línea HepG2 se incrementó significativamente en los tratamientos con acetaldehído, en el tratamiento a largo plazo con LPS y el pretratamiento con la endotoxina en presencia de ACH. Por lo tanto, la endotoxina no produjo un efecto aditivo en el incremento de la actividad enzimática de la ALAT en el medio de cultivo.



**Figura 3. Actividad enzimática de Alanín Amino Transferasa (ALAT) en medios de cultivo de células de la línea HepG2, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 9). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.**

### VI.3. Determinación del grado de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación se determinó mediante la cuantificación de Malondialdehído (MDA) producido en presencia de Acido Tiobarbitúrico (TBA), el cual se determinó espectrofotométricamente. Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 4, expresados como pmol de MDA/mg de proteína. En las células control la producción de MDA fue  $638 \pm 26$  pmol/mg proteína. Todos los tratamientos produjeron un incremento en el grado de lipoperoxidación, siendo el tratamiento con acetaldehído el que produjo una mayor cantidad de MDA.

Los resultados obtenidos en las células tratadas con ACH a corto plazo presentaron un valor de  $2272 \pm 37$  pmol MDA / mg proteína y las tratadas a largo plazo de  $7393 \pm 188$  pmol MDA/mg proteína, produciéndose un incremento en la concentración de MDA del 256% y del 1058% con respecto a las células control.

En el caso de la exposición a corto plazo con EtOH ( $1575 \pm 21$  pmol MDA/mg proteína) y a largo plazo ( $3944 \pm 93$  pmol MDA/mg proteína) también se produjo un aumento en la cantidad de MDA del 147% y del 518%, con referencia a las células control.

En el caso, de las células expuestas con el tratamiento con LPS a corto plazo se produjo un incremento del 96% ( $1256 \pm 17$  pmol MDA/mg proteína) y en el de largo plazo del 429% ( $3337 \pm 49$  pmol MDA/mg proteína) en la producción de MDA. En el pretratamiento con la endotoxina con etanol y acetaldehído (1741 y 1755 pmol MDA/mg proteína) presentaron incrementos del 174% para ambos, con respecto al control, no encontrándose un efecto aditivo de la endotoxina sobre el daño lipoperoxidativo.

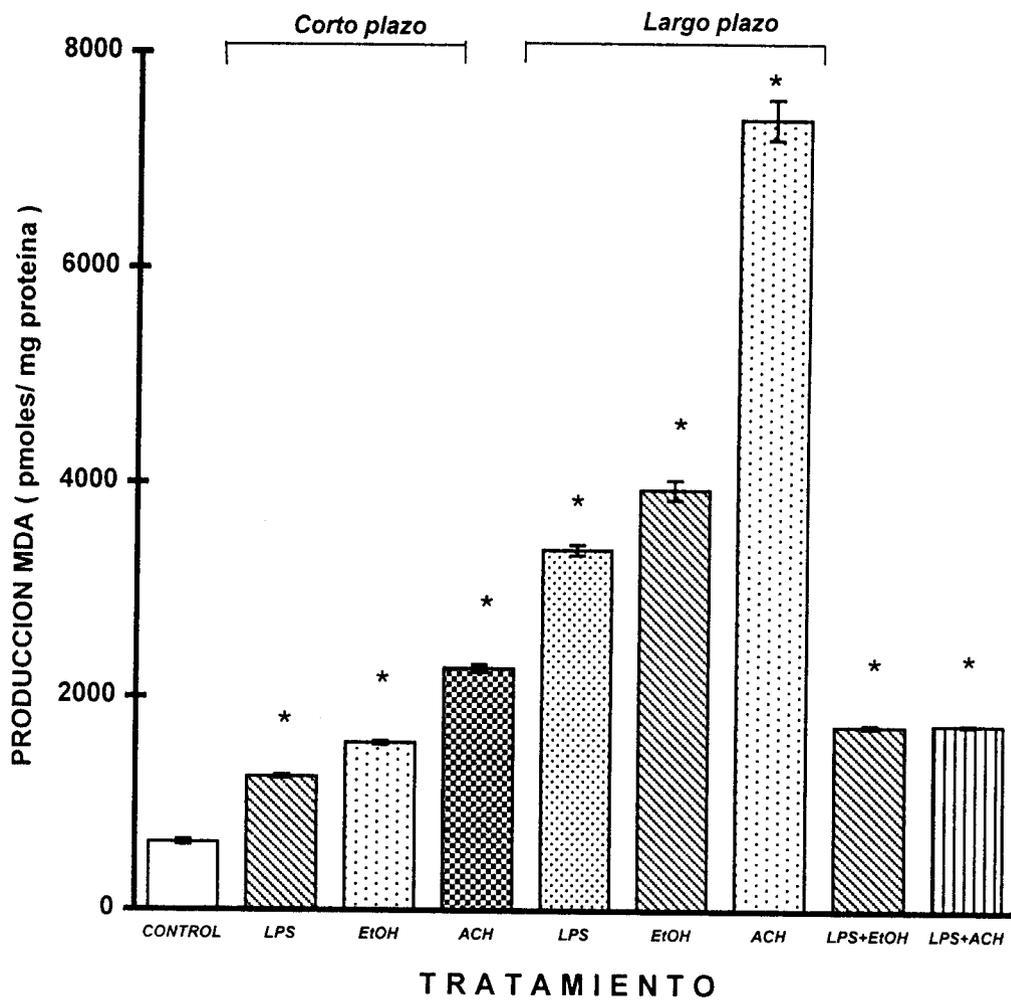


Figura 4. Grado de lipoperoxidación, determinado como producción de Malondialdehído (MDA) en células de la línea HepG2, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24h) y largo plazo (72h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 6). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

222865

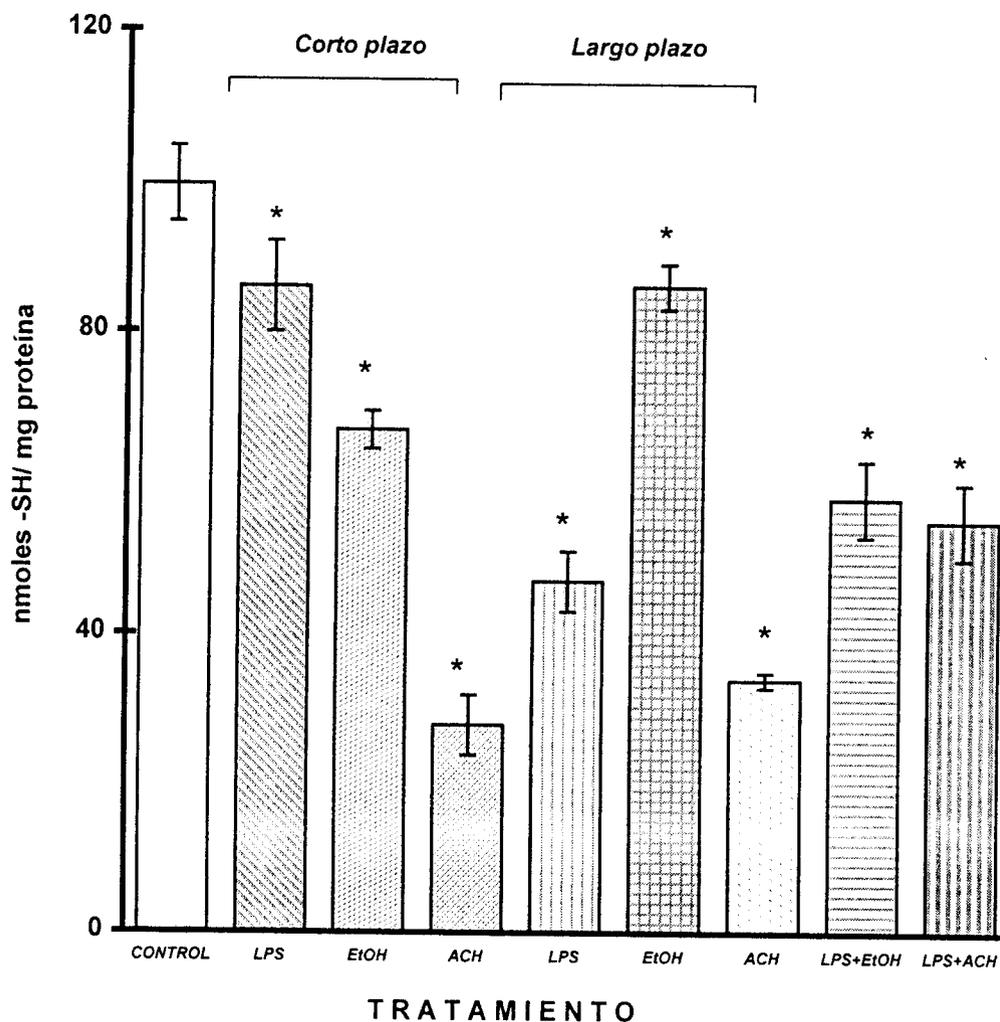
#### VI .4. Determinación del contenido de glutatión

El contenido de grupos tioles en las células se determinó espectrofotométricamente al reaccionar el 5,5'- Ditiobis-2-Acido Nitrobenzoico (DTNB) con los grupos -SH. En la figura 5, se presentan los resultados obtenidos del contenido de glutatión reducido (GSH) en las células de la línea HepG2. Los datos se expresaron en cantidad de grupos -SH (nmoles/mg proteína). En las células control se obtuvo el valor de  $99.5 \pm 5$  nmoles -SH /mg proteína. En todos los tratamientos se encontró una disminución de la cantidad de glutatión reducido con respecto al control.

Asimismo, se observa que el acetaldehído tanto en el tratamiento a corto plazo ( $28 \pm 4$  nmoles -SH /mg proteína) como en el de largo plazo ( $34 \pm 1$  nmoles -SH /mg proteína) fue el que produjo una mayor disminución, del 72% y 66% en el contenido de GSH, con respecto al control .

En el caso del tratamiento con EtOH a corto plazo las células presentaron una disminución del 32 % ( $67 \pm 2$  nmoles -SH /mg proteína) y en el de largo plazo del 13% ( $86 \pm 3$  nmoles -SH /mg proteína) en el contenido de GSH, con respecto al control.

En el pretratamiento con endotoxina con EtOH se produjo una disminución del 42% ( $58 \pm 5$  nmoles -SH /mg proteína) y con ACH del 45% ( $55 \pm 1$  nmol -SH/mg proteína) en el contenido de GSH en las células, no observándose potenciación por el efecto del LPS en conjunto con el etanol y/o el acetaldehído.



**Figura 5. Concentración de Glutación reducido (GSH) en células de la línea HepG2, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24h) y largo plazo (72h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 6) . \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.**

Por otra parte, se evaluó el contenido de glutatión oxidado (GSSG) en los diferentes tratamientos de las células de la línea HepG2 (Tabla III). El tratamiento con acetaldehído a corto plazo produjo un pequeño incremento del 12%, mientras que en el tratamiento a largo plazo se produjo un incremento del 240% en el contenido de GSSG con respecto al control.

Al valorar los resultados del tratamiento con etanol largo plazo se observó que la concentración de GSSG se incrementó el 33% con respecto a las células control. Sin embargo, el tratamiento con EtOH a corto plazo no presentó diferencia significativa en este ensayo.

La exposición con LPS a corto plazo produjo un incremento del 48% en los niveles de GSSG, sin embargo, en el tratamiento con LPS a largo plazo no presentó una diferencia significativa en este parámetro con respecto al control.

No obstante, los resultados obtenidos del pretratamiento con la endotoxina con EtOH y/o ACH indican que se incrementaron los niveles de GSSG del 51% y 130% con respecto a los tratamientos a corto plazo, y del 56% y 157% con referencia a las células control.

Estos resultados nos permiten sugerir que la exposición con el etanol y acetaldehído a largo plazo, el tratamiento con LPS a corto plazo, así como el pretratamiento con la endotoxina, alteran el estado de oxido-reducción de las células, el cual se evaluó mediante el contenido de glutatión oxidado y reducido.

Tabla III. Concentración de GSSG y cociente GSSG/GSH en células de la línea HepG2 de los tratamientos con LPS, etanol, acetaldehído a corto plazo (24 h), largo plazo (72 h) y el pretratamiento con endotoxina

Tratamiento	Concentración de GSSG nmoles/mg proteína)	Cociente GSSG/GSH
Control	6.6 ± 0.35	0.07
LPS 1µg/ml, 24 h	9.8 ± 0.51*	0.11*
EtOH 50 mM, 24 h	6.8 ± 0.15	0.07
ACH 175 µM, 24 h	7.4 ± 0.34*	0.26*
LPS 1µg/ml, 72 h	6.5 ± 0.06	0.13*
EtOH 50 mM, 72 h	8.8 ± 0.36*	0.10*
ACH 175 µM, 72 h	22.5 ± 0.29*	0.66*
LPS+EtOH	10.3 ± 0.04*	0.18*
LPS+ACH	17.0 ± 0.43*	0.31*

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes de la concentración de GSSG ± D.S. y del cociente GSSG/GSH (n = 6). \* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una  $p \leq 0.05$ .

Por otra parte, en la Tabla III se presentan los valores del cociente de GSSG/GSH en las células de la línea HepG2, el tratamiento con ACH a corto plazo, así como los tratamientos con LPS, EtOH y ACH a largo plazo y el pretratamiento con la endotoxina, los cuales produjeron más alteración en el estado redox en las células con respecto al grupo control.

En el caso de los tratamientos con acetaldehído a corto y largo plazo se produjo un elevado incremento en el cociente del 271% y 842% al compararlos con el grupo control. Al evaluar el efecto del pretratamiento con la endotoxina en presencia de ACH también se observó que el cociente de GSSG/GSH aumentó significativamente en un 342% con respecto al control y del 63% con relación al tratamiento a corto plazo, presentándose un efecto potencializador del LPS con el acetaldehído en este parámetro.

Asimismo, el tratamiento con LPS a corto plazo produjo un pequeño incremento en la relación GSSG/GSH del 57% y en el tratamiento a largo plazo del 86%, con referencia a las células control.

En los resultados del tratamiento con EtOH a largo plazo se observa aumento en el cociente del 42% y con el pretratamiento con la endotoxina un incremento del 157%, observándose un efecto aditivo del LPS en conjunto con el EtOH, alterando el estado redox de las células. El tratamiento con EtOH a corto plazo no presentó diferencia significativa con respecto al control.

## **VI .5. Microscopía electrónica de transmisión**

Para corroborar el daño generado por la exposición a LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , etanol 50 mM, acetaldehído 175  $\mu\text{M}$  a corto y largo plazo y el pretratamiento con endotoxina, se evaluaron los cambios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión. Las células control presentaron una forma típica de hepatocitos en cultivo crecidos sobre un sustrato rígido y la distribución en toda la superficie es uniforme. El tamaño del núcleo y su forma redondeada son característicos con cromatina dispersa, además se presentaron varios nucleolos, así como organelos intracitoplásmicos. Las mitocondrias tienen desarreglo en su estructura y crestas. Se observa el retículo endoplásmico rugoso, predominantemente y el retículo endoplásmico liso. También se aprecian algunos gránulos de lípidos claros y oscuros (micrografía 6).

En la micrografía 7 se observan los cambios morfológicos en las células tratadas con LPS a corto plazo, el núcleo no presenta su forma redondeada y la envoltura nuclear es más clara, lo que sugiere que la células pueden estar en apoptosis, la cromatina está compactada. Se presentan vesículas con cubierta de clatrina. Las mitocondrias presentan daño, no son de tamaño normal, están fragmentadas e hinchadas, algunas están vacías y la crestas no están bien definidas. Se presentan abundantes gotas lipídicas claras y oscuras, así como

un cuerpo mielínico que aparentemente se trata de residuos de estructuras mitocondriales y de membranas celulares, estos cuerpos las fagocitan probablemente debido al daño generados por el LPS.

Los cambios ultraestructurales observados en las células expuestas con etanol a corto plazo se muestran en la micrografía 8. Las células presentan un núcleo multilobulado, es decir con plegamientos en la envoltura nuclear y cromatina dispersa. Se distinguen abundantes vacuolas con material residual, es decir autofagosomas secundarios con fragmentos celulares, denominados cuerpos mielínicos. El retículo endoplásmico rugoso se observa desorganizado y con numerosos ribosomas libres. Las mitocondrias están hinchadas y con desorganización de sus crestas. Se presentan gotas de grasa más densas y gránulos mixtos con doble contorno.

Los cambios morfológicos que presentaron las células tratadas con acetaldehído a corto plazo se muestran en la micrografía 9. El núcleo es característico de un hepatocito, la cromatina presenta un arreglo atípico. Se localizan abundantes mitocondrias, las cuales son de tamaño variable y presentan alteraciones morfológicas como son alargadas, aplanadas e hinchadas. Se puede ver la presencia de megamitocondrias y el retículo endoplásmico rugoso es abundante. Se observa un cuerpo mielínico y gotas lipídicas claras y oscuras de diferentes tamaños.

Las alteraciones morfológicas que presentaron las células con el tratamiento con LPS a largo plazo se muestran en la micrografía 10. El núcleo se encuentra alargado y la cromatina presenta arreglo atípico. Se observan residuos de mitocondrias y membranas celulares denominados cuerpos mielínicos de diferente tamaño. Hay presencia de vesículas cubiertas de clatrina y vacuolas vacías. El retículo endoplásmico liso está dilatado y se observan gotas claras de lípidos de diferentes tamaños.

En la micrografía 11 se observan los cambios ultraestructurales que presentaron las células expuestas con etanol a largo plazo, se aprecia un

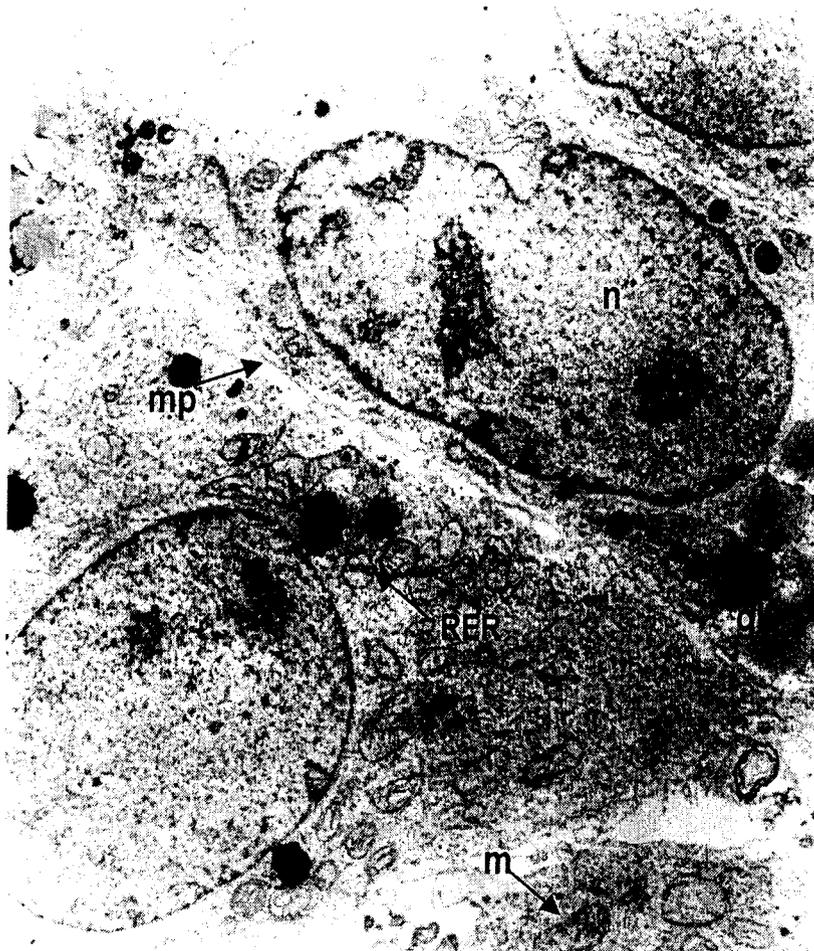
núcleo con cara abierta. La membrana plasmática presenta microvellosidades con prolongaciones citoplasmáticas que sugieren una elevada actividad absorptiva. Las mitocondrias están alteradas, alargadas, aplanadas, las crestas no están bien definidas. Se observan gotas lipídicas claras y oscuras. El retículo endoplásmico está desorganizado y con numerosos ribosomas libres. Se observa un autofagosoma, que es una vacuola fagocítica de material de la propia célula.

En el tratamiento con acetaldehído a largo plazo (micrografía 12) se puede observar que el núcleo se encuentra en apoptosis, la cromatina se aprecia compactada. El daño mitocondrial es notable en tamaño y la presencia de crestas no bien definidas. Se presentan algunos cuerpos residuales. Las gotas de lípidos son oscuras y abundantes.

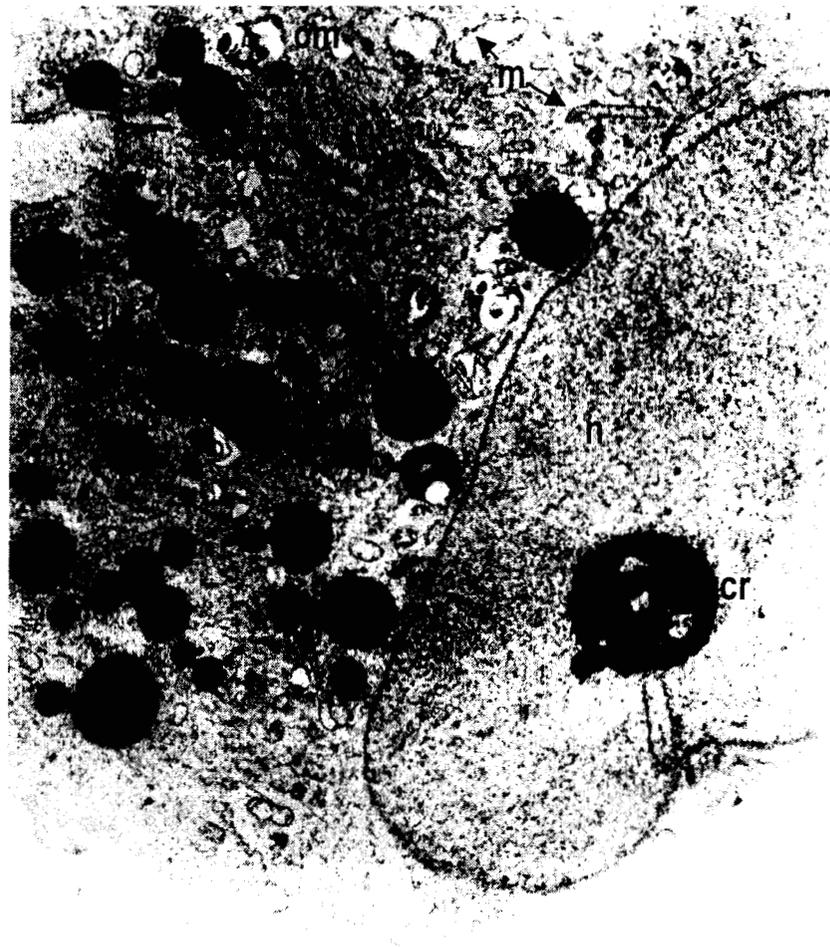
La micrografía 13 representa los cambios morfológicos de las células con el pretratamiento con la endotoxina más etanol. La membrana plasmática presenta plegamiento y hay cúmulos de glucógeno en el citoplasma. Se observan dos tipos de mitocondrias, es decir, de diferente estructura y tamaño, estas últimas son de gran tamaño megamitocondria, también presentan alteración morfológica ya que las crestas no están bien definidas. Hay presencia de cuerpos mielínicos que probablemente tienen capacidad fagocítica y cuerpos residuales. El citoesqueleto es abundante y se presentan gotas grandes de lípidos de color claro en el citoplasma.

Las alteraciones morfológicas de las células que estuvieron expuestas con el pretratamiento con LPS más acetaldehído se muestran en la micrografía 14. El núcleo tiene forma atípica y la cromatina no se distingue. La membrana plasmática tiene microvellosidades y prolongaciones citoplásmicas que sugieren cambios en la plasticidad de la célula, así como acumulación de material granular (no caracterizado). Las mitocondrias son de diferentes tamaños con respecto al control, están hinchadas, fragmentadas y con alteraciones en las crestas. Hay abundantes gotas lipídicas de diferentes tamaños en el citoplasma, predominando las gotas oscuras.

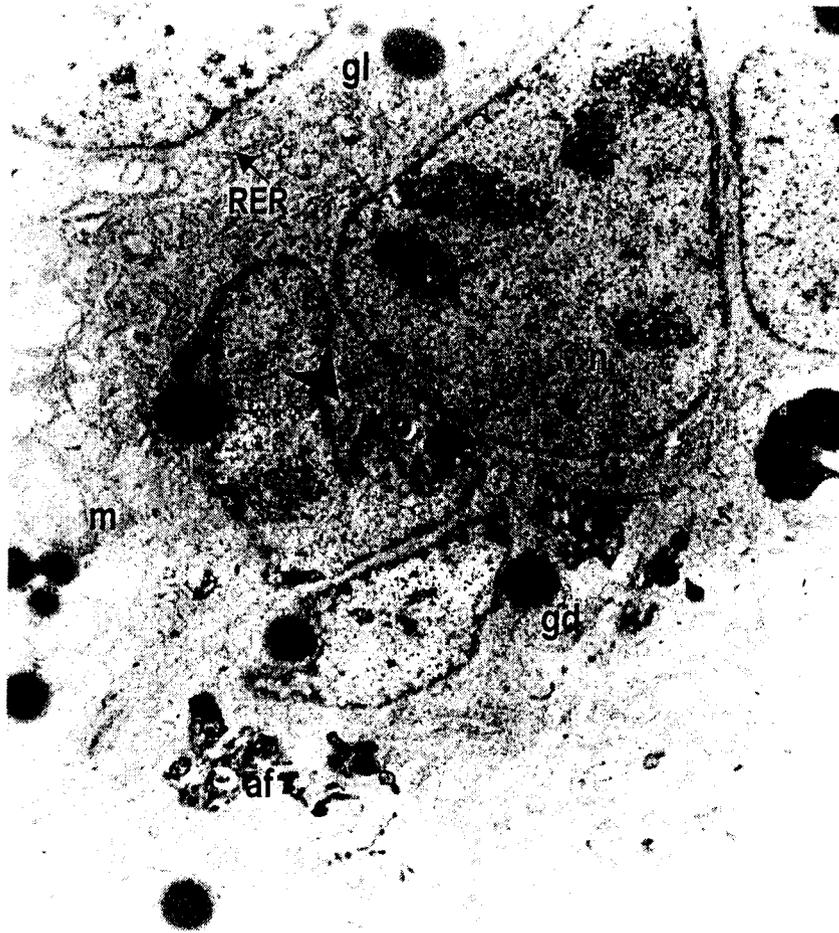
**Micrografía 6.** Microscopía electrónica de transmisión de **células de la línea HepG2 Control**. En donde se observa la estructura típica de un hepatocito. Se aprecian estructuras como el núcleo (**n**), cromatina (**cr**), membrana plasmática (**mp**), mitocondrias (**m**), retículo endoplásmico rugoso (**RER**) y gránulos de lípidos (**gl**). (4400 X)



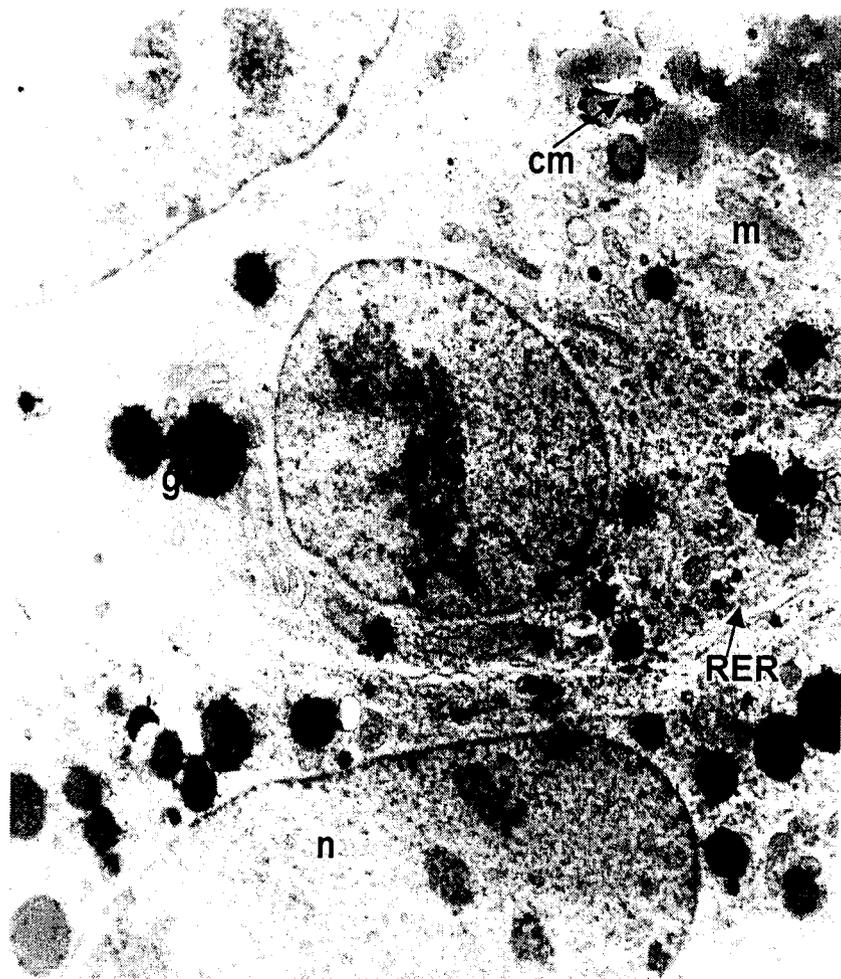
**Micrografía 7.** Microscopía electrónica de transmisión de **células de la línea HepG2 con el tratamiento con LPS a corto plazo (24 h)**. Se aprecia que el núcleo no tiene forma redondeada (**n**), la cromatina está compactada (**cr**), las mitocondrias se encuentran alteradas (**m**), hay abundantes gotas de lípidos (**gl**), se aprecia un cuerpo mielínico (**cm**). (4400 X)



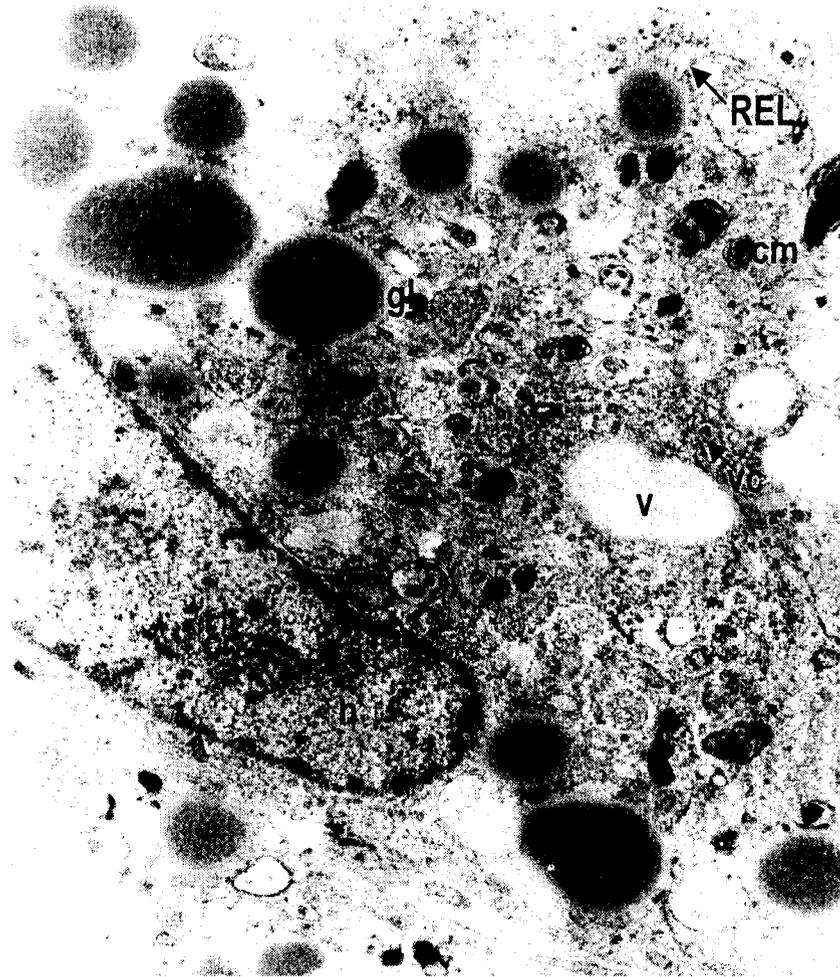
**Micrografía 8.** Microscopía electrónica de transmisión de **células de la línea HepG2** expuestas con **etanol a corto plazo (24 h)**. En donde se aprecian estructuras como el núcleo (**n**) el cual presenta plegamiento en la envoltura nuclear (**►**), cromatina dispersa (**cr**), retículo endoplásmico rugoso desorganizado (**RER**), mitocondrias dañadas (**m**), gotas de lípidos densas (**gl**), gránulos densos con doble contorno (**gd**) y un autofagosoma (**af**). (4400 X)



**Micrografía 9.** Microscopía electrónica de transmisión de células de la línea HepG2 tratadas con acetaldehído a corto plazo (24 h). Se observan estructuras características de un hepatocito como el núcleo (n), la cromatina muestra un arreglo atípico (cr), abundantes mitocondrias alteradas (m), retículo endoplásmico rugoso (RER), gotas de lípidos claras y oscuras (gl) y un cuerpo mielinico (cm). (4400 X)



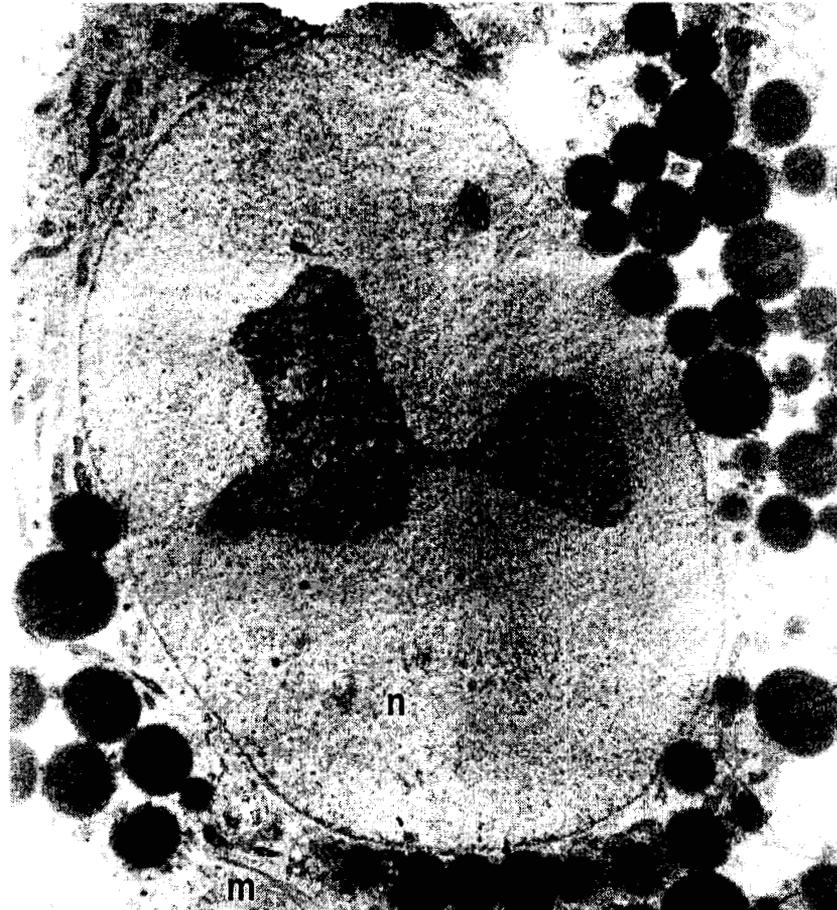
**Micrografía 10.** Microscopía electrónica de transmisión de células HepG2 expuestas con LPS a largo plazo (72 h). Se observan organelos como el núcleo el cual está alargado (n), cromatina dispersa (cr), retículo endoplásmico liso dilatado (REL), vesículas con cubierta de clatrina (vc), vacuolas (v), cuerpos mielínicos de diferentes tamaños (cm), gotas lípidos (gl). (3000 X)



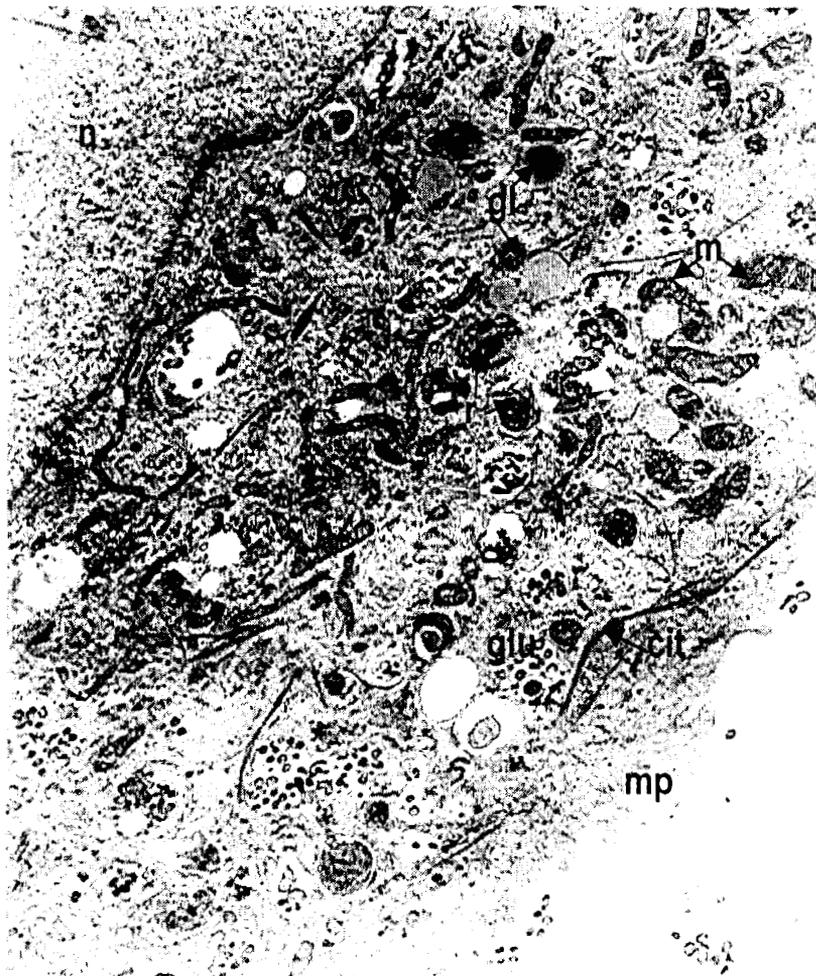
**Micrografía 11.** Microscopía electrónica de transmisión de **células de la línea HepG2** tratadas con **etanol a largo plazo (72 h)**. Se presenta un núcleo con cara abierta (**n**), cromatina dispersa (**cr**), membrana plasmática con abundantes prolongaciones y microvellosidades (**mp**), retículo endoplásmico desorganizado (**RE**), abundantes mitocondrias alteradas, alargadas, aplanadas y crestas no bien definidas (**m**), autofagosoma (**af**) y pocas gotas de lípidos (**gl**). (4400X)



**Micrografía 12.** Microscopía electrónica de transmisión de células de la línea HepG2 tratadas con acetaldéhidó a largo plazo (72 h). El núcleo se encuentra en apoptosis (n), cromatina compactada (cr), mitocondrias dañadas, alargadas e hinchadas (m), y abundantes gotas de lípidos (gl). (3000 X)



**Micrografía 13.** Microscopía electrónica de transmisión de células HepG2 con el pretratamiento de la endotoxina con etanol. Se aprecian organelos como el núcleo (n), con cromatina dispersa, mitocondrias de diferente tamaño y las crestas no están bien definidas (m), membrana plasmática con algunas microvellosidades (mp) y plegamiento, cúmulos de glucógeno (glu), citoesqueleto abundante (cit) abundantes cuerpos residuales (r) y pocas gotas de lípidos (gl). (4400 X)



**Micrografía 14.** Microscopía electrónica de transmisión de células HepG2 con el **pretratamiento de la endotoxina con acetaldehído**. Se muestran organelos como el núcleo el cual tiene forma atípica (**n**), cromatina (**cr**), membrana plasmática con microvellosidades (**mp**), acumulación de material granular en el citoplasma (**mg**), mitocondrias con alteraciones en las crestas, (**m**) y gotas de lípidos oscuras (**gl**). (4400 X)



## VI.6. Células estelares hepáticas (CFSC-2G)

### VI. 6.1. Prueba Citotoxicidad (Ensayo de Rojo Neutro)

La citotoxicidad inducida por diferentes concentraciones de LPS por un periodo de 48 h en las células estelares hepáticas se evaluó por el ensayo de rojo neutro. Los datos se expresaron como el porcentaje de la absorbancia de rojo neutro con respecto a las células control. Los resultados de esta prueba están representados en la Tabla IV. Se observa que el porcentaje de captación del rojo neutro por los lisosomas disminuye significativamente al aumentar la concentración de la endotoxina, comparado respecto a las células control.

Por lo expresado en la sección VI.1. en las células de la línea HepG2, se decidió utilizar la concentración de LPS con 1  $\mu\text{g/ml}$  en las células estelares hepáticas, ya que las células presentan una funcionalidad semejante al grupo control y la valoración morfológica por microscopía óptica tenía una apariencia normal.

Tabla IV. Captación lisosomal de rojo neutro en células estelares hepáticas con diferentes concentraciones de LPS durante 48 horas

Concentración de LPS $\mu\text{g/ml}$	% de Absorbancia (540 nm)
Control	100 $\pm$ 0.8
0.01	83 $\pm$ 1.5 *
0.1	89 $\pm$ 1.1*
1	81 $\pm$ 1.5*
5	75 $\pm$ 1.2*
10	55 $\pm$ 1.3*

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  D.S. del porcentaje de la absorbancia lisosomal de rojo neutro con referencia al grupo control (n = 9). \* Diferencia significativa con referencia al control con una  $p \leq 0.05$ .

## VI .7. Determinación de las actividades enzimáticas en medios de cultivo

### VI. 7.1. Determinación de la actividad extracelular de LDH

Las células estelares hepáticas se sometieron a los mismos tratamientos que las células de la línea HepG2. La citotoxicidad que presentaron las células estelares a los diferentes tratamientos, evaluada como la liberación de la LDH al medio de cultivo se presenta en la figura 15.

Se observa que para el grupo control el valor de la actividad enzimática fue de  $12.3 \pm 1.1$  mU/10<sup>6</sup> células. Al analizar los resultados del tratamiento con la endotoxina a corto plazo, la actividad enzimática de la LDH se incrementó un 106% ( $25.4 \pm 1.2$  mU/10<sup>6</sup> células) y en las tratadas a largo plazo un 93% ( $23.8 \pm 1.2$  mU/10<sup>6</sup> células) con referencia a las células control. Las células que estuvieron expuestas con EtOH a largo plazo presentaron un valor de  $41.8 \pm 2.1$  mU/10<sup>6</sup> células, lo que representa un 239% de incremento en la actividad de la enzima.

La actividad enzimática en el tratamiento con ETOH a corto plazo y el pretratamiento con la endotoxina en presencia de este tóxico, no presentó diferencia significativa con referencia a las células control.

Por otra parte, en los tratamientos con acetaldehído a corto plazo y largo plazo se presentó el mayor incremento en la actividad enzimática de LDH en relación con los otros tratamientos. En el tratamiento con ACH a corto plazo se produjo un incremento del 233% ( $41 \pm 2.3$  mU/10<sup>6</sup> células) y en el de largo plazo del 515% ( $75.7 \pm 3.3$  mU/10<sup>6</sup> células), con respecto al grupo control.

En el caso de las células pretratadas con la endotoxina con ACH, aunque presentaron un incremento en la actividad de LDH del 200% ( $36.9 \pm 1.3$  mU/10<sup>6</sup> células), el pretratamiento con la endotoxina no potenció la actividad de la enzima.

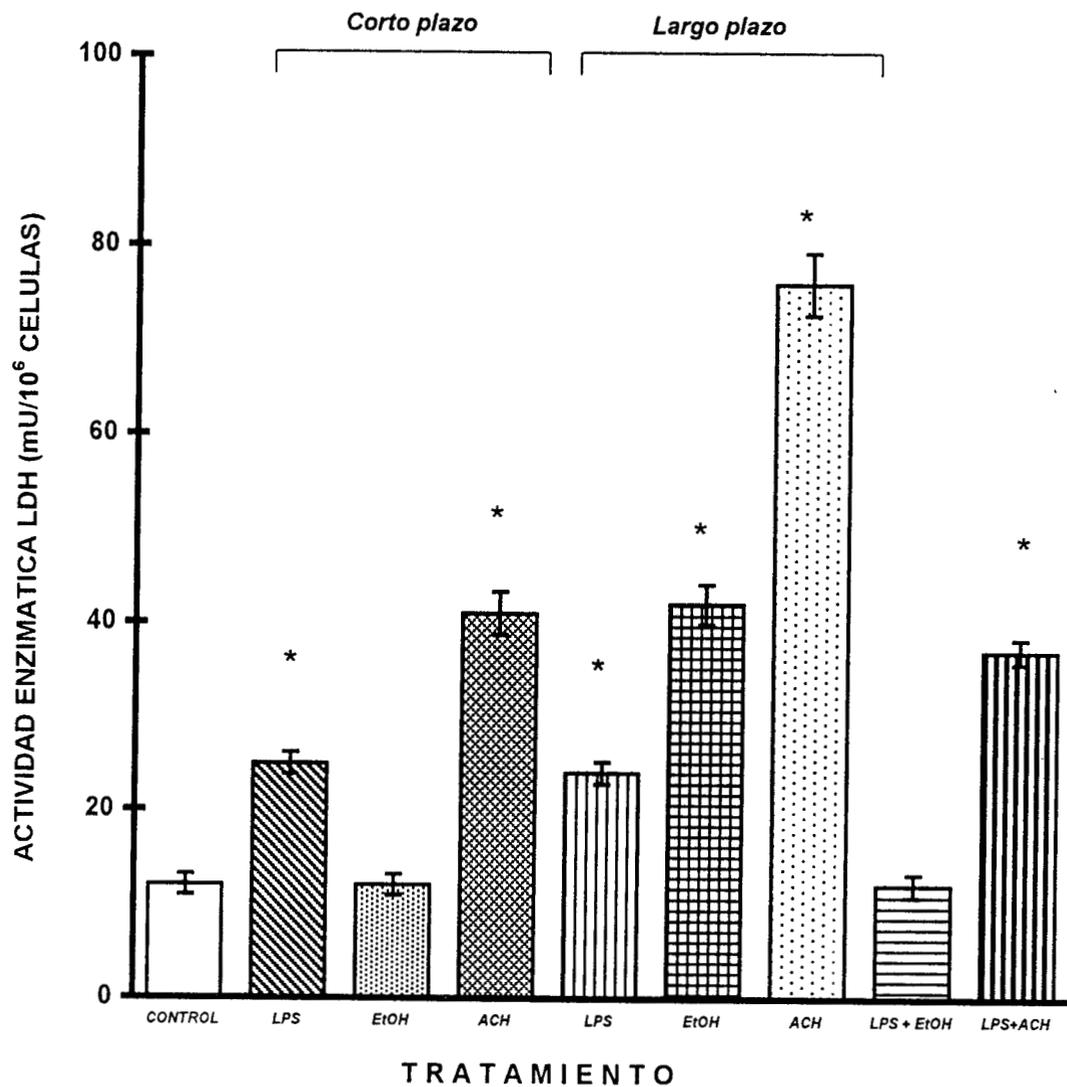


Figura 15. Actividad enzimática de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en medios de cultivo de células estelares hepáticas, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1  $\mu$ g/ml, EtOH 50 mM, ACH 175  $\mu$ M y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  D.S. (n = 9). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

## VI .8. Determinación del grado de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación que presentaron las células estelares hepáticas, se cuantificó espectrofotométricamente por la cantidad de MDA producida en presencia de ácido tiobarbitúrico. Los resultados de esta prueba se presentan en la figura 16. El valor presentado por las células control fue  $95 \pm 6$  pmol MDA/mg proteína. Se observó que en todos los tratamientos aumentó significativamente la producción de MDA con respecto a las células control. Siendo los tratamientos a largo plazo en donde se presentó el mayor daño lipoperoxidativo.

En el tratamiento con LPS a corto plazo se produjo un aumento en la cantidad de MDA del 30% ( $124 \pm 4$  pmol /mg proteína) y en el de largo plazo de un 68% ( $160 \pm 11$  pmol/mg proteína). El tratamiento con EtOH a corto plazo aumentó significativamente la cantidad de MDA en un 118% ( $207 \pm 9$  pmol /mg proteína) y en el de largo plazo un 347% ( $425 \pm 18$  pmol MDA /mg proteína), con referencia a las células control.

El análisis de estos resultados indican que mientras la exposición con acetaldehído a corto plazo provocó un pequeño aumento en la cantidad de MDA del 28% ( $122 \pm 9$  pmol / mg proteína) el tratamiento a largo plazo produjo un mayor incremento del 465% ( $537 \pm 78$  pmol / mg proteína), valor que representa el mayor daño lipoperoxidativo de todos los tratamientos.

En el caso del pretratamiento con la endotoxina con ACH se produjo un incremento en la producción de MDA del 67% ( $159 \pm 11$  pmol/mg proteína) y con etanol del 82% ( $173 \pm 12$  pmol/mg proteína), en relación con el grupo control. En todos los casos se obtiene un mayor daño lipoperoxidativo en los tratamientos a largo plazo que en los de corto plazo. En el caso del pretratamiento con la endotoxina no se observó un efecto aditivo en conjunto con el EtOH o ACH.

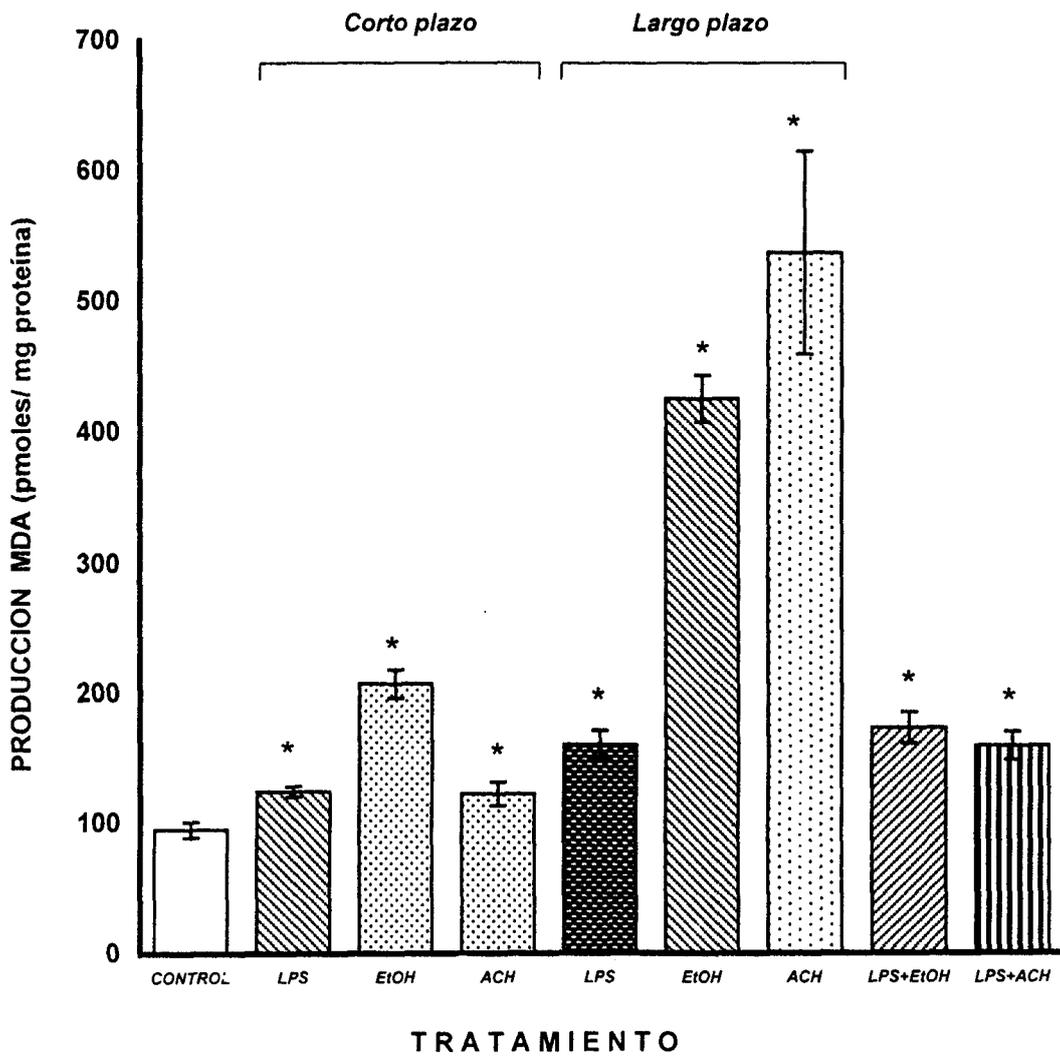


Figura 16. Grado de Liperoxidación, determinado como producción de Malondialdehído (MDA) en células estelares hepáticas, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS  $\mu\text{g/ml}$ , EtOH 50 mM, ACH 175  $\mu\text{M}$  y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  D.S. (n = 6). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

## VI. 9. Determinación del contenido de glutatión

La cantidad de grupos tioles en las células estelares hepáticas se determinó espectrofotométricamente al reaccionar el DTNB con los grupos -SH. En la figura 17 se muestra el contenido de glutatión de las células estelares en los diferentes tratamientos. Al analizar estadísticamente los resultados se obtuvo que el contenido de GSH disminuyó significativamente en todos los tratamientos con respecto al control cuyo valor fue de  $23.5 \pm 0.24$  nmoles -SH /mg proteína. Se observa una disminución del GSH más notable en los tratamientos a largo plazo con etanol, acetaldehído y en el pretratamiento con la endotoxina.

En el caso del tratamiento con LPS a corto plazo se presentó una disminución del 64% ( $8.4 \pm 0.4$  nmoles -SH /mg proteína) y en el de largo plazo del 61% ( $9 \pm 0.9$  nmoles -SH /mg proteína) en la concentración de GSH en comparación con las células control.

Es importante resaltar que las células con el tratamiento con EtOH a corto plazo el contenido de GSH disminuyó un 82% ( $4.2 \pm 0.5$  nmoles -SH /mg proteína) y en el de largo plazo 94% ( $1.4 \pm 0.22$  nmoles -SH /mg proteína) . En el tratamiento con ACH a corto plazo se presentó una disminución del 30% ( $16.3 \pm 0.8$  nmoles -SH /mg proteína) y en el de largo plazo del 88% ( $2.7 \pm 0.12$  nmoles -SH /mg proteína) en comparación con las células control.

En el pretratamiento de la endotoxina con etanol disminuye ( $2.4 \pm 0.2$  nmoles -SH /mg proteína) el 90% la cantidad de glutatión reducido con respecto al control y un 42% con referencia al tratamiento con etanol. En el caso del pretratamiento de LPS con acetaldehído se presenta una disminución ( $2.7 \pm 0.03$  nmoles -SH /mg proteína) del 86% con respecto al control, y de un 83% con referencia a las células tratadas con acetaldehído. Por lo tanto, el pretratamiento con la endotoxina produce una disminución considerable de GSH.

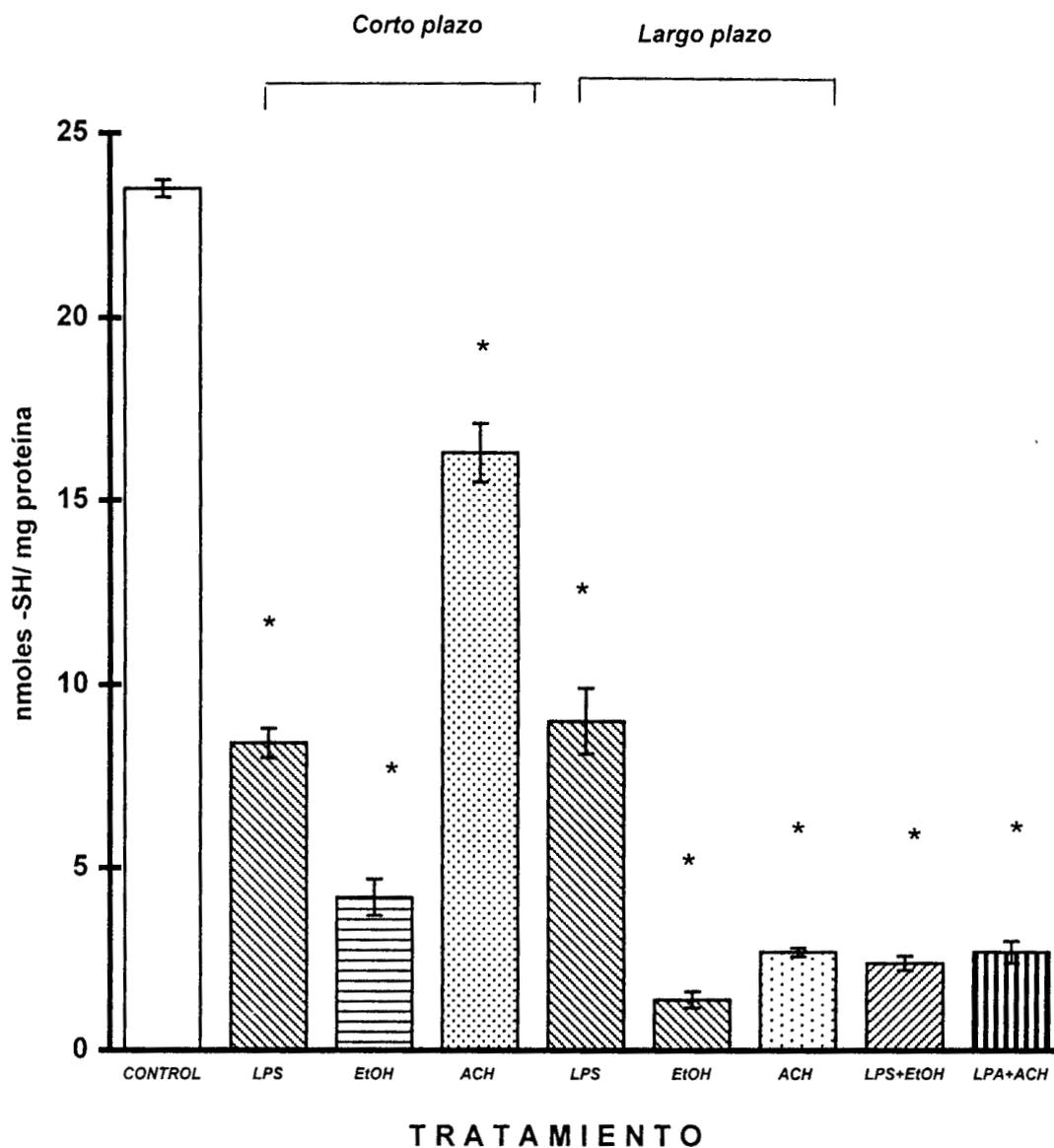


Figura 17. Concentración de Glutatión reducido (GSH) en células estelares hepáticas, de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1  $\mu$ g/ml, EtOH 50 mM, ACH 175  $\mu$ M y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  D.S. (n = 6). \* Diferencia significativa  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

222865

Por otro lado, los valores del contenido de glutatión oxidado (GSSG) en las células estelares hepáticas en los diferentes tratamientos se representan en la Tabla V. Se observa que únicamente se presentan incrementos en la concentración de GSSG en los pretratamientos con la endotoxina. Debido a que en el pretratamiento en presencia de EtOH hubo un incremento del 166% en la concentración de GSSG y en el caso de ACH el incremento fue más considerable siendo del 452% con respecto a las células control. Estos resultados nos permiten establecer que el pretratamiento con la endotoxina resulta en un aumento significativo del contenido de GSSG.

**TABLA V. Concentración de GSSG y cociente GSSG/GSH en células estelares hepáticas de los tratamientos con LPS, etanol, acetaldehído a corto plazo (24 h), largo plazo (72 h) y el pretratamiento con endotoxina**

Tratamiento	Concentración de GSSG	
	(nmoles/mg proteína)	GSSG/GSH
Control	1.05 ± 0.05	0.04
LPS 1µg/ml, 24 h	1.03 ± 0.04	0.12*
EtOH 50 mM, 24 h	1.10 ± 0.05	0.26*
ACH 175 µM, 24 h	1.30 ± 0.02	0.07
LPS 1µg/ml, 72 h	1.20 ± 0.03	0.13*
EtOH 50 mM, 72 h	1.04 ± 0.02	0.58*
ACH 175 µm, 72 h	1.26 ± 0.05	0.47*
LPS+EtOH	2.80 ± 0.16*	1.2*
LPS+ACH	5.80 ± 0.32*	2.1*

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes de la concentración de GSSG ± D.S. y el cociente GSSG/GSH con referencia al grupo control (n = 6).

\* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una  $p \leq 0.05$ .

Por otra parte, los valores del cociente de GSSG/GSH en las células estelares hepáticas se presentan en la Tabla V. En los tratamientos con LPS,

EtOH, ACH y el pretratamiento con la endotoxina se presentaron variaciones en los valores del cociente con respecto al grupo control, alterándose la capacidad de regulación en el estado oxido-reducción en las células.

No obstante, en las células tratadas con LPS a corto y largo plazo se produjo un incremento del 200% y 225% respectivamente en el cociente. En el caso de las células tratadas con EtOH a corto plazo con se produjo un aumento del 550%, siendo más notable en el tratamiento a largo plazo el cual presentó un incremento del 1750% en la relación GSSG/GSH. Los datos del tratamiento a largo plazo con ACH indican que se incrementó en 1075% este parámetro.

En el caso del pretratamiento con la endotoxina en presencia de EtOH se produjo un incremento del 2900 % y con ACH se presentó el mayor incremento del 5150% en el cociente GSSG/GSH. Estos resultados nos permiten establecer que en el pretratamiento en conjunto con el EtOH y/o ACH se presenta un efecto potencializador en este parámetro.

#### **VI. 10. Determinación de colágena**

El contenido de colágena celular y la colágena secretada a los medios de cultivo por las células estelares hepáticas se encuentran graficados en la figura 18. Se observa en términos generales que el contenido de colágena celular es menor que la cantidad secretada al medio de cultivo. Además, que el contenido celular de colágena es mayor en los tratamientos donde hay mayor secreción.

Los resultados del contenido de colágena celular se representan en la figura 18A. Las células control presentaron un valor en el contenido de colágena de  $318 \pm 13 \mu\text{g}$  de clg. En el tratamiento con ACH a corto plazo se produjo un incremento en el contenido de colágena del 151% ( $800 \pm 79 \mu\text{g clg}/10^6$  células) y en el de largo plazo del 187% ( $913 \pm 23 \mu\text{g clg} / 10^6$  células), con referencia a las células control.

En el caso del tratamiento con EtOH a corto plazo el contenido de colágena celular fue de  $534 \pm 15 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ , lo que representa un 67% de incremento y en el de largo plazo del 88% ( $600 \pm 22 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ).

El contenido de colágena celular con el tratamiento con LPS a largo plazo presentó un aumento del 62% ( $514 \pm 48 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ), mientras que el tratamiento a corto plazo con la endotoxina no presentó una diferencia significativa ( $319 \pm 14 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ), con respecto a las células control.

El análisis de los resultados del pretratamiento con la endotoxina en presencia de EtOH indican que el incremento del contenido de colágena celular fue del 124% ( $715 \pm 98 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ). Mientras que el pretratamiento de la endotoxina con ACH produjo un incremento del 155% ( $810 \pm 52 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ), en comparación con el grupo control.

Por otra parte, en los resultados de la colágena secretada a los medios de cultivo figura 18B, se observa que las células control presentaron un valor de  $440 \pm 22 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ . Los datos de las células tratadas con LPS a corto plazo presentaron un aumento pequeño en la secreción de colágena del 13% ( $500 \pm 40 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ) y con EtOH del 26% ( $553 \pm 49 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ), con respecto a las células control.

Al analizar los datos, las células tratadas con ACH a corto y largo plazo produjeron la mayor secreción de colágena. El tratamiento a corto plazo presentó un incremento del 124% ( $988 \pm 82 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ) y el de largo plazo del 167%, con referencia al control.

En el tratamiento con LPS a largo plazo se produjo un incremento del 166% en la secreción de colágena ( $1169 \pm 91 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ). En el caso del tratamiento con EtOH a largo plazo se presentó un aumento del 98% ( $872 \pm 33 \mu\text{g clg} / 10^6 \text{ células}$ ), en comparación con el grupo control.

En el pretratamiento con la endotoxina, también aumentó la secreción de colágena en presencia de EtOH ( $969 \pm 56 \mu\text{g clg}/10^6$  células) lo que equivale a un 120 % con respecto al control y de un 75 % con referencia al tratamiento de etanol.

En el pretratamiento con la endotoxina en presencia de ACH se produjo un incremento del 209% en la secreción de colágena ( $1369 \pm 72 \mu\text{g clg}/10^6$  células) con respecto a las células control, y del 37% en comparación con el tratamiento con ACH. Estos resultados nos permiten sugerir, que el LPS potenció la secreción de colágena en presencia de etanol y/o el acetaldehído

Los resultados de este estudio nos permiten establecer que la secreción de colágena al medio de cultivo de las células estelares hepáticas se incrementó significativamente en todos los tratamientos a largo plazo con LPS, ACH y el pretratamiento de la endotoxina en presencia de etanol y/o acetaldehído.

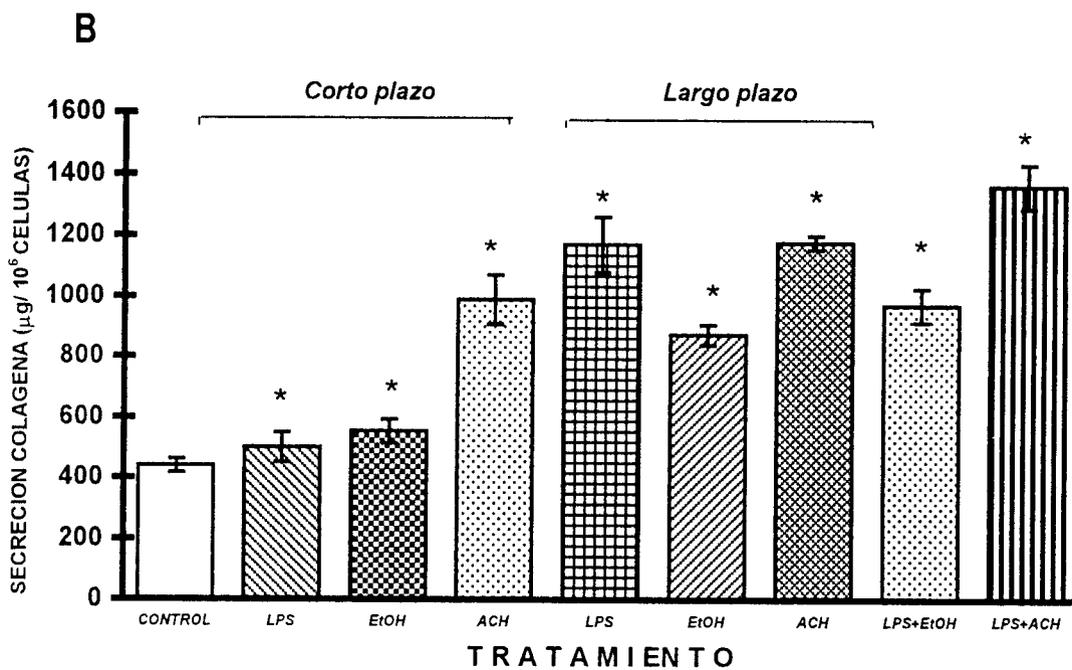
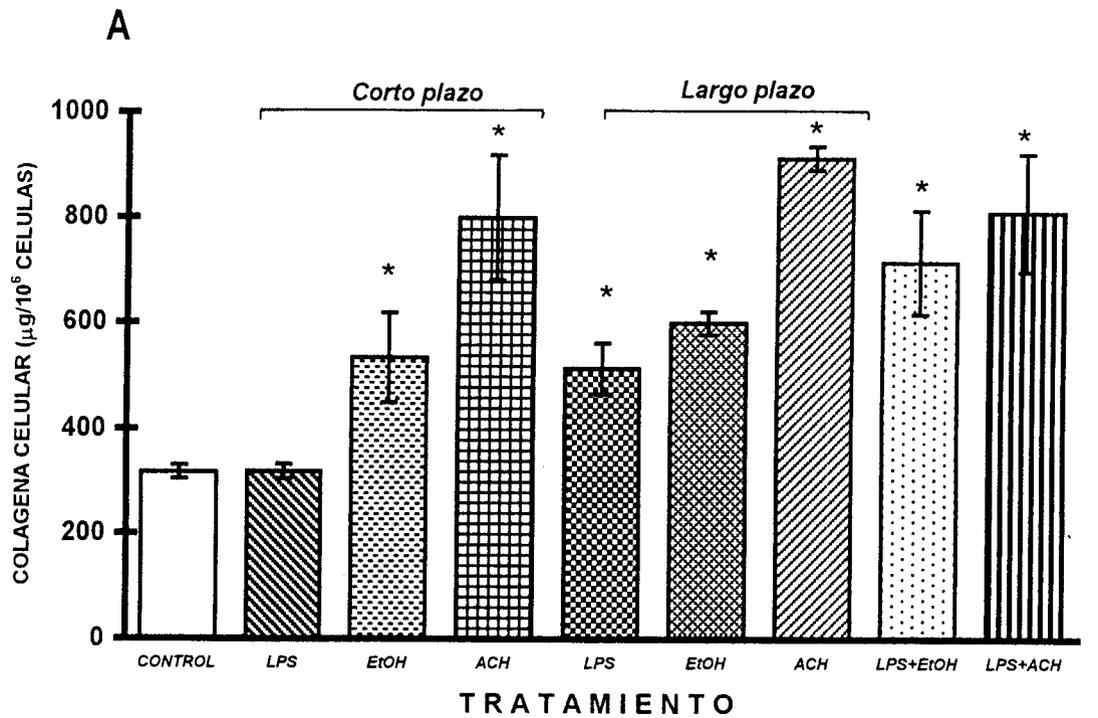


Figura 18. A) Contenido celular de colágena y B) colágena secretada a los medios de cultivo en células estelares hepáticas de los diferentes tratamientos a corto plazo (24 h) y largo plazo (72 h) con LPS 1µg/ml, EtOH 50 mM, ACH 175 µM y el pretratamiento con endotoxina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes ± D.S. (n = 6). \* Diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  con respecto al control.

## VI. 11. Microscopía electrónica de transmisión

Para evaluar los cambios morfológicos en las células estelares hepáticas (CFSC-2G) inducidos por los tratamientos con LPS, EtOH, ACH y el pretratamiento con la endotoxina se realizó microscopía electrónica de transmisión. En el grupo control las células presentaron forma típica de células estelares crecidas en monocapa, el núcleo y la envoltura nuclear presenta plegamientos con abundantes poros nucleares, lo que sugiere que probablemente la célula tiene una gran actividad metabólica, la cromatina está compactada. El retículo endoplásmico rugoso es prominente y con ribosomas libres. Las mitocondrias tienen forma alargada. La membrana plasmática está estable sin prolongaciones. Se observan algunos cuerpos residuales y pocas vesículas de clatrina (micrografía 19) .

Las células tratadas con LPS a corto plazo presentaron cambios ultraestructurales en el núcleo, en la envoltura nuclear en donde persistieron los poros y son de mayor tamaño que el grupo control y la cromatina presenta arreglo atípico. El retículo endoplásmico no es muy visible. Las mitocondrias están alteradas, tienen forma alargada y son más densas. Se aprecian algunas vacuolas, vesículas con clatrina y pocas gotas de lípidos (micrografía 20).

Las observaciones morfológicas de las células expuestas con EtOH a corto plazo indican que el núcleo no presenta plegamientos en la envoltura nuclear persistiendo los poros nucleares, la cisterna perinuclear está dilatada y la cromatina está dispersa y de forma atípica. Las mitocondrias están alteradas debido a que se observan hinchadas y son de tamaño grande. Se encuentra abundante retículo endoplásmico rugoso con ribosomas libres. Los límites de la membrana plasmática no son evidentes y el citoplasma presenta edema (micrografía 21).

En la micrografía 22 se observan las alteraciones ultraestructurales que presentan las células estelares tratadas con ACH a corto plazo. En la envoltura nuclear persisten los poros. Se presenta abundante retículo endoplásmico

rugoso y ribosomas libres. Las mitocondrias presentan alteraciones, se encuentran compactadas y son más pequeñas. Se aprecian algunas gotas de lípidos de color claro.

Los cambios morfológicos de las células tratadas con LPS a largo plazo mostraron que en la envoltura nuclear siguen persistiendo los poros, el retículo endoplásmico rugoso es abundante y con ribosomas libres. Las mitocondrias están dañadas en su estructura. Se observa uno que otro cuerpo residual (micrografía 23).

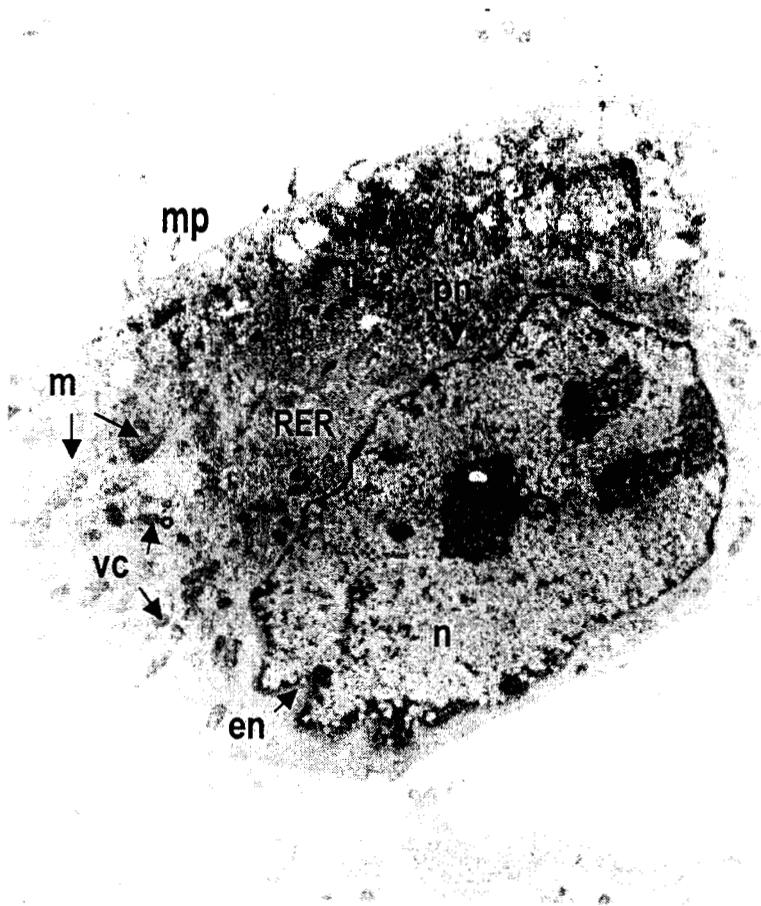
En el caso del tratamiento a largo plazo con EtOH los cambios ultraestructurales se observan en la envoltura nuclear persistiendo los poros alrededor de esta estructura, la cromatina tiene arreglo atípico. Aumenta la permeabilidad de la membrana y el número de prolongaciones, también se encuentran bastantes dilataciones en la membrana plasmática. Se presentan invaginaciones en el retículo endoplásmico y hay algunas vesículas con clatrina (micrografía 24).

Las células expuestas con ACH a largo plazo presentaron cambios ultraestructurales, en la envoltura nuclear persisten los poros nucleares e incluso aumentan en número con respecto al control y a los otros tratamientos, la cromatina presenta forma atípica. La membrana plasmática se observa más fluida y presenta prolongaciones, lo que sugiere que aumenta la capacidad absorptiva y el número de vacuolas aumenta. Las mitocondrias están más densas y alteradas en su estructura y las crestas no están bien definidas (micrografía 25).

En la micrografía 26 se presentan los cambios morfológicos de las células del pretratamiento de la endotoxina con etanol. En la envoltura nuclear disminuyen los poros y la cromatina está dispersa. El retículo endoplásmico rugoso es prominente y con ribosomas libres. Las mitocondrias se encuentran hinchadas. Se observa dilatación en el citoplasma, algunos cuerpos residuales (autofagosomas) y algunas gotas de lípidos.

En el pretratamiento con endotoxina en presencia de acetaldehído se observaron cambios morfológicos en la envoltura nuclear disminuyendo los poros, con dilatación en la cisterna perinuclear. El citoplasma no se ve tan denso y se aprecian pocas gotas de lípidos. Las mitocondrias están dañadas, las crestas y el interior de su matriz presentan plegamientos. El aparato de Golgi es evidente. Se presentan algunos cuerpos mielínicos y cuerpos residuales (micrografía 27).

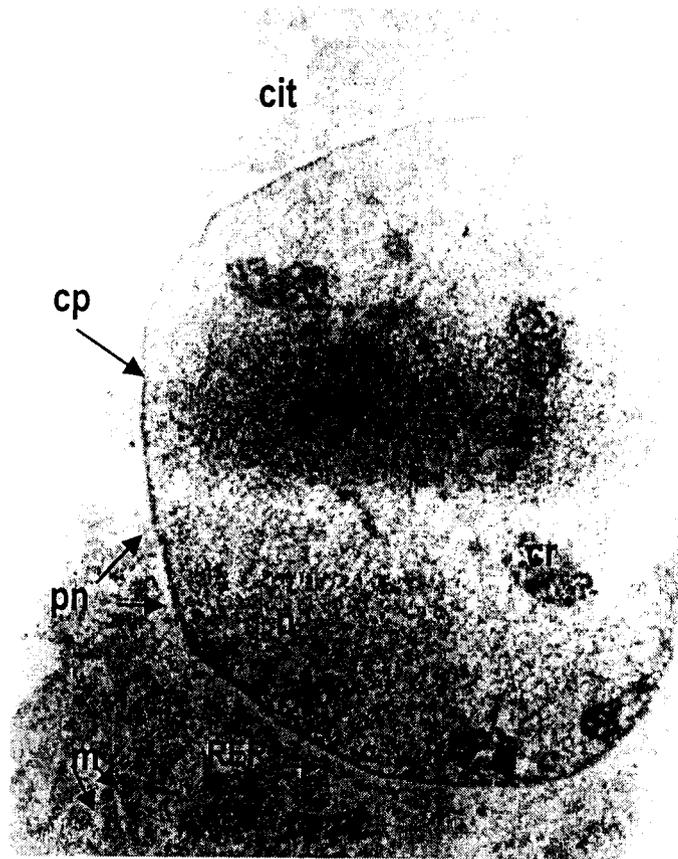
**Micrografía 19.** Microscopía electrónica de transmisión del grupo **control** de **células estelares hepáticas**. En donde se observa la estructura típica de las células crecidas en monocapa. El núcleo (**n**) y la envoltura nuclear (**en**) están plegados y con abundantes poros nucleares (**pn**). Se observa abundante retículo endoplásmico rugoso con ribosomas libres (**RER**), las mitocondrias presentan forma alargada (**m**). La membrana plasmática es estable (**mp**) y pocas vesículas de clatrina (**vc**). (4400 X)



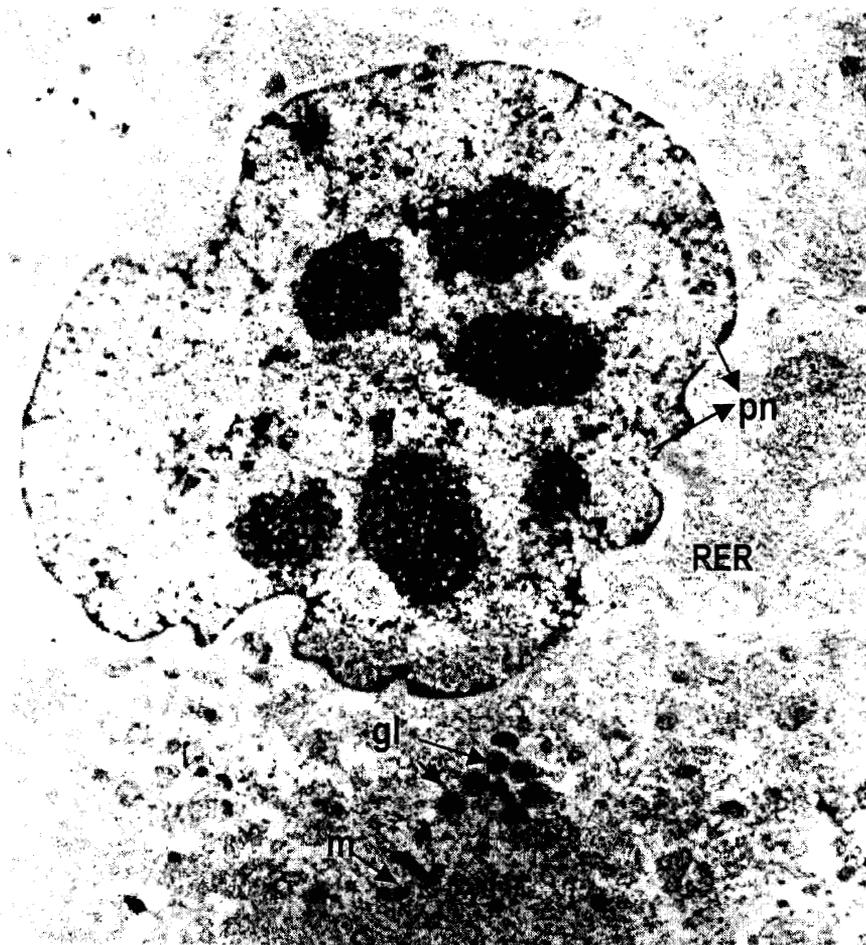
**Micrografía 20.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** tratadas con **LPS a corto plazo**. El núcleo (**n**) y la envoltura nuclear (**en**) presentaron mayor cantidad de poros (**pn**), la cromatina tiene arreglo atípico (**cr**). Las mitocondrias tienen forma alargada (**m**). Se presentan algunas vacuolas (**v**) y vesículas con clatrina (**vc**). (4400 X)



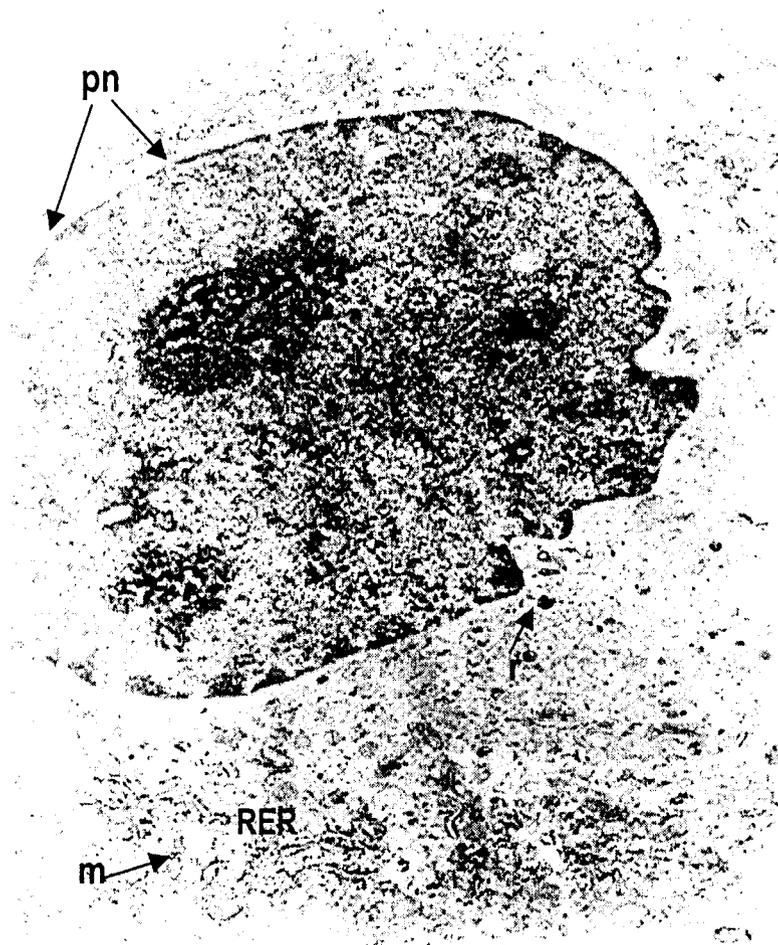
**Micrografía 21.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** expuestas con **etanol a corto plazo**. El núcleo (**n**) no presenta plegamientos, persisten los poros nucleares (**pn**) y la cromatina (**cr**) es de forma atípica, la cisterna perinuclear está dilatada (**cp**). Las mitocondrias están hinchadas y son de mayor tamaño (**m**) el retículo endoplásmico rugoso tiene ribosomas libres (**RER**) y el citoplasma está edematizado (**cit**). (4400 X)



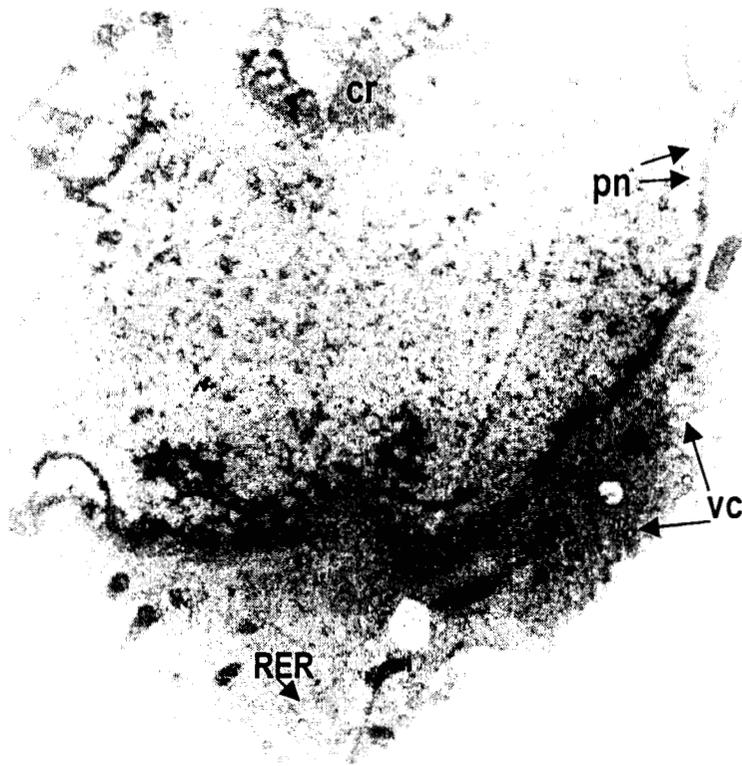
**Micrografía 22.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** con el tratamiento con **acetaldehído a corto plazo**. Los poros nucleares persisten (**pn**), la cromatina se observa compactada (**cr**), abundante retículo endoplásmico rugoso con ribosomas libre (**RER**), la mitocondrias están compactadas y son de menor tamaño (**m**) y algunas gotas de lípidos de color claro (**gl**). (Aumento 4400 X)



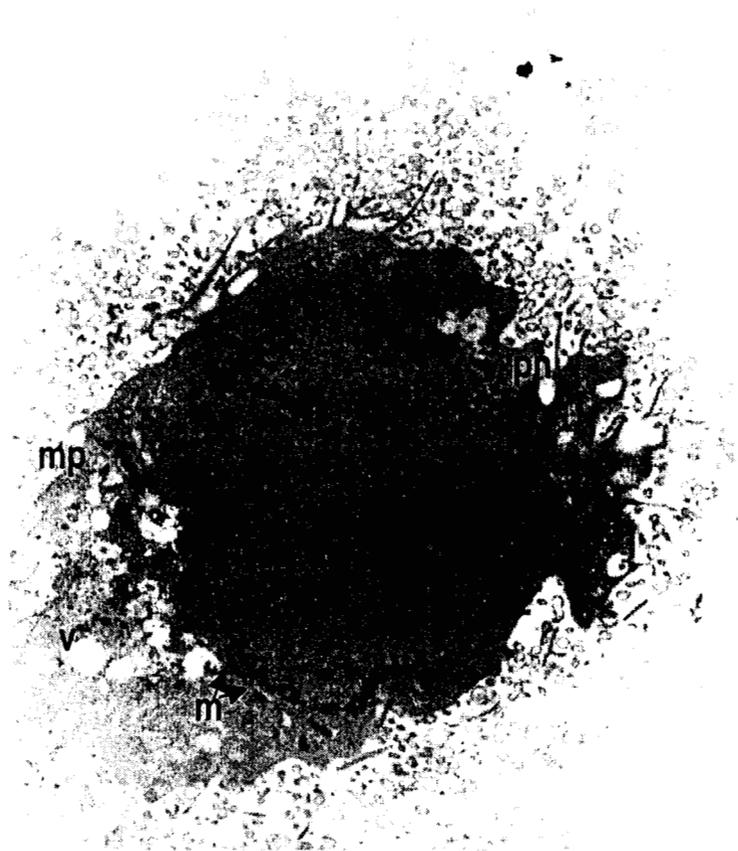
**Micrografía 23.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** tratadas con **LPS a largo plazo**. Se observa que en la envoltura nuclear persisten poros (**pn**), la cromatina (**cr**) es abundante y desorganizada, el retículo endoplásmico rugoso tiene ribosomas libres (**RER**). Las mitocondrias están hinchadas (**m**) y están presentes algunos cuerpos residuales (**r**). (7000 X)



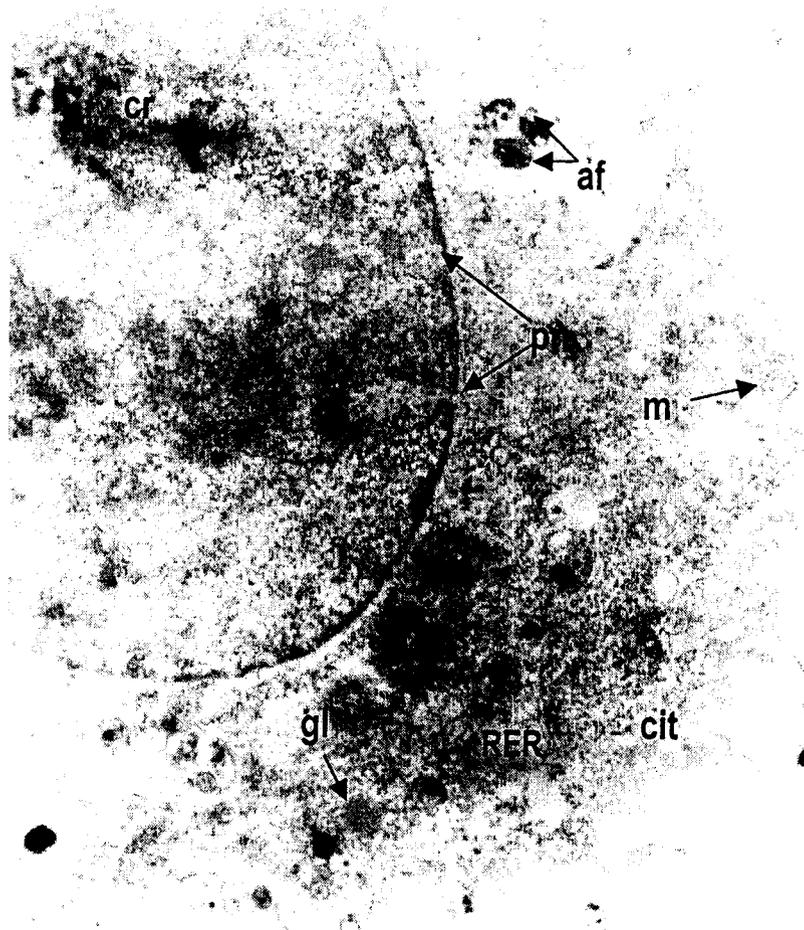
**Micrografía 24.** Microscopía electrónica a de transmisión de **células estelares hepáticas** con el tratamiento con **etanol a largo plazo**. En la envoltura nuclear se siguen apreciando los poros (**pn**), la cromatina tiene arreglo atípico (**cr**). Se observan microvellosidades e invaginaciones en el retículo endoplásmico rugoso (**RER**) y vesículas con clatrina (**vc**). (7000 X)



**Micrografía 25.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** tratadas con **acetaldéhidó a largo plazo**. En la envoltura nuclear se observa gran cantidad de poros en el núcleo (**pn**), la cromatina presenta forma atípica (**cr**). La membrana plasmática se aprecia más fluida (**mp**) y hay abundantes vacuolas (**v**), las mitocondrias están más densas (**m**). (4000 X).



**Micrografía 26.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** con el **pretartamiento con endotoxina con etanol**. Se observa que en la envoltura nuclear disminuyen los poros (**pn**), la cromatina está dispersa (**cr**), retículo endoplásmico rugoso prominente con ribosomas libres ( **RER**). Las mitocondrias se están hinchadas (**m**), hay dilatación en el citoplasma (**cit**), se aprecian pocas gotas de lípidos (**gl**) y autofagosomas (**af**). (7000 X).



**Micrografía 27.** Microscopía electrónica de transmisión de **células estelares hepáticas** con el **pretratamiento con endotoxina en presencia de acetaldehído**. En la envoltura nuclear disminuyó la cantidad de poros en el núcleo (**pn**), hay dilatación en la cisterna perinuclear (**cp**). El citoplasma es poco denso y con algunas gotas de lípidos (**gl**), las mitocondrias presentan plegamientos en el interior de la matriz (**m**), el aparato de Golgi es evidente (**aG**) y hay algunos cuerpos residuales (**r**). (4400 X)



## VII. DISCUSION

En el presente estudio se utilizaron células de hepatoblastoma humano de a línea celular HepG2 y estelares hepáticas derivadas de ratas de la línea CFSC-2G como modelos experimentales *in vitro*, para evaluar el daño celular inducido por LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), EtOH (50 mM), ACH (175  $\mu\text{M}$ ), así como el pretratamiento con la endotoxina bacteriana con etanol o acetaldehído. Se ha reportado que la línea celular HepG2 sintetiza y secreta toda la gama de proteínas de fase aguda que produce el hígado humano (Aden y col., 1979), que mantiene funciones características de las células parenquimatosas y es un modelo *in vitro* adecuado para estudiar el efecto citotóxico inducido por el etanol (Neuman y col.,1993) y otros agentes tóxicos (Diamond y col., 1980; Dearfield y col.,1983).

Las células estelares hepáticas derivadas de ratas a las que se les indujo cirrosis con tetracloruro de carbono de la línea CFSC-2G, presentan características importantes como: la secreción de proteínas de matriz extracelular, la expresión de transcritos de colágena tipo I y III, la presencia de cadena B1 de laminina y fibronectina, una respuesta característica a factores de crecimiento y la producción de interleucina-6 (Greenwell y col., 1991).

Para valorar la funcionalidad de las células en las diferentes condiciones experimentales de este estudio se empleó el ensayo de rojo neutro. Los resultados indicaron que las células de la línea HepG2 con los tratamientos con acetaldehído a corto y largo plazo, presentaron mayor daño lisosomal produciéndose una disminución del 40 y 35 % en la captación del colorante por los lisosomas con referencia al grupo control. En las células tratadas con etanol a largo plazo el porcentaje de captación del rojo neutro por los lisosomas disminuyó 32%. Lo que indica que el acetaldehído es un agente tóxico que afecta la función lisosomal más que el etanol, el cual solo se observó que causa daño comparable al acetaldehído cuando hay una exposición a largo plazo. Los resultados de este estudio concuerdan con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Olivares y col. 1997), en donde el ensayo

de rojo neutro en la línea celular de origen fetal, hepática (WLR-68) tratadas durante 2 h con acetaldehído a una concentración de 10 mM presento el mayor daño lisosomal, mientras que las células tratadas con etanol 200 mM mostraron un menor daño. Los resultados obtenidos en el pretratamiento con la endotoxina más etanol y/o acetaldehído muestran que no se incrementó el daño lisosomal, indicando que el LPS es un agente con el cual las células pueden estar en contacto sin ser alteradas, por lo menos en la concentración de 1µg/ml, lo que indica que la viabilidad celular no se encuentra tan disminuida como lo reflejan los resultados del ensayo de rojo neutro (Tabla I). Esta concentración de LPS nos permitió estudiar los efectos tóxicos que ocurren a nivel celular, pero sin causar un daño generalizado que pudiera dar una respuesta inespecífica.

Los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, se reconocen como agentes causales involucrados en la patogénesis del choque séptico y daño en diferentes órganos. Se ha reportado que la presencia del LPS induce cambios fisiológicos y morfológicos en células hepáticas (Berdeaux, 1993), debido a que éste órgano tiene la capacidad de destoxificar a la endotoxina durante el choque endotóxico. Este proceso se lleva a cabo por el daño hepatocelular, en donde el LPS induce la activación de las células fagocíticas, tales como neutrófilos polimorfonucleares y células de Kuppfer. A pesar de que por microscopía óptica la morfología de las células de la línea HepG2 aparentemente no estaba alterada por la presencia del LPS, las observaciones por microscopía electrónica de transmisión, muestran que en las células tratadas a corto y largo plazo con la endotoxina, se presenta alteración mitocondrial en forma dependiente al tiempo de exposición al tóxico.

Las células de la línea HepG2 expuestas con etanol 50 mM a corto y largo plazo presentaron alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias las cuales eran de diferentes tamaños, así como la presencia de autofagosomas, observaciones semejantes a los reportados por el grupo de

Neuman y col. (1993, 1995), aunque ellos utilizaron un tratamiento de etanol 80 mM durante 24 h.

En el tratamiento con acetaldehído 175  $\mu$ M a corto plazo se presentaron alteraciones morfológicas en las mitocondrias y formación de megamitocondrias, las cuales se han relacionado con el estrés oxidativo. Wakabayashi y col. (1997), propusieron que el mecanismo en la formación de megamitocondrias está estrechamente relacionado con la producción de radicales libres generados por tóxicos como el etanol, hidracina y cloranfenicol. Estos resultados también se pueden relacionar con los de Olivares y col. (1997), en donde observaciones por microscopía electrónica en células de la línea hepática fetal humana (WLR-68) tratadas con acetaldehído 10 mM, presentaron cambios morfológicos en las membranas mitocondriales, con abundantes cuerpos densos, vacuolas y material residual en su interior. En el caso del tratamiento con acetaldehído 175  $\mu$ M a largo plazo se observó un núcleo en apoptosis. Uno de los factores importantes implicados en el proceso apoptótico es la generación de especies reactivas de oxígeno inducido por agentes citotóxicos (Buttke y Sandstrom, 1994). En nuestro estudio el estrés oxidativo producido por la exposición a largo plazo (72 h) con el acetaldehído podría ser un factor que indujo la apoptosis. Estos resultados concuerdan con los del grupo de Karbowski y col. (1999), que reportaron que en hepatocitos de rata agentes tóxicos como hidracina, cloranfenicol, indometacina, peróxido de hidrógeno, eritromicina producen estrés oxidativo y en consecuencia se induce la formación de megamitocondrias el cual va precedido del proceso de apoptosis.

En el caso del pretratamiento con la endotoxina en presencia de etanol o acetaldehído en las células, el LPS produjo alteraciones en las mitocondrias y hubo formación de megamitocondrias. Karbowski y col. (1997), reportaron que en cultivos de hepatocitos crecidos en monocapa, la hidracina, el peróxido de hidrógeno y bromobenceno inducen la producción de radicales libres, los cuales están relacionados con el mecanismo de formación de megamitocondrias. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo está

asociado con la formación de megamitocondrias. Karbowski y col. (1999), sugieren que la formación de megamitocondrias puede ser un proceso a nivel subcelular producido por un ambiente desfavorable para la célula; cuando las células están expuestas en exceso a radicales libres se altera la mitocondria disminuyendo el consumo de oxígeno. En consecuencia en la megamitocondria se observa una disminución en la producción de ATP. Sin embargo, no se han realizado estudios morfológicos comparativos con endotoxina en presencia de estos agentes hepatotóxicos. Estos hallazgos nos permiten sugerir que los tóxicos: etanol, LPS, acetaldehído y el pretratamiento con la endotoxina con etanol o acetaldehído indujeron la formación de megamitocondrias.

En este estudio se evaluó la actividad extracelular de Lactato Deshidrogenasa (LDH) como medida de citotoxicidad inducida con los diferentes tratamientos, esta enzima es un marcador de la integridad de la membrana. En las células de la línea HepG2 la mayor liberación de esta enzima se produjo con los tratamientos con acetaldehído, indicando que degrada o altera la membrana plasmática permitiendo la salida de LDH. Olivares y col. (1997), reportaron que las células WLR-68 tratadas con acetaldehído 2 h a la concentración de 10 mM aumentó la liberación de LDH al medio de cultivo con referencia a su control. Mientras que, en nuestro estudio las células no incrementaron significativamente la actividad extracelular de LDH en ninguno de los tratamientos con etanol a corto y largo plazo en comparación con las células control. Neuman y col. (1995), reportaron que en este mismo tipo celular, el tratamiento con etanol 80 mM durante 24 h aumentó 40 % la actividad enzimática de LDH, bajo nuestras condiciones experimentales no se encontró un incremento significativo en la actividad de esta enzima, probablemente porque la concentración de etanol fue más baja, aunque el tiempo de exposición fue de 24 y 48 h.

Los tratamientos con LPS (1µg/ml) a corto y largo plazo no produjeron diferencia significativa en la liberación de LDH. Sadd y col. (1995), encontraron que en hepatocitos aislados el tratamiento agudo con LPS 10µg/ml no presentó efecto citotóxico determinado mediante el incremento de la actividad de la LDH.

Respecto al pretratamiento de la endotoxina con etanol o acetaldehído, ésta no potenció la liberación de LDH al medio de cultivo. Estos resultados nos permiten establecer que la actividad extracelular de LDH presentó incrementos pequeños en los tratamientos a corto y largo plazo con acetaldehído, considerándose que bajo las condiciones experimentales del presente estudio se presenta una baja toxicidad.

Al analizar la actividad enzimática de Aspartato Amino Transferasa (ASAT) como marcador de necrosis celular, en la línea celular HepG2, el tratamiento a largo plazo con acetaldehído presentó el mayor incremento en la liberación de esta enzima. En contraste, en ninguna de nuestras condiciones experimentales con etanol se apreció un aumento en la actividad ASAT. Estos datos concuerdan con las observaciones de Neuman y col. (1993), en donde concentraciones entre 10-60 mM de etanol no alteraron la actividad enzimática de ASAT. El pretratamiento con la endotoxina más etanol y/o acetaldehído no potenció el daño celular en la actividad de la enzima. Estos resultados indican que el acetaldehído es un agente tóxico que a tiempos prolongados induce la liberación de ASAT al medio de cultivo, no así el LPS, etanol y el pretratamiento con la endotoxina.

La actividad enzimática de Alanín Amino Transferasa (ALAT) en las células de la línea HepG2 indicó que la liberación de la enzima en el medio de cultivo se incrementó en los tratamientos con acetaldehído. Las células tratadas con etanol no incrementaron la liberación de ALAT al medio, datos semejantes a los reportados por Neuman y col. (1993), en donde concentraciones de 20-40 mM de etanol no aumentaron la liberación de la enzima. Nuevamente el pretratamiento con la endotoxina más etanol o acetaldehído no incrementó la liberación de ALAT al medio de cultivo. Indicando que la enzima es sensible al acetaldehído a tiempos de exposición cortos y prolongados.

Es importante resaltar que el pretratamiento con la endotoxina en presencia de etanol o acetaldehído no incrementó el daño citotóxico en las

células de la línea HepG2 con relación a la actividad extracelular de las enzimas: LDH, ASAT y ALAT, así como en el ensayo de rojo neutro el cual indica que no se incrementó el daño lisosomal, y que únicamente en los tratamientos con acetaldehído, donde hay una baja toxicidad se observa un aumento en la actividad extracelular de las enzimas citosólicas cuantificadas en este estudio.

Por otra parte, en las células estelares hepáticas CFSC-2G en el tratamiento con acetaldehído a corto y largo plazo, así como en el tratamiento a largo plazo con etanol presentaron incrementos significativos en la liberación de LDH con respecto al control, indicando que en este tipo celular se presenta mayor sensibilidad al etanol y al acetaldehído a tiempo prolongado en este parámetro, lo que indica que la integridad de la membrana plasmática en presencia de estos tóxicos está alterada. Para estas condiciones, el pretratamiento con la endotoxina no potenció la actividad específica de la enzima.

La lipoperoxidación es uno de los mecanismos por los que se explica el daño celular en presencia de agentes xenotóxicos como el etanol y el acetaldehído. Algunas investigaciones han establecido que la lipoperoxidación parece ocurrir en el hígado después de la administración aguda de etanol (Valenzuela y col., 1980; Videla y col., 1982; Shaw y col., 1983; Sadzadeh y Nanji, 1994 ). Sin embargo, hasta la fecha no se ha explicado como se inicia la generación de radicales libres después de la exposición a etanol.

Los resultados de este estudio, en el caso de las células de la línea HepG2 mostraron que en los tratamientos con acetaldehído a corto y largo plazo se incrementó notablemente el daño lipoperoxidativo. Algunas investigaciones han demostrado que en homogenado de hígado aislado de rata después del tratamiento con acetaldehído se incrementa la producción de radicales libres (Videla y col., 1982; Uysal y col., 1989). Asimismo, la ultraestructura mostró formación de mitocondrias de diferentes tamaños (megamitocondrias), este fenómeno ha sido relacionado con la producción de

radicales libres generados por tóxicos como el etanol y en nuestro caso con el acetaldehído. No obstante, en los tratamientos con etanol a corto y largo plazo, se produjo menor daño en la lipoperoxidación.

En las células de la línea HepG2 el tratamiento con LPS a largo plazo produjo daño lipoperoxidativo. Portolés y col. (1993), reportaron que cultivos de hepatocitos tratados con LPS con una concentración de 50 µg/ml produjo un incremento en la producción de malondialdehído generando lipoperoxidación en las membranas del hepatocito. El pretratamiento con la endotoxina en conjunto con el etanol o acetaldehído parece dejar sin efecto el daño lipoperoxidativo que presenta cada uno de los tóxicos de manera independiente, ya que se obtuvieron valores muy semejantes a los obtenidos únicamente con el tratamiento a corto plazo con LPS, así como con los tratamientos a corto plazo con etanol o acetaldehído.

En la literatura se reporta que el etanol produce mayor daño lipoperoxidativo que el acetaldehído en células hepáticas (Devi y col., 1993). En las células estelares hepáticas el tratamiento a corto plazo con etanol generó más daño lipoperoxidativo con relación al tratamiento con acetaldehído, indicando que hubo una mayor generación de radicales libres con el etanol. Estos resultados concuerdan con los de Tsukamoto (1993), que reportó que en células estelares la exposición con etanol incrementó el daño lipoperoxidativo. Sin embargo, el tratamiento a largo plazo con acetaldehído presentó el mayor incremento en el daño lipoperoxidativo, debido a que se generaron más radicales libres por el tiempo de exposición al tóxico, presentando más sensibilidad este tipo celular al acetaldehído. En el caso del pretratamiento con la endotoxina más etanol o acetaldehído no se observó un efecto aditivo en el daño lipoperoxidativo, puesto que presentaron valores semejantes a los de los tratamientos a corto plazo con etanol o acetaldehído.

La lipoperoxidación es un mecanismo que interviene en la patogénesis del daño celular inducido por etanol. La inducción del citocromo P450 específico para etanol (CYP2E1), se considera como el sitio primario de

potenciación del estrés oxidativo, y la alteración en la homeostasis del glutatión, explica el incremento en el daño lipoperoxidativo. Por otra parte, el glutatión es un agente hepatoprotector, debido a que mantiene a los grupos sulfhídricos en su forma funcional reducida y actúa como un protector contra agentes oxidantes exógenos y endógenos. En nuestro estudio en las células de la línea HepG2 tratadas con acetaldehído a corto y largo plazo el contenido de GSH disminuyó considerablemente, debido a la interacción de este xenotóxico con los grupos tioles el cual puede afectar el metabolismo del glutatión, alterando la integridad de la membrana y produciendo daño mitocondrial como se observó ultraestructuralmente en las células. Olivares y col. (1997), reportaron que en células WLR-68 los SH no proteicos que se correlacionan con el GSH, presentan una disminución notable después del tratamiento agudo (24h) con acetaldehído a la concentración de 10 mM. El tratamiento a largo plazo con LPS disminuyó el contenido de GSH, probablemente por el tiempo de exposición y por la sensibilidad que las células presentaron al tóxico. Mientras que el pretratamiento con la endotoxina más etanol o acetaldehído no potenció la disminución del contenido de GSH.

Por otra parte, en las células estelares hepáticas (CFSC-2G) la mayor disminución en el contenido de glutatión reducido se obtuvo con el tratamiento con EtOH a largo plazo. En el caso del pretratamiento con la endotoxina en presencia de etanol o acetaldehído se produjo una notable disminución en el contenido de GSH. Por lo tanto, en este tipo celular el pretratamiento con la endotoxina potenció la respuesta en presencia de estos agentes hepatotóxicos. En el pretratamiento con endotoxina se observa que la endotoxina altera el balance en el estado de oxido-reducción en las células. Estudios del efecto del etanol sobre el glutatión en primates y humanos con enfermedad hepática alcohólica revelaron que el contenido de glutatión disminuye con respecto a los controles sanos (Corrales y col., 1991). Se ha reportado que el glutatión hepático está involucrado en varios procesos celulares, tales como transporte membranal, las rutas metabólicas, síntesis de macromoléculas, protección de la célula contra radicales libres y metabolitos tóxicos de origen endógeno y exógeno.

La generación de radicales libres y la disponibilidad de glutatión reducido, nos permiten conocer el estrés oxidativo en ambos tipos celulares. Al correlacionar este parámetro en las células de la línea HepG2, los tratamientos con etanol produjeron un incremento en el grado de lipoperoxidación y presentaron pequeñas disminuciones en el contenido de glutatión reducido. Estos resultados no concuerdan con la literatura en que se reporta que la administración aguda de etanol en roedores produce disminución progresiva en el contenido del glutatión reducido hepático (Fernández y col., 1991; Shaw y col., 1983; Mithofer y col., 1992), este efecto puede deberse a la concentración o tiempo de exposición al tóxico. Con el tratamiento a corto y largo plazo con acetaldehído en células de la línea HepG2 y estelares hepáticas se obtuvo el mayor incremento en el daño lipoperoxidativo en relación con el etanol y el contenido de GSH disminuyó considerablemente, por lo tanto, la capacidad protectora de la célula está disminuida. Este evento se podría explicar en función de las siguientes evidencias: a nivel de la síntesis de glutatión donde este se ve disminuido por la presencia del tóxico (Speisky y col., 1985); el segundo aspecto es la oxidación del glutatión, en donde parece ser que al haber un aumento en la lipoperoxidación, los radicales libres formados estarían interaccionando con el grupo tiol del glutatión. También se considera que la unión del acetaldehído al glutatión es una causa de la disminución de este hepatoprotector. Lyon y col. (1985), identificaron una reacción enzimática en la cual el acetaldehído promueve la oxidación del glutatión y el consumo de oxígeno, de acuerdo a la cantidad del tóxico presente. En esta reacción la interacción del acetaldehído con glutatión peroxidasa dependiente de selenio, se inhibe y se promueve la acción de la glutatión oxidasa. Dado que los resultados del cociente GSSG/GSH fueron mayores en ambos tipos celulares con los tratamientos a largo plazo con acetaldehído, así como en el pretratamiento con la endotoxina en presencia de etanol o acetaldehído, lo que origina un estrés oxidativo en las células. Asimismo, el contenido de GSSG en células de la línea HepG2 y estelares hepáticas se encontró alterado en el pretratamiento con la endotoxina con etanol o acetaldehído en comparación con los grupos controles, ya que los tóxicos producen un desbalance en el

estado de oxido-reducción de las células produciendo un efecto aditivo en el contenido del GSSG y el cociente GSSG/GSH.

Maier y col. (1997), reportaron que el glutatión no es un modulador importante en las síntesis de colágena en cultivos primarios de células estelares hepáticas de rata y sugieren que la lipoperoxidación no es una causa directa de la fibrosis *in vivo*. Sin embargo, la lipoperoxidación y la fibrosis hepática se han asociado, sugiriendo que la conexión entre los dos eventos es probablemente indirecta. Los resultados de este estudio indican que las células estelares hepáticas, aunque no mostraron un marcado daño lipoperoxidativo, presentaron mayor sensibilidad en la disminución del GSH con los tratamientos con LPS, etanol y en el tratamiento a largo plazo con acetaldehído, así como en el pretratamiento con la endotoxina con etanol o acetaldehído con referencia a las células de la línea HepG2. Debido a que la disminución del glutatión reducido en hígado completo es más relevante en las células estelares hepáticas que en los hepatocitos.

El estrés oxidativo que presentaron las células de la línea HepG2 el tratamiento con LPS a corto plazo produjo un incremento ligero en el daño lipoperoxidativo y en consecuencia el contenido de glutatión reducido no disminuyó notablemente. Aunque, en el tratamiento con etanol a largo plazo se produjo daño lipoperoxidativo, la disminución de GSH no fue tan notable con respecto al control. En el caso del pretratamiento con la endotoxina en conjunto con el etanol y/o acetaldehído se produjo poco daño lipoperoxidativo con respecto al tratamiento con LPS a largo plazo, por lo que, el contenido de GSH no se encuentra tan disminuido. Por lo tanto, el pretratamiento con la endotoxina no incrementó el estrés oxidativo en este tipo celular. Estos resultados concuerdan con los de Neuschwander-Tetri y col. (1996), que reportaron que el tratamiento con LPS no genera suficiente estrés oxidativo para alterar la homeostasis del glutatión en células de Kupffer, este mismo fenómeno podría ocurrir en nuestras condiciones experimentales.

En las células estelares hepáticas el tratamiento con etanol a corto plazo produjo mayor daño lipoperoxidativo y en consecuencia se presentó una marcada disminución en el contenido de glutatión reducido. Estos resultados concuerdan con Wlodek y Rommelspacher (1994), que demostraron que el tratamiento agudo con etanol disminuye los niveles de glutatión reducido en el hígado. El tratamiento con acetaldehído a corto plazo no presentó valores altos en el daño lipoperoxidativo con referencia al control, por lo tanto, no se apreció una disminución notable en el contenido de GSH. En este estudio el estrés oxidativo producido en las células estelares con el tratamiento con etanol a corto plazo, sugieren que existe pérdida de la integridad de la membrana, debido tal vez al rompimiento de los dobles enlaces en los lípidos por la gran cantidad de radicales libres que se forman con el etanol, no así con el acetaldehído (Usyal y col., 1989). Sin embargo, en el tratamiento con EtOH y ACH a largo plazo se obtuvo un mayor incremento lipoperoxidativo el cual se refleja en el estrés oxidativo, presentándose una considerable disminución en el contenido de GSH. En el pretratamiento con endotoxina más EtOH y/o ACH aunque se produjo un pequeño daño lipoperoxidativo, sin embargo, presentó una marcada disminución en el contenido de GSH, así como un aumento en la relación GSSG/GSH con respecto al grupo control. Esto podría explicar que el LPS produce estrés oxidativo, debido a que la endotoxina puede potenciar el daño producido por etanol o acetaldehído.

La ultraestructura de las células estelares hepáticas control, presentaron poros en la envoltura nuclear lo que podría sugerir que la célula tiene una elevada actividad metabólica. Las células tratadas con LPS presentaron cambios estructurales en el núcleo y los poros nucleares son de mayor tamaño que el grupo control y nuevamente el LPS produce daño mitocondrial como en el caso de las células de la línea HepG2. En las células con los tratamientos con etanol y acetaldehído a corto y largo plazo se produjeron alteraciones ultraestructurales en la cromatina, cisterna perinuclear, mitocondrias y el contenido de gotas lipídicas disminuyó. Así mismo, se ha reportado que el etanol y/o acetaldehído producen daño mitocondrial alterando la integridad de membrana en células hepáticas (Cedebraum y Rubin, 1974, Fernández-Checa

y col., 1997). Se observó que, en el pretratamiento con la endotoxina en presencia de etanol y/o acetaldehído, la ultraestructura mostró que los poros nucleares disminuyeron, hay daño mitocondrial y el contenido de gotas de lípidos disminuyó. Estas evidencias indican que el LPS produce alteración en las células estelares hepáticas, debido al tiempo de exposición al tóxico.

La ingesta crónica de etanol puede inducir fibrosis en el hígado humano así como en baboons. El proceso de la fibrogénesis se caracteriza por el incremento de las proteínas de matriz extracelular, proteínas del tipo de la colágena y de tipo no colágena, los proteoglicanos y otros componentes como glucosaminoglucanos. Las células estelares hepáticas son las principales productoras de proteínas de matriz extracelular (Casini y col., 1993). Se ha demostrado que las células estelares hepáticas pueden sintetizar y liberar diferentes tipos de colágena, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas células participan en el depósito de colágena tipo I y III, asociado con la fibrosis hepática (Clement y col., 1986, 1993; González y col., 1992; Lieber, 1993; Arthur, 1995). El aumento de las proteínas de matriz extracelular, principalmente colágena, son un factor importante en la enfermedad hepática alcohólica crónica (Nakano y col., 1982).

En este trabajo se determinó el contenido celular de colágena y la colágena secretada a los medios de cultivos por células estelares hepáticas CFSC-2G. Se observa en general que, los valores del contenido celular de colágena son menores que la cantidad de colágena secretada. El contenido de colágena celular se incrementó en aquellos tratamientos en donde hubo una mayor secreción de esta proteína. Los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos con acetaldehído. Se ha reportado que el efecto del acetaldehído sobre la expresión de genes de la matriz extracelular parece estar regulado a través del estado redox intracelular (Casini y col., 1991, Tsukamoto, 1993). Moshage y Lieber (1990), demostraron que el acetaldehído a la concentración de 175  $\mu$ M incrementó la producción de colágena tipo I en cultivos de células estelares hepáticas de rata, este efecto fue evidente a las 24 y 48 h de incubación, por lo tanto, las células también sintetizaron cantidades

significativas de colágena tipo III y en menor cantidad colágena tipo IV y laminina, pero solamente la producción de colágena tipo I fue potenciada por el acetaldehído. La concentración de etanol de 50 mM utilizada en el medio de cultivo en este estudio corresponde a los niveles sanguíneos de baboons expuestos crónicamente con etanol (Jauhonen y col., 1982). La concentración de acetaldehído en el medio, fue más alta que los niveles sanguíneos que presentan baboons a los cuales se les administró etanol. Sin embargo, se conoce que la concentración de acetaldehído utilizada en el hígado es más alta que la observada en la sangre (Baraona y col., 1981).

En algunos modelos experimentales de miofibroblastos de baboons, el etanol por sí mismo no afecta la producción de colágena y laminina. Estos resultados sugieren que el acetaldehído (metabolito del etanol), pero no el etanol por sí mismo, juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática inducida por este tóxico. Por lo tanto, se ha considerado que el acetaldehído es más fibrogénico que el etanol. Estas investigaciones concuerdan con los datos obtenidos de este estudio, en donde se aprecia que el acetaldehído incrementó la síntesis de colágena, este efecto fue evidente tanto en el tratamiento a corto plazo (24 h) y como a largo plazo (72 h) con acetaldehído. Friedman (1996), reportó que el acetaldehído en células estelares hepáticas incrementa la expresión del gen de procolágena- $\alpha$ (1) y la síntesis de colágena tipo I y III. Aunque hay evidencias del efecto del etanol sobre la síntesis de colágena en varios sistemas celulares, estudios realizados con fibroblastos hepáticos y miofibroblastos demuestran que solamente el acetaldehído estimula la síntesis de colágena (Gressner y Althus, 1988, Friedman, 1999). En nuestro estudio, en las células estelares hepáticas el pretratamiento con la endotoxina aumentó tanto el contenido celular y la secreción de colágena en el tratamiento con EtOH y ACH. Esto sugiere que la endotoxemia presente en sujetos alcohólicos favorece la fibrogénesis.

Estudios epidemiológicos han demostrado que aproximadamente el 30% de los sujetos alcohólicos desarrollan cirrosis hepática (Grant y col., 1988). Estos hallazgos sugieren que aunque el consumo de etanol es necesario para

el desarrollo de las enfermedades hepáticas, uno o más cofactores son también requeridos para que ocurra el daño hepático crónico. Se ha establecido que la endotoxemia puede ser un cofactor importante en la iniciación y agravamiento de las enfermedades hepáticas inducidas por etanol. Se ha reportado, en estudios *in vitro* que una exposición aguda con etanol incrementa la permeabilidad en el intestino delgado a la endotoxina de manera dependiente de la dosis (Arai, 1986).

La endotoxina puede activar a las células de Kupffer produciendo al liberación de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (Nolan y col., 1988). Ambos, citocinas y radicales libres provocan daño celular hepático en animales de experimentación y en humanos. Los niveles plasmáticos de LPS se incrementan después de la ingestión aguda de etanol en pacientes con enfermedad hepática alcohólica (Fukui y col., 1991; Fukui y col., 1995), este suceso también se ha correlacionado con el daño hepático en estudios realizados por Nanji y col. (1993). En la literatura se ha reportado que las células de Kupffer responden a la endotoxina cuando hay una alteración hepática. Los macrófagos fagocitan a la endotoxina, puesto que la mayoría de estas células se localizan en la región periportal las cuales disminuyen el daño, pero en la enfermedad hepática alcohólica el daño se lleva a cabo en la región centrilobular (Lindros, 1995). Este mecanismo puede ser explicado por el daño inflamatorio causado por la proliferación de las células de Kupffer y su redistribución en la región lobular del hígado.

Maher y col. (1994), reportaron que el estrés oxidativo puede estimular la lipoperoxidación y síntesis de colágena en cultivo de células estelares hepáticas, y que este evento puede ser bloqueado por antioxidantes. En este estudio las células estelares hepáticas con el pretratamiento con LPS más etanol o acetaldehído no aumentó el daño lipoperoxidativo, sin embargo, disminuyó considerablemente el contenido de GSH potenciando el estrés oxidativo y en consecuencia se produjo una mayor secreción de colágena. Estudios recientes han identificado que la endotoxina, activa a los macrófagos

como resultado del daño hepático generado por el etanol. Para explicar el posible mecanismo del consumo crónico de etanol y la endotoxemia, Keshavarzian y col. (1999), propusieron que la ingesta crónica de etanol causa un incremento en la permeabilidad intestinal el cual permite que la endotoxina pase a la circulación periportal y luego dentro del hígado pueda iniciar la cascada necro-inflamatoria hepática. Estos hallazgos demuestran que el incremento en la permeabilidad intestinal está asociada con el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica en humanos y que la endotoxemia es un posible cofactor en el agravamiento de la enfermedad hepática alcohólica (Thurman,1998).

Las especies oxidantes y sus productos parecen ser mediadores importantes en la fibrosis. No obstante, el papel de estos compuestos en la fibrosis es controversial, porque sus efectos en las células estelares hepáticas puede estar superpuesto, como respuesta a mediadores fibrogénicos putativos. Algunos estudios indican que los aldehídos y bioproductos de lipoperoxidación, cuando son adicionados al medio de cultivo de células estelares hepáticas, incrementan la síntesis de colágena de 2 a 4 veces o más (Moshage y col., 1990; Paraola y col., 1993). Nuestros resultados indican que los tratamientos con LPS, etanol y acetaldehído dañan a las células estelares hepáticas. El daño celular se caracteriza por un incremento en el daño lipoperoxidativo, el decremento en el contenido de glutatión reducido y la inducción en la secreción de componentes de matriz extracelular como la colágena tipo I. El pretratamiento con la endotoxina más el etanol o acetaldehído incrementó el estrés oxidativo y la secreción de colágena. Mientras que en las células de la línea HepG2 se encuentra que el pretratamiento con la endotoxina con EtOH o ACH no potenció el daño lipoperoxidativo y la disminución del contenido de GSH. El pretratamiento con la endotoxina tiene un mayor efecto fibrogénico a tiempo prolongado. Además el daño producido por el LPS, etanol y acetaldehído en ambos tipos celulares, es más notable en periodos de exposición prolongados. También es relevante mencionar que el acetaldehído es el que produce el mayor daño celular.

La endotoxemia en alcohólicos parece ser un factor muy importante para el desarrollo de la fibrogénesis. Los resultados obtenidos en este estudio indican que las células estelares hepáticas presentan el mayor estrés oxidativo al ser pretratadas con la endotoxina, lo que ocasiona un aumento en la secreción de colágena. La capacidad de las células estelares hepáticas para incrementar la respuesta al etanol, acetaldehído y LPS representa un mecanismo importante en el cual estas células participan en la regulación de las reacciones fibrogénicas en el hígado. Estos hallazgos apoyan la convergencia del daño producido por la endotoxina en el estrés oxidativo y en la secreción de componentes de matriz extracelular en el proceso fibrogénico hepático.

Por consiguiente, el planteamiento de estrategias para tratar la fibrosis hepática alcohólica debe incluir medidas que permitan prevenir o inhibir los mecanismos que estimulan la síntesis de colágena de tipo I, como podría ser el control del estrés oxidativo.

Resultados parciales del presente trabajo fueron publicados en:



Toxicology 134 (1999) 197–207

**TOXICOLOGY**

## Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS

Ma. Concepción Gutiérrez-Ruiz <sup>a,\*</sup>, Silvia C. Quiroz <sup>a</sup>, Verónica Souza <sup>a</sup>,  
Leticia Bucio <sup>a</sup>, Elizabeth Hernández <sup>a</sup>, Irma P. Olivares <sup>a</sup>, Luis Llorente <sup>b</sup>,  
Florencia Vargas-Vorácková <sup>c</sup>, David Kershenobich <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apdo Postal 55-535, 09340 México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., Mexico

Received 19 December 1998; accepted 26 March 1999

### Abstract

Inflammatory mediators, including cytokines, growth factors, and reactive oxygen species, are associated with the pathology of chronic liver disease. In the liver, cytokine and growth factor secretion are usually associated with nonparenchymal cells, particularly Kupffer cells. In the present studies, the effect of 24 and 72 h administration of ethanol (50 mM), acetaldehyde (175  $\mu$ M), and LPS (1  $\mu$ g/ml) were studied on the expression and secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta_1$ , lipid peroxidation damage and glutathion content in HepG2 cell cultures. A 24 h exposure to ethanol induced the expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$ , and the secretion of IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta_1$ . With the same period of treatment, acetaldehyde markedly increased TNF- $\alpha$  expression, and stimulated IL-1 $\beta$  secretion, while LPS exposure induced the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and TGF- $\beta_1$ , and the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta_1$ . A reduced in TNF- $\alpha$  response and TGF- $\beta_1$  expression were observed after 72 h exposure to ethanol. A 72 h acetaldehyde exposure decreased markedly TNF- $\alpha$  expression and stimulated a previously absent TGF- $\beta_1$  response. With the same time of exposure, LPS reduced slightly TGF- $\beta_1$  expression, and decreased its secretion. IL-1 $\beta$  and IL-6 were not detected under 72 h exposure conditions. Lipid peroxidation damage was increased in all treatments, but higher values were found in 72 h treatments. Glutathion content diminished in all treatments. These findings suggest that HepG2 cells, independent of other cells such as Kupffer or macrophages, participate in a differential cytokine, growth factor and oxidative stress response, which differs according to the toxic agent and the time of exposure. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** HepG2 cells; Ethanol; Acetaldehyde; LPS; Cytokines; Growth factors; Oxidative stress

\* Corresponding author. Tel.: + 52-5-7244730; fax: + 52-5-7236451.

E-mail address: mcgr@xanum.uam.mx (Ma.C. Gutiérrez-Ruiz)

## 1. Introduction

Ethanol and its metabolites, mainly acetaldehyde, as well as endotoxins (LPS) have been described to contribute directly to an inflammatory response mediated by cytokines and growth factors such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (Lands, 1995). Increased level of pro-inflammatory cytokines are found in both plasma and liver in alcoholic hepatitis (Felver et al., 1990; Hill et al., 1992). Several investigators have reported increased plasma TNF- $\alpha$  concentrations in alcoholic hepatitis and cirrhosis, that correlated with increased mortality and/or liver dysfunction (Felver et al., 1990). Plasma IL-6 concentration appears to correlate well with the clinical severity and course of alcoholic hepatitis (Khoruts et al., 1991).

The pathogenesis of alcohol-induced liver disease despite intense research, and the implication of multiple factors is not completely understood. The liver response to alcohol or its metabolites includes at different stages: inflammation, fibrosis, and regeneration, which may finally lead to cirrhosis. A complex network of mediator molecules, known as cytokines, seems to be an integral component of intercellular communication among the various cell types of the liver, regulating liver functions and maintaining physiological homeostasis. Cytokines and growth factors secreted by various cells within the liver act via autocrine or paracrine pathways and may be pivotal mediators to a suggested regulated pattern of gene expression, including up-regulation of extracellular matrix proteins and fibrosis in the liver (Hill et al., 1997). It is well established by *in vivo* and *in vitro* studies that cytokines and growth factors are expressed mainly by non-parenchymal cells such as Kupffer, endothelial, and transforming hepatic stellate cells (Kuiper et al., 1994). Their production and regulation in parenchymal cells is less clear and has not been extensively studied. In recent studies, it was established that TGF- $\beta$ 1 mRNA is present in hepatocytes of normal rat liver (Bissell et al., 1995), which primarily contribute to a sustained increased level of TGF-mRNA during the regeneration process of the liver (Williams and Knapton, 1996) and TGF- $\beta$ 1 protein was detected in parenchymal cells of

fibrotic liver and carcinoma (Chunfang et al., 1996). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemical studies clearly demonstrate the expression of TGF- $\beta$ mRNA and protein in cultured parenchymal cells from rats (Bissell et al., 1995).

It is possible that ethanol or its metabolites activate factors that regulate transcription of several cytokine and growth factors genes involved in the inflammatory process (Kanimura and Tsukamoto, 1995; Kato et al., 1998). The production of IL-8 and TNF- $\alpha$  by HepG2 cells has been detected in response to metals with pro-oxidant activity (Dong et al., 1998a) and in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dong et al., 1998b). Endotoxins, the lipopolysaccharide component of the outer walls of most Gram-negative bacteria, are believed to play a major role in alcohol induced liver injury. Alcohol, by favoring bacterial translocation, may facilitate the exposure of hepatocytes to LPS which is known to be a potent activator of cytokine production. Plasma levels of endotoxin are increased after acute ingestion of ethanol and in patients with alcoholic liver disease (Bode et al., 1993; Rietschel et al., 1994).

It is well established that oxidative cell injury generated by chemicals is associated with multiple alterations of cell structure and function. Glutathione (GSH) plays a unique role in cellular defense against active oxygen species and reactive intermediates. It is established that cellular oxidative stress is often preceded by depletion of intracellular GSH. Lipid peroxidation is one of the best known manifestations of oxidative cell injury. Ethanol and acetaldehyde produced a marked reduction of GSH levels and increased lipid peroxidative damage in a human hepatic cell line (Olivares et al., 1997). Free radicals can activate the transcription factor, NF- $\kappa$ B, which can induce the transcription of a variety of cytokines and chemokines (Sen and Packer, 1996). As the NF- $\kappa$ B family is involved in the transcriptional regulation of different cytokines (Han et al., 1999) and growth factors and can be activated by ROS, we hypothesized that hepatocytes are capable of producing cytokines and growth factors in response to hepatotoxic agents. The aim of the present work was to study the effect that 24 and 72 h

administration of alcohol, acetaldehyde and LPS have on the expression and secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ 1, GSH content and lipid peroxidation damage using HepG2 cell cultures.

## 2. Materials and methods

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from American Type Culture Collection (Maryland, USA) at passage number 79. All cells used in this work were between passage 90 and 120.

### 2.1. Cell culture

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 retains many parenchymal cell functions. It has been shown that is useful for toxic evaluations, mainly in those concerning the mechanism of toxicity (Aden et al., 1979). HepG2 cells were routinely grown in monolayer culture in Williams E medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, USA), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Cells were grown at 37°C in disposable plastic bottles (Nunc, USA), in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The medium was replaced twice a week, and cells were trypsinized and diluted every 7 days at a ratio of 1:3.

### 2.2. Experimental design

Lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* (Sigma, St. Louis, MO), ethanol, and acetaldehyde (Merck) were used. Reagent grade 95% ethanol was redistilled prior to addition to the culture medium. To control evaporation, growth medium was pre-equilibrated with 95% air/5% CO<sub>2</sub>, then ethanol was added, and flasks were immediately capped tightly and the multi-chambers were sealed with plastic tape. The same procedure was followed in the case of acetaldehyde.

HepG2 cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. All cells were seeded at the same time. Their media were changed every 24 h. Measurements were done at the completion of 96 h.

### 2.3. 24 h treatment

Cells were seeded and, on the third change of medium (72 h after seed), media containing 50 mM ethanol or 75  $\mu$ M acetaldehyde (initial concentrations) or 1  $\mu$ g/ml LPS were added. After 24 h, of the toxic addition, the medium was collected and centrifuged during 5 min at 30000 rpm, to immediately LDH, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cytokine, and growth factor secretion. Cells were washed twice with phosphate buffer (PBS), scrapped from dishes to determine GSH and lipid peroxidation. In the case of cytokine and growth factor mRNA determinations, cells were stored at -80°C until determinations. Cell number was determined in parallel samples using a Coulter counter.

### 2.4. 72 h treatment

Cells were seeded and, on the first change of medium (24 h), media containing 50 mM ethanol or 175  $\mu$ M acetaldehyde (initial concentrations) or 1  $\mu$ g/ml LPS were added. After a total exposure of 72 h (with medium changes at 24 and 72 h), the medium was collected and centrifuged during 5 min at 3000 rpm, to immediately determine LDH, AST, ALT, cytokine, and growth factor secretion. Cells were washed twice with PBS, scrapped from the dishes to determine GSH and lipid peroxidation. In the case of cytokine and growth factor mRNA determinations, cells were stored at -80°C until determinations. Cell number was determined in parallel samples using a Coulter counter.

### 2.5. Control cells

Control cells were seeded at the same time as treated cells. They were maintained under the same conditions but without the addition of ethanol, acetaldehyde, or LPS.

### 2.6. Viability tests

#### 2.6.1. Trypan blue

Cell viability was measured as the ability of live cells to exclude Trypan blue vital dye at a 0.2% final concentration (Nicotera et al. 1994). Living cells were counted in a hemacytometer.

### 2.6.2. Neutral red assay

As described by Borenfreund and Puerner (1985), the incorporation of the supravital dye neutral red into the lysosomes of viable cells was determined. The amount of dye, after extraction from the lysosomes, was quantified spectrophotometrically and compared with neutral red recovered from control cells.

### 2.6.3. LDH activity

LDH activity was determined by a decrease in absorbancy at 340 nm resulting from the oxidation of NADH as described by Moldeus et al. (1978). Cells ( $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were seeded in Petri dishes (3 cm diameter). After time of exposure, the culture medium was decanted and centrifuged at 1500 rev/min for 10 min and the supernatant was used for the assay.

### 2.7. ALT and AST activities

ALT and AST were determined in cultured media according to Reitman and Frankel (1957). Specific activities were expressed in mU/10<sup>6</sup> cells.

### 2.8. Lipid peroxidation

The rate of production of thiobarbituric acid (TBA)-reactive components was determined as described by Buege and Aust (1978). Values were expressed as nmol of malondialdehyde per mg of protein (Lowry et al., 1951).

### 2.9. GSH content assay

Total glutathion, reduced (GSH), and oxidized (GSSG) was measured by the method of Tietze (1969) in which GSH content was determined by glutathione reductase and NADPH followed by reduction of the colorimetric reagent 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) by GSH.

### 2.10. Immunoassay quantitative determination of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF $\beta_1$

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 were determined by the Quantikine human TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 immunoassay (R&D Systems). A monoclonal an-

tibody specific for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 has been pre-coated onto a microtiter plate. Standards and samples were pipetted into the wells, where TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 was bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 was added to the wells. After a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution was added to the wells. The color development was stopped and the intensity of the color measured at 450 nm spectrophotometrically.

TGF- $\beta_1$  was determined by a TGF- $\beta_1$  Quantikine kit (R&D systems). To activate the latent form to immunoreactive TGF- $\beta_1$ , 0.5 ml of culture medium was incubated during 10 min at room temperature with 0.1 ml 1 N HCl and then neutralized by adding 0.1 ml 1.2 N NaOH/0.5M HEPES. Standard or culture medium (200  $\mu$ l) was incubated in the microtiter plate covered by TGF- $\beta_1$  soluble type II receptor which binds TGF- $\beta_1$ . After washing three times each well with a buffer solution, 200  $\mu$ l of polyclonal antibody against TGF- $\beta_1$  conjugated to horseradish peroxidase were added and incubated during 1.5 h at room temperature. The media were aspirated and washed. After a 20 min incubation with 200  $\mu$ l of substrate solution (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) the reaction was stopped with 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Optical density of each well was determined within 30 min using a microtiter plate reader set to 450 nm.

### 2.11. Preparation of RNA and PCR amplification

Scraped HepG2 cells were immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed. RNA was isolated from 20 million frozen cells using Trizol technique (Chomczynski and Sacchi, 1987). Purified RNA was treated with 10 units of RNase-DNase I free (Gibco-BRL) at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min, then with saturated phenol, chloroform/isoamyl alcohol (49:1 v/v) and finally precipitated with ethanol. RNA was then quantified by measuring the optical density at 260 nm and by fast check nucleic acid quantification system (Gibco-BRL). cDNA synthesis was performed using 1  $\mu$ g of RNA that was incubated with 50 U of Moloney murine

leukaemia virus reverse transcriptase (Gibco-BRL), 1 mM DTT, 1 U of RNase inhibitor (Gibco-BRL), 2.5  $\mu$ M oligo [d(T)12-18], and 0.5 mM of each of the four deoxynucleotide triphosphates. Resulting cDNA was divided in aliquots for PCR amplification of the cDNA products using various sets of sense and antisense primers, and 2 units of Taq polymerase (Gibco-BRL). The sequences for the primers were as follows: IL-1 $\beta$  (sense: 5'GGATATGGAGCAACAACAAGTG-G3', antisense: 5'ATGTACCAGTTGGGGGAACTG3'), IL-6 (sense: 5'TCAATGAGGAGACTTGCCTG3', antisense: 5'GATGAGTTGTCATGTCCTGC3'), TNF- $\alpha$  (sense: 5'ACAAGCCTGTAGCCCATGTT3', antisense: 5'AAAGTAGACCTGCCAGACT3'), TGF- $\beta_1$  (sense: 5'TTTCGCCTTAGCGCCCACTG3', antisense: 5'TCCAGCCGAGGTCCTTGCGG3'), and  $\beta_2$ microglobulin (sense: 5'CCAGCAGAGAATGGAAAGTC3', antisense: 5'GATGCTGCTTACATGTCTCG3').

Amplification was at 94°C for 1 min; 55°C for 1 min; 72°C for 1 min for 30 cycles. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels containing 0.05  $\mu$ g/ml ethidium bromide. Negative controls included samples in which the addition of RT was omitted during the processing, and samples devoid of cDNA during the PCR reaction. Gels were photographed and Polaroid negatives were used for densitometric analysis. The specificity of each molecule tested was confirmed by Southern blot with internal specific oligonucleotides (data not shown).

#### 2.12. Quantitative PCR for $\beta_2$ -microglobulin, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6

To quantitate the mRNA for TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6, a known amount (0.025  $\mu$ g) of a standard RNA was added to one  $\mu$ g of HepG2 cells RNA before production of cDNA. The standard RNA was produced from plasmid pQA-1 (a kind gift of Dr. Daniel Shire) (Legoux et al., 1992; Bouaboula et al., 1994), which contains a tandem array of primers for  $\beta_2$ -microglobulin and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6. The standard RNA serves as an internal control for the reverse transcription reaction and permits generation of standard curves in order to quantitate the specific target mRNAs. The size of

the amplicon product derived from the standard RNA differs from the size of the sample tested RNA. This allows comparison of a known amount of standard RNA with the unknown amount of mRNA in the sample by densitometry. In all samples, a standard curve (including at least four plasmid concentrations) was done for  $\beta_2$ -microglobulin and for TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6. Samples containing HepG2 cDNA and standard cDNA were amplified as mentioned above. The results were expressed as the number of mRNA molecules of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 per  $5 \times 10^4$  molecules of  $\beta_2$ -microglobulin as previously described (Llorente et al., 1996).

Semi-quantitation of TGF- $\beta_1$  mRNA expression RT-PCR for TGF- $\beta_1$  was performed as described above (without plasmid pQA-1) using one  $\mu$ g of total HepG2 RNA. Amplification products were electrophoresed in parallel with the amount of RNA that contains  $5 \times 10^4$  molecules of  $\beta_2$ -microglobulin. Results are expressed as arbitrary units (AU) for each sample, as the ratio between the molecule studied and  $\beta_2$ -microglobulin and intensity detected by densitometric analysis. In order to measure more accurately the gene expression of TGF- $\beta_1$ , the pQA-1 plasmid was used. Results from this experiment showed that the number of mRNA molecules per  $\mu$ g of total HepG2 cells RNA for TGF- $\beta_1$  by the quantitative method was comparable to that of the semi-quantitative method (data not shown).

#### 2.13. Data analysis

Data are reported as means  $\pm$  S.D. The SPSS package version 7, was used to run the analysis. Comparisons among groups were done by means of ANOVA. Tukey's method was used for multiple comparisons. A  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

### 3. Results

HepG2 cells were cultured in the presence of LPS, ethanol, and acetaldehyde during 24 and 72 h and LDH, ALT, and AST enzymatic activity, neutral red probe, glutathione content, lipid per-

Table 1

Effect of 24 and 72 h treatment of 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac), and 1  $\mu$ g/ml LPS cells on neutral red assay, LDH, ALT, and AST activities in HepG2 cells<sup>a</sup>

Treatment	Neutral red (% control)	LDH (mU/10 <sup>6</sup> cells)	ALT (mU/10 <sup>6</sup> cells)	AST (mU/10 <sup>6</sup> cells)
Control	100	9 $\pm$ 0.13	10 $\pm$ 0.1	35 $\pm$ 4
LPS, 24 h	84 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>	10 $\pm$ 0.7	10 $\pm$ 0.6	49 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
EtOH, 24 h	64 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 0.12	11 $\pm$ 0.44	41 $\pm$ 4
Ac., 24 h	60 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	18 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	53 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
LPS, 72 h	75 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	9 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	54 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
EtOH, 72 h	68 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	9 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0.9	38 $\pm$ 4
Ac., 72 h	65 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	23 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	65 $\pm$ 2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Neutral red incorporation into the lysosomes of viable cells is expressed as a percentage, with controls at 100%. LDH, ALT, and AST were determined in the culture media. The values represent the mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments carried out in triplicate.

<sup>b</sup> Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

oxidation damage, and expression and secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> were determined. Under all experimental conditions tested, cells presented 100% viability by trypan blue test (data not shown). Cytotoxicity was assayed with the neutral red and LDH activity. Lysosomal capacity, determined by neutral red probe, diminished in all treatments. Acetaldehyde treatments produced a slight increase in extracellular LDH activity, while it was not affected by LPS and EtOH treatments. ALT activity increased in 24 and 72 h Ac and 72 h LPS treated cells and AST increased in LPS and Ac treatments (Table 1).

Non-treated cultured HepG2 cells (controls) did not express or secrete TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. At 24 h exposure, induction of TNF- $\alpha$  expression was observed with ethanol (3500 mol/5  $\times$  10<sup>4</sup> mol  $\beta$ <sub>2</sub>- $\mu$ glob), acetaldehyde (18 700 mol/5  $\times$  10<sup>4</sup> mol  $\beta$ <sub>2</sub>- $\mu$ glob) and LPS (2502 mol/5  $\times$  10<sup>4</sup> mol  $\beta$ <sub>2</sub>- $\mu$ glob) (Fig. 1). Expression of IL-6 was induced solely by LPS (1346 mol/5  $\times$  10<sup>4</sup> mol  $\beta$ <sub>2</sub>- $\mu$ glob), and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> expression was detected only after ethanol (1.25 AU) and LPS (0.98 AU) exposure (Fig. 2). IL-1 $\beta$  mRNA was not detected. A slight secretion of IL-1 $\beta$  was induced by ethanol, acetaldehyde, and LPS. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> was secreted after exposure to ethanol and LPS (Table 2). IL-6 secretion was induced by LPS only (14.3  $\pm$  2 pg/ml  $\times$  10<sup>6</sup> cells). No secretion of TNF- $\alpha$  was detected.

By extending the toxic exposure to 72 h, TNF- $\alpha$  response diminished 61% as compared to 24 h ethanol treated cells, and was absent for LPS; as for acetaldehyde, expression of TNF- $\alpha$  decreased by 87% (Fig. 1). Neither expression nor secretion of IL-1 $\beta$  and IL-6 was detected. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> expression was reduced 52% for ethanol and 33% by LPS, and was detectable after 72 h exposure to

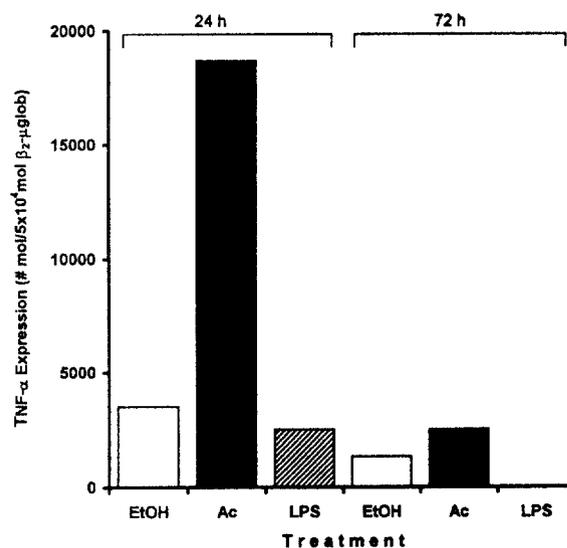


Fig. 1. Quantitative mRNA for TNF- $\alpha$  of HepG2 cells treated 24 and 72 h with 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac), and 1  $\mu$ g/ml LPS. Two quantifications were done for each experimental condition.

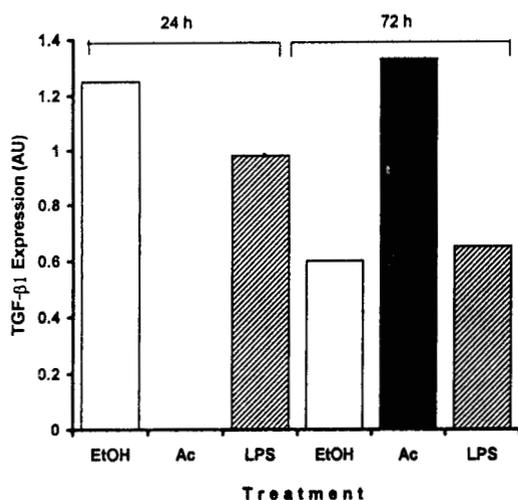


Fig. 2. Semi-quantitative mRNA for TGF- $\beta_1$  of HepG2 cells treated 24 and 72 h with 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac), and 1  $\mu$ g/ml LPS. Two quantifications were done for each experimental condition. Results are expressed as arbitrary units (AU) for each sample as the ratio between the molecule studied and  $\beta_2$ -microglobulin and intensity detected by densitometric analysis (see Section 2).

acetaldehyde (Fig. 2). TGF- $\beta_1$  secretion remained unchanged with ethanol, was maximal with acetaldehyde, and decreased by 28% with LPS (Table 2).

HepG2 cells had lipid peroxidative damage in all experimental conditions, obtaining higher val-

Table 2

TGF- $\beta_1$  and IL-1 $\beta$  secretion after exposure to 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac), and 1  $\mu$ g/ml LPS during 24 and 72 h by HepG-2 cells<sup>a</sup>

Experimental conditions	Secretion (pg/ml $\times 10^6$ cells)	
	TGF- $\beta_1$	IL-1 $\beta$
Control	0	0
24 h Treatment		
Ethanol	199 $\pm$ 6	8.6 $\pm$ 0.9
Acetaldehyde	0	11 $\pm$ 0.9
LPS	380 $\pm$ 22	7.2 $\pm$ 0.8
72 h Treatment		
Ethanol	196 $\pm$ 18	0
Acetaldehyde	502 $\pm$ 34	0
LPS	274 $\pm$ 15	0

<sup>a</sup> TG F- $\beta_1$  and IL-1 $\beta$  secretion were determined by ELISA in supernatants. Values are means  $\pm$  S.D. of three independent experiments, carried out in triplicate.

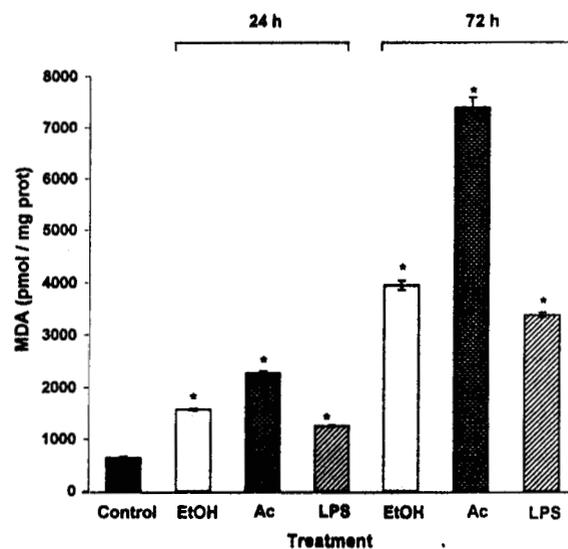


Fig. 3. Lipid peroxidation of HepG2 cells treated 24 and 72 h with 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac) and 1  $\mu$ g/ml LPS. Lipid peroxidation was assayed by determining the rate of malondialdehyde (MDA) production. Values are mean  $\pm$  S.D. for four independent experiments carried out in triplicate. \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

ues at 72 h and Ac treated cells presented the highest values, 11.5 times increase respect to control values (Fig. 3).

Control cells had a GSH content of  $99.5 \pm 5$  nmol/mg of protein. Exposure of the cells for 24 h to EtOH reduced GSH content to  $67 \pm 2$  nmol/mg of protein, Ac to  $28 \pm 4$  nmol/mg of protein and LPS to  $86 \pm 6$  nmol/mg of protein. Seventy two hours treated cells presented  $86 \pm 3$  nmol GSH/mg of protein with EtOH,  $34 \pm 1$  nmol GSH/mg of protein with Ac, and  $47 \pm 4$  nmol GSH/mg of protein with LPS (Fig. 4). Exposure of to cells for 24 h to EtOH, Ac, and LPS did not change GSSG content. Seventy two hours EtOH and Ac treated cells increased GSSG content in 33 and 240%, respectively comparing with control cells (data not shown).

#### 4. Discussion

The findings of the present study indicate that HepG2 cells under aggression by ethanol, acetaldehyde, and LPS presented oxidative damage

and display a differential cytokine response. The damage was time and toxic agent dependent, and it is maximal when cells were exposed to 175  $\mu$ M Ac for 72 h. Lipid peroxidation damage, LDH, ALT, and AST enzymatic activity values presented the highest values under this experimental condition.

Different cell types of the liver probably participate in different ways in the alcoholic liver injury as either a site of necrosis or apoptosis, or a site of altered gene expression leading to the production of mediators, which may then affect the liver and blood cells. Although cells from the monocyte-macrophage lineage have been the most extensively studied for TNF- $\alpha$  production (Van Ostade et al., 1994), it has been recognized that other cells are capable of secreting this factor. Using HepG2 cells in this work we found that ethanol, acetaldehyde, and LPS induced the expression of TNF- $\alpha$  mRNA, but there was no effect on its secretion. This pattern of response could be due either to a direct effect at the post-transcriptional level and/or to the induction of other cytokines with negative autoregulatory effects. Detectable amounts of secreted TNF- $\alpha$

have been reported in the literature under stimulation with LPS at a dose ten-times greater than the one used in this study; this effect became maximal at 4 h, decreasing rapidly after 12 h and no TNF- $\alpha$  was found in the supernatant at 24 and 48 h after LPS stimulation (Saad et al., 1995). Neuman et al. (1998) observed up-regulated expression and secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in HepG2 cells incubated with 80 mM EtOH. No cytokine secretion was reported with lower EtOH concentrations. It would be of interest in the future, to design titration experiments to explore a dose-effect relationship and established the threshold concentration of the toxic, which would be important to know the chronology and interdependency of ethanol-induced cytokine responses.

The effects elucidated by the toxic agents were different in relation to other cytokines. IL-1 $\beta$  was barely detectable under 24 h treatment conditions. In no condition was IL-1 $\beta$ -RNA detected, which may be due to the fact that IL-1 $\beta$  is one of the early damage mediators and its degradation might take place before the period of our 24 h exposure experiment. IL-6 was induced and secreted exclusively in the 24 h LPS treatment. It has been reported that LPS-binding protein synthesis by human primary cultured hepatocytes is up-regulated by IL-6 in a manner that is synergistically enhanced by TNF $\alpha$ . In this way, the IL-6 enhanced formation and release of LPS-binding protein by hepatocytes is an important proximal event in the signaling sequences sensitizing liver tissue to endotoxemia associated with alcohol ingestion (Lands, 1995). However, Lotz et al. (1989) reported that HepG2 cells express IL-6 mRNA and secrete IL-6, and the production was increased after stimulation with IL-1 or TNF $\alpha$ . This difference could apply to different experimental culture conditions. As to TGF- $\beta_1$ , ethanol, acetaldehyde, and LPS stimulated differentially its expression and secretion. Alcohol produced a sustained effect over 72 h and acetaldehyde required a longer time of exposure to result in the highest response. LPS stimulated TGF- $\beta_1$ , but this response decreased over time.

A multiplicity of biological activities of TGF- $\beta_1$  have been described including effects on differen-

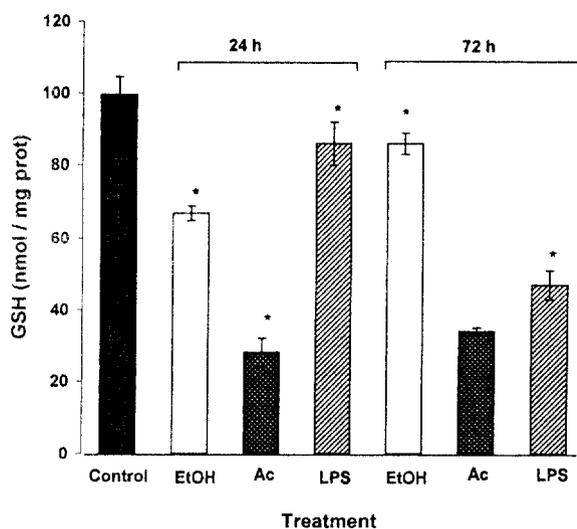


Fig. 4. Glutathione (GSH) content of HepG2 cells treated 24 and 72 h with 50 mM ethanol (EtOH), 175  $\mu$ M acetaldehyde (Ac), and 1  $\mu$ g/ml LPS. Values are mean  $\pm$  SD for four independent experiments carried out in triplicate. \* Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

tiation, proliferation, migration, extracellular matrix synthesis, and resolution. TGF- $\beta_1$  is directly involved in fibrogenesis (Border and Noble, 1994; Bedossa and Paradis, 1995; Lands, 1995). The nature of the biological effects of TGF- $\beta_1$  depends critically on several parameters including cell type, culture conditions, and cellular environment (Gao et al., 1996; Oberhammer et al., 1996). There is a discrepancy of the cellular origin of production of this cytokine within the liver. Normally, the parenchymal cells secrete TGF- $\beta_1$  in a latent form (Roth et al., 1997). The presence of TGF- $\beta_1$  in hepatocytes in its latent form or pre-TGF- $\beta_1$  seems to be an essential requirement for preservation of hepatocellular integrity, because this cytokine can induce apoptosis even after short-term exposure (Oberhammer et al., 1992). The latent form requires a further chemical transformation to induce its activity. Under the experimental conditions of our study, secreted TGF- $\beta_1$  by HepG2 cells underwent acidic hydrolysis for its detection. The mechanism of TGF- $\beta_1$  activation is not fully understood, but proteolytical processing by plasmin, thrombin, mast cell chymase, and leukocyte elastase or possible proteinase 3 might be an important physiological pathway (Sato et al., 1993).

It has previously been described that hypoxia can produce an early and sustained induction of TGF- $\beta_1$  (Patel et al., 1994). Similar results have been observed in animals after partial hepatectomy (Scotté et al., 1997), exposure to phenobarbital (Jirtle et al., 1994) or LPS (Luster et al., 1994), or primary liver carcinoma (Williams and Knapton, 1996). Based on the data of our study, we observed that alcohol and acetaldehyde are also inducers of TGF- $\beta_1$  production.

Initial ethanol concentration in the medium corresponds to the blood level of baboon fed ethanol chronically (Baraona et al., 1981). The acetaldehyde concentrations maintained in the cultures were either the same or higher than the hepatic venous blood levels observed in such animals; however, it is known that acetaldehyde concentrations in the liver are higher than those observed in the blood and, therefore, concentration used in the cell culture media can be expected to be close to the intracellular hepatic acetalde-

hyde levels.

The GSH content is an important cell defense in the maintenance of vital cell functions (Fernández-Checa et al., 1997). In the present study, we have shown that EtOH, Ac, and LPS selectively decreases the GSH content in HepG2 cells. Twenty four hours EtOH and Ac treated cells had shorter GSH values than the 72 h treated cells, while in LPS treated ones, GSH content decreased with time. This observation is in line with previous reports on intact animals *in vivo* and in rat hepatocytes cultures *in vitro* treated with EtOH (García-Ruiz et al., 1995; Kaplowitz et al., 1996).

Lipid peroxidation damage presented higher values in 72 h treatments. The association between TNF- $\alpha$  and prooxidant activities in the liver may be central to the effects of many classic hepatotoxicants, including alcohol-induced cirrhosis (Bird et al., 1990). The central hypothesis that link these observations is that initial liver injury via chemical hepatotoxicants results in lipid peroxidation and focal areas of hepatic damage. The release of ROS is thought to be responsible for the general liver damage that occurs, as evidenced by the ability to attenuate hepatotoxicity by antioxidant treatment or cytokine neutralization. Our findings support the hypothesis that ethanol, acetaldehyde, and LPS may induce a different inflammatory response that may be in part related to exposure time. Numerous studies have indicated that nonparenchymal cells, particularly Kupffer cells, are the major source of hepatic cytokines and growth factors. Recent evidence, however, has suggested that parenchymal cells not only respond to cytokines but also secrete cytokines and growth factors under appropriate conditions. Thus, the present studies confirm and extend the notion that parenchymal cells are capable of cytokine and growth factor production in response to hepatic injury and various stimuli. Although the important role cytokines and growth factors play in liver damage and repair is increasingly being appreciated, the exact role hepatocyte derived cytokines and growth factors play in these processes is unknown. It is possible that they act only as local sites of injury to help facilitate repair. Alternatively, these cytokines and growth factors may not be confined

to the liver, and their release from hepatocytes and their presence in hepatic venous circulation may contribute to extrahepatic disease processes.

### Acknowledgements

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 400200-5-0442PM and 212226-5-0954PM.

### References

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma derived cell line. *Nature* 282, 615–616.
- Baraona, E., Matsuda, Y., Pikkarainen, P., Finkelman, F., Lieber, C.S., 1981. Effects of ethanol on hepatic protein secretion and microtubules: possible mediation by acetaldehyde. In: Galanter, M. (Ed.), *Currents in Alcoholism*, vol. 8. Grune and Stratton, New York, pp. 421–434.
- Bedossa, P., Paradis, V., 1995. Transforming growth factor- $\beta$ : a key-role in liver fibrogenesis. *J. Hepatol.* 22, 37–42.
- Bird, G.L.A., Sheron, N., Goka, J., Alexandra, G., Williams, R.S., 1990. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 112, 917–920.
- Bissell, D.M., Wang, S.S., Jarnagin, W.R., Roll, F.J., 1995. Cell-specific expression of TGF- $\beta$ 1 in rat liver—evidence for autocrine regulation of hepatocytes proliferation. *J. Clin. Invest.* 96, 447–455.
- Bode, C., Fukin, H., Bode, J.C., 1993. Hidden endotoxin in plasma of patients with alcoholic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 257–262.
- Border, W.A., Noble, N.A., 1994. Mechanisms of disease: transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331, 1286–1292.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-quelator combinations in vitro. *Toxicology* 39, 121–134.
- Bouaboula, M., Legoux, P., Pesseque, B., et al., 1994. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with multispecific internal control. *J. Biol. Chem.* 267, 21830–21836.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Chunfang, G., Gressner, G., Zoremba, M., Gressner, A.M., 1996. TGF expression in isolated and cultured rat hepatocytes. *J. Cell Physiol.* 167, 394–405.
- Dong, W., Simeonova, P.P., Gallucci, R., et al., 1998a. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Tox. Appl. Pharmacol.* 151, 359–366.
- Dong, W., Simeonova, P.P., Gallucci, R., et al., 1998b. Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. *J. Interf. Cytokine Res.* 18, 629–638.
- Felver, M.E., Mezey, E., McGire, M., Nathan, C., 1990. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14, 255–259.
- Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., Morales, A., 1997. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 273, G7–G17.
- Gao, C., Gressner, G., Zoremba, M., Gressner, A.M., 1996. Transforming growth factor  $\beta$  expression in isolated and cultured rat hepatocyte. *J. Cell Physiol.* 167, 394–405.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C., 1995. S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 21, 207–214.
- Han, Y., Meng, T., Murray, N.R., Fields, A.P., Brasier, A.R., 1999. Interleukin 1 induced nuclear factor-kappaB-IkappaB-alpha autoregulatory feedback loop in hepatocytes. A role for protein kinase calpha in post-transcriptional regulation of ikappaB-alpha resynthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 939–947.
- Hill, D.B., Marsano, L., Cohen, D., McClain, C.J., 1992. Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 547–552.
- Hill, D., Shedlofsky, S., McClain, C.J., Diehl, A.M., Tsukamoto, H., 1997. Cytokines and liver diseases. In: Remick, D., Friedland, J. (Eds.), *Cytokines in Health and Disease*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 401–425.
- Jirtle, R.L., Hankins, G.R., Reisenbichler, H., Boyer, J.J., 1994. Regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like factor-II receptors and transforming growth factor beta during tumor promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis* 15, 1473–1478.
- Kanimura, S., Tsukamoto, H., 1995. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 21, 1304–1309.
- Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C., Kannan, R., García Ruiz, C., Ookhtens, M., Yi, R.J., 1996. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 377, 267–273.
- Kato, J., Mogi, Y., Kohgo, Y., Takimoto, R., Kobune, M., Hisai, H., Nakamura, T., Takada, K., Niitsu, Y., 1998. Suppressive effect of ethanol on the expression of hepatic asialoglycoprotein receptors augmented by interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Gastroenterol.* 36, 855–859.

- Khoruts, A., Stanke, L., McClain, C.F., Logan, G., Allen, J.I., 1991. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13, 267–276.
- Kuiper, J., Brouwer, A., Knnok, D.L., van Berkel, T.J.C., 1994. Kupffer and sinusoidal endothelial cells. In: Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D.A., Shafritz, D.A. (Eds.), *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th ed. Raven Press, New York, pp. 791–818.
- Lands, W.E.M., 1995. Cellular signals in alcohol induced liver injury. A review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19, 928–938.
- Legoux, P., Minty, C., Delpech, B., Minty, A.J., Shire, D., 1992. Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin- $\beta$  stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerization chain reaction method involving co-amplification with an internal multispecific control. *Eur. Cytokine Netw.* 3, 553–563.
- Lotz, M., Zuraw, B.L., Carson, D.A., Jirik, F.R., 1989. Hepatocytes produce interleukin 6. *Ann. NY Acad. Sci.* 55, 7509–7511.
- Luster, M.I., Germolec, D.R., Yoshida, I., Kayama, F., Thompson, M., 1994. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology* 19, 480–488.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Alcocer Castillejos, N., Ruiz-Soto, R., Mercado, M.A., Orozco, H., Gamboa-Dominguez, A., Alcocer-Varela, J., 1996. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J. Hepatol.* 24, 555–563.
- Moldeus, P., Hogberg, J., Orrenius, S., 1978. Isolation and use of liver cells. In: Jacoby, W.B. (Ed.), *Methods in Enzymology*, pp. 60–71.
- Neuman, M.G., Shear, N.H., Bellentani, S., Tiribelli, C., 1998. Role of cytokines in ethanol-induced cytotoxicity in vitro in HepG2 cells. *Gastroenterology* 115, 157–166.
- Nicotera, P., Orrenius, S., 1994. Molecular mechanisms of toxic cell death: an overview. In: Tyson C.A., Frazier J.M. (Eds.), *In Vitro Toxicity Indicators*. Academic Press, USA, pp. 23–32.
- Oberhammer, F., Nagy, P., Tiefenbacher, R., Fröschl, G., Bouzahzah, B., Thorgeirsson, S.S., Carr, B., 1996. The antiandrogen cyproterone acetate induces synthesis of TGF in the parenchymal cells of the liver accompanied by and enhanced sensitivity to undergo apoptosis and necrosis without inflammation. *Hepatology* 23, 329–337.
- Oberhammer, F.A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A.F., Bursch, W., Schulte-Hermann, R., 1992. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5408–5412.
- Olivares, I.P., Bucio, L., Souza, V., Cárabez, A., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 1997. Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology* 120, 133–144.
- Patel, B., Khaliq, A., Jarvis-Evans, J., McLeod, D., Mackness, M., Boulton, M., 1994. Oxygen regulation of TGF- $\beta$ 1 mRNA in human hepatoma cells. *Biochem. Molec. Biol. Inter.* 34, 639–644.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–63.
- Rietschel, E.I., Kinkac, I., Schode, F.U., et al., 1994. Bacterial endotoxin molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8, 217–225.
- Roth, S., Schurekk, J., Gressner, A.M., 1997. Expression and release of the latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein by hepatocytes from rat liver. *Hepatology* 25, 1398–1405.
- Saad, B., Frei, K., Scholl, F.A., Fontana, A., Maier, P., 1995. Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor  $\alpha$  mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 229, 349–355.
- Sato, Y., Okada, F., Abe, M., Seguchi, T., Kuwano, M., Sato, S., Furuya, A., 1993. The mechanism for the activation of latent TGF- $\beta$  during co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells-cell type. Specific targeting of latent TGF- $\beta$ 1 to smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 123, 1249–1254.
- Scotté, M., Masson, S., Lyoumi, S., Hiron, M., Teniere, P., Lebreton, J.P., Daveau, M., 1997. Cytokine gene expression in liver following minor and major hepatectomy in rat. *Cytokine* 9, 859–867.
- Sen, C.K., Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709–720.
- Tietze, F., 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Van Ostade, X., Tavernien, J., Fiers, W., 1994. Structure-activity studies of human tumor necrosis factor. *Protein Eng.* 7, 5–22.
- Williams, A.U., Knapton, A.V., 1996. Hepatic silicosis, cirrhosis and liver tumors in mice and hamsters: studies of transforming growth factor beta expression. *Hepatology* 23, 1268–1275.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J. III., Curran, T. (1990): Redox regulation of Fos and Jun DNA binding activity *in vitro*. *Science*. 249: 1157-1161.

Adachi Y., Moore L., Bradford B.U., Gao W., Thurman R.G. (1995): Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. 108: 218-24.

Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov Y., Knowles B.B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma derived cell line. *Nature*. 282-615.

Akerboom, T., and Sies, H. (1981): Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 77: 373-382.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1990): Oxidants, antioxidants and degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.

Arai, M. (1986): Effect of ethanol on intestinal uptake of endotoxin (Abstract). *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 83: 1060.

Arai, M., Nakano S., Okuno F., Hirano Y., Sujita K., Kobayashi T., Ishii H. y Tsuchiya M. (1989): Endotoxin-induced hypercoagulability: a possible aggravating factor of alcoholic liver disease. *Hepatology*. 9: 846-851.

Arthur, M.J.P. (1992): The role of matrix degradation in liver fibrosis. In: Gressner, A. M., Ramadori G., (eds). *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Dordrecht: Kluwer Academy Publishers. pp. 213-227.

Arthur, M.J.P. (1995): Collagenases and liver fibrosis. *J. Hepatol*. 22: 43-48.

Arvidsson, S., Fält, K., Marklund S., and Hagglud, U. (1985): Role of free oxygen radicals in the development of gastrointestinal mucosal damage in *Escherichia coli* sepsis. *Cir. Shock*. 16:383-393.

Avruch, J., Zhang, X., Kyriakis, J. (1994): Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *TIBS*. 19:279-283.

Bay M, Schenker S. (1995): Interactions between alcohol and other hepatotoxins. *Alcoholic Liver Disease Pathology and Pathogenesis*. ed. London, UK, Arnold. pp. 260-278.

Baraona, E., Matsuda, Y., Pikkarainen, F., Finkelman, F., Lieber, C.S. (1981): Effect of ethanol on hepatic protein secretion and microtubules: possible mediator by acetaldehyde. In: Galanter, M., ed. *Currents in Alcoholism*. Vol.8. New York, Grune & Stratton. pp. 421-436.

Bautista, A.P. and Spitzer, J.J. (1990): Superoxide anion generation by *in situ* perfused rat liver: effect of *in vivo* endotoxin. *Am.J. Physiol.* 259: G907.

Berdeaux, A. (1993): Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fund. Clin. Pharmacol.* 7:401.

Berger D. and Berger H.G. (1987): Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. *Clin. Chim. Acta* 163: 289-299.

Blomhoff, R., Wake, K. (1991); Perisinusoidal stellate cells of the liver: Important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB.J.* 5: 271.

Bode C., Kugler V. and Bode J. (1987): Endotoxemia in patients with alcoholic and nonalcoholic cirrhosis and subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J. Hepatol.* 4: 8-14.

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

Boron-Kaczmarek A., Hryniewicz A., Kemon A., Szbados A., Puch U., Chrostek L., Szmitkowski M. (1992): Influence of endotoxin on experimental postalcoholic liver injury. *Acta Physiol. Hung.* 79 (4): 399-408.

Boveris, A. Fraga, C.G., Varvasky, A.L., Koch, O.R. (1983): Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 534-541.

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

Buttke, T. H., Sandstrom, P.A. (1994): Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 15: 6-10.

Caballeria, J. (1991): Interactions between alcohol and gastric metabolizing enzymes: practical implications. *Clin. Ther.* 13: 511-520.

Casini, A., Cunningham, M., Rojkind, M., Charles, S.L. (1991): Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism. *Hepatology.* 13:758-765.

Casini, A., Pinzani M., Milani, S., Grappone, C. Galli, G., Jezequel, A., Schuppan, D., Rotella C., Surrenti, C. (1993): Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor B1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology.* 105: 245-253.

Cederbraum, A.I. and Rubin, E. (1974): Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions. *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 963-973.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.

Corrales, F., Ochoa, P., Rivas, C. (1991): Inhibition of glutathione synthesis in the liver leads to S-adenosyl-L-methionine synthetase reduction. *Hepatology.* 14: 528-533.

Crabb, D.W., Bosron, W.F., Li, T.K. (1987): Ethanol metabolism. *Pharmacol. Ther.* 34: 59-73.

Clement B., Grimaud J.A., Campion J.P., Deugnier Y., Guillouzo A. (1986): Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology.* 6: 225-234.

Clement, B., Loréal, O., Levavasseur, F., Guillouzo, A. (1993): New challenges in hepatic fibrosis. *J. Hepatol.* 18: 1-4.

Dajer F., Guevara L., Arrosamena L. (1978): Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México. *Rev. Invest. Clín.* 30:13-28.

Dearfield, K.L., Jacobson-Kiam, O., Brown, N.A., Williams, J.R. (1983): Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutat. Res.* 108: 437-449.

Demple, B., Amabile-Cuevas, C.F. (1991): Redox redux: the control of oxidative stress response. *Cell.* 67: 837-839.

Devi, B.G., Henderson, G.I., Frosto, T.A., Schenker, S. (1993): Effect of ethanol rat fetal hepatocytes: studies on cell replication, lipid peroxidation and glutathione. *Hepatology.* 3: 648-658.

Diamond, L., Kruszewski, F., Aden D.P., Knoweles, B.B., Baird W.M. (1980): Metabolic activation of benzo(a)pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis.* 1: 871-875.

Dierick, P.J. (1989): Partial purification and characterization of the soluble glutathione transferase isoenzymes from culture HepG2 cells. *Cell. Biol. Int. Rep.* 13 (7): 585-593.

Donato, M.T., Castell, J.V., Gomez-Lechon, J. (1991): Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines. Expression of drug biotransformation activities by hepatocytes. *Cell. Biol. Toxicol.* 7: 1-14.

Duthie, S.J., Melvin, W.T., Burke, M.D. (1994): Bromobenzene detoxification in the human liver derived HepG2 cell line. *Xenobiotica.* 24 (3): 265-279.

El-Samalouti, V.T., Schletter, J., Brade, H., Brade, L., Kusumoto, S., Rietschel, T.E., Flad, D.H., Ulmer, J.A. (1997): Detection of lipopolysaccharide (LPS)-binding membrane proteins by immuno-coprecipitation with LPS and anti-LPS antibodies. *Eur. J. Biochem.* 250: 418-424.

Fernández-Checa, J.C., García -Ruiz, C., Ookthens, M., Kaplowitz, N. (1991): Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from ethanol- feed rats. *J. Clin. Invest.* 87: 397-405.

Fernández-Checa, J.C., Hirano, T., Tsukamoto, H., Kaplowitz, N. (1993): Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol.* 10: 469-475.

Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., Morales, A. (1997): GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol. G* 7-17.

Friedman, S.L., Millword-Saddler, G.H., Arthur M.J.P. (1992): Liver fibrosis and cirrhosis. En: Millword-Saddler G.H., Wright r., Arthur MJP. (eds). *Wright's Liver and biliary and management.* Vol. 2, 3rd . London: WB Saunders. 821- 881.

Friedman, S.L. (1996): Hepatic stellate cells. *Prog. Liver Dis.* 14: 101-130.

Friedman, S.L. (1999): Stellate Cell Activation in Alcoholic Fibrosis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23: 904-910.

French, S.W., Nash, J., Shitabat. and col. (1993): Pathology of alcoholic liver disease. *Sem. Liver Dis.* 13: 154-169.

Fukui, H., Kitano., Bode, J. Ch., Bode, Ch. (1991): Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J. Hepatol.* 12: 162-169.

Fukui, H., Kitano, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., Kikukawa, M., Morimura, M., Tsujita, S., Nagamoto, I., Nakatani, T., Tsujii, T. (1994): Effect of ethanol on the endotoxin binding protein produced in the liver. *Alcohol Alcoholism.* 29: 87-91.

Fukui, H., Tsujita, S., Matsumoto, M., Morimura, M., Kitano. H., Kinoshita, K., Kikuchi, E., Okamoto, Y., Tsujii, T. (1995): Endotoxin inactivating action of plasma in patients with liver cirrhosis. *Liver.* 15: 104-109.

Galambos, J.T. (1979): En: *Cirrosis Mayor Problems in International Medicine.* Vol. XVII: 91-127. Saunders, Philadelphia.

Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M.A., Schade, F.U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S.,

- Shiba, T. (1985): Synthetic and *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. Eur. J. Biochem. 148:1-5.
- Geerts, A., Greenwel, P., Cunningham, M., De Bliese, P., Rogiers, V., Wisse, E., Rojkind, M. (1990): Localization of collagen, fibronectin and laminin gene transcripts in freshly isolated and purified parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells (abstr): Hepatology. 12: 950.
- Geokas, M.C., Lieber, C.S., French, S. and Halsted, C.H. (1981): Ethanol, the liver, and the gastrointestinal tract. Ann. Int. Med. 95: 198-211.
- Gonzalez, R.C., Brajin, R.M., Santolaria, F.F., Díaz, F.L., Conde, M.A., Rodríguez, R.E., Essardas, D.U. (1992): Ito cells and fibrogenesis in chronic alcoholic liver disease. Drug Alcohol Depend. 29: 225-230.
- Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J., Rojkind, M. (1991): Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. Lab. Invest. 65: 644-653.
- Greenwel, P. (1999): Acetaldehyde-mediated collagen regulation in hepatic stellate cells. Alcohol Clin. Exp. Res. 23: 930-933.
- Grant, B.F., Dufor, M.C., Harford, T.C. (1988): Epidemiology of alcoholic liver disease. Sem. Liv. Dis. 8:12-25.
- Gressner, A.M. and Althus, M. (1988): Effect of ethanol, acetaldehyde, and lactate on proteoglycan synthesis and proliferation of cultured rat liver fat-storing cells. Gastroenterology. 94: 797-708.
- Gressner, A.M. and Bachem, M.G. (1995): Molecular Mechanisms of liver fibrogenesis. A homage of activated fat-storing cells. Digestion. 56:335-346.
- Gressner, A.M. (1996): Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: A key event in hepatic fibrogenesis. Kidney Int. 49: S-39-S-45.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M.C. (1985): The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol. Aspects Med. 8: 89-193.
- Han, J., Lee, J., Tobias, P.S., Ulevitch, R. (1993): Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. J. Biol. Chem. 268: 25009-25014.
- Handler, J.A., Thurman, R.G., (1990): Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 265: 1510-1515.
- Hasumura, Y., Teschke, R., Lieber, C.S. (1976): Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 251: 4908-4913.

Iredale, J.P., Murphy, G., Hembry, R.M., Friedman, S.I., Arthur, M.J. (1992): Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-I: Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J. Clin. Invest.* 90: 282-287.

Jaeschke, H., Smith, W.C., Clemens, M.G., Ganey, E.P., Roth, A.R. (1996): Mechanisms of inflammatory liver injury: Adhesion Molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 213-226.

Jauhonen, P., Baraona, E., Miyakawa, H., Lieber, C.S. (1982): Mechanism for selective perivenular hepatotoxicity of ethanol. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 6: 350-357.

Jönval, H. (1994): The alcohol dehydrogenase system. En: molecular basis of alcohol use and abuse. Ed. by B. Jansson, H. Jönval, U. Rydberg, L. Terenius and B.L. Vallee. pp.221-229.

Karbowski, M., Kurono, C., Nishizawa, Y., Horie, Y., Soji, T., Wakabayashi, T. (1997): Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1349: 242-250.

Karbowski, M., Kurono, C., Wozniak, M., Ostrowski, M., Teranishi, M., Nishizawa, Y., Usukura, J., Soji, T., Wakabayashi, T. (1999): Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 396-409.

Kelly, H. J., Darlington, J. G. (1989): Modulation of the liver specific phenotype in the human Hepatoblastoma line HepG2. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 217-22

Kershenobich, S.D. (1995): Los Avances en Cirrosis Hepática. *Rev. Gastroenterol. México.* 60 (4): 24-25.

Kershenobich, S.D. y Milke, G.P. (1996): El Alcohol: Adicción y daño hepático. *Cuadernos de Nutrición.* 19 (4): 5-14.

Keshavarzian, A., Holmes, E.W., Patel, M., Iber, F., Fields, J.Z., Pethkar, S. (1999): Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced damage. *Am. J. Gastroenterol.* 94: 200-207.

Koch, O.R., Galeotti, T., Bartoli, G.M., Boveris, A. (1991): Alcohol-induced oxidative stress in rat liver. *Xenobiotica.* 21: 1077-1084.

Koch, O R. y Koch C.A. (1994): Estrés oxidativo hepático inducido por etanol. *Rev. Gastroenterol. México.* 59(2): 44-55.

Kopun, M., Propping, P. (1977): The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 11: 337-344.

Kremers, P. (1988): Drug metabolism and cytotoxicity in cultured fetal hepatocytes. En: Liver Cell and Drugs. de. A. Guillouzo INSERM: pp 245-251.

Kremers, P., Roelandt, L., Stouvenakers, N., Goffinet, G., Thome J.P. (1994): Expression and induction of drug-metabolizing enzymes in cultured fetal rats hepatocytes. Cell. Biol. Toxicol. 10: 117-125.

Kovacheva, S., Ribarov, S. (1996): Lipid peroxidation in the lung of rats exposed to endotoxin: effect of vitamin E supplementation. Pharmacol. Toxicol. 79: 177-182.

Kubota, S., Lasker, J.M., Lieber, C.S. (1988): Molecular regulation of ethanol-inducible cytochrome P450-IIIE1 in hamsters. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150: 304-310.

Lands W.E.M. (1995): Cellular Signals in Alcohol-Induced Liver Injury: A Review. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 19 (4) : 928-938.

Lauterberg, B.H., Bilzer, M. (1988): Mechanisms of acetaldehyde hepatotoxicity. J. Hepatol. 7: 384-390.

Leibach, W.K. (1975): Quantitative aspects of drinking alcoholic liver cirrhosis. En: Khanna H.M., Israel Y., Kalant H. (eds): Alcoholic liver pathology, Toronto, Addiction Research Foundation of Ontario. pp 1-18.

Le Moine, O., Soupison, T., Sogni, P., Marchant, A., Moreau, R., Hadengue, A., Goldman, M., Devière, J., Lebrec, D. (1995): Plasma endotoxin and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the hyperkinetic state of cirrhosis. J. Hepatol. 23(4): 391-395.

Lieber, C.S. (1980): Alcohol, protein metabolism, and liver injury. Gastroenterology 79: 379-390.

Lieber, C.S. (1984): Alcohol and the liver: update. Hepatology. 4: 1242-1260.

Lieber, C.S. (1988): Metabolic effects of acetaldehyde. Biochem. Soc. Trans. 4: 1243-1260.

Lieber, C.S. (1990): Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogenesis and vitamins. Alcohol Alcoholism. 25: 157-176.

Lieber, C.S. (1993): Alcohol and the liver. Gastroenterology. 106: 1085-1105.

Lindros, K.O. (1978): Acetaldehyde, its metabolism and role in the actions of alcohol. En: Research advances in alcohol and drug problems, (Y. Israel, F.B. Glaser, H. Kalant, R.E. Popham, W. Schmidt, R.G. Smart, eds). Plenum Press, New York. 4: 111-76.

- Lindros, K.O. (1995): Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. *J. Hepatol.* 23: 7-15.
- Litov, R.E., Irving, D.H., Downey, J.E. and Tappel, A.L. (1978): Lipid peroxidation a mechanism involved in acute ethanol toxicity as demonstrated *in vivo* pentane production in the rat. *Lipids.* 13 : 305-307.
- 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
- Maher, J.J., Zia, S., Tzagarakis, C. (1994): Acetaldehyde-induced stimulation of collagen synthesis and gene expression is dependent on conditions of cell culture: studies with rat lipocytes and fibroblast. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18: 403-409.
- Maher, J.J., Neushawander-Tetri, B.A. (1997): Manipulation of glutathione stores in rat hepatic stellate cells does not alter collagen synthesis. *Hepatology.* 26: 618-623.
- Manson, N.H., M.B. Deardoff, L.R. Eaton and M.L. Hess (1985): Possible role of leukocyte-derived oxygen free radicals in the myocardial failure of sepsis. En: *Oxygen free radicals in shock.* (Eds.), G.P. Novelli and F. Ursini. Karger, Basel. pp. 169-174.
- Mao, Y., Nobaek, B., Kasravi, B. et al. (1996): The effects of lactobacillus strain and oat fiber methotrexate-induced enterocolitis in rat. *Gastroenterology.* 11: 334-344.
- Martin, F., Mathison, J., Tobias, P., Letureq, D., Moriarty, A., Maunder, R., Ulevitch, R. (1992): Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 90: 2209-2219.
- Mithofer, K., Sandy, M.S., Smith, M.T., Di Monte, D. (1992): Mitochondrial poisons cause depletion of reduced glutathione in isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 132-136.
- Moshage H., Casini A., Lieber C.S. (1990): Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes. *Hepatology.* 3 : 511-518.
- Nakano, M., Worner, T.M., Lieber, C.S. (1982): Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: ultrastructure and histologic progression. *Gastroenterology.* 83: 77-785.
- Nanji, A. A., Zhao, S., Sadrzadeh, S.M.H., Waxman, D.J. (1992): Serial changes in cytochromes P450 2E1, 4A, and 2B1 in experimental alcoholic liver injury. *Hepatology.* 16: 112 A.

Nanji, A., Khettry, U., Sadrzadeh S., Yamanaka T. (1993): Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease: correlation with plasma endotoxin prostaglandin E2, leukotriene B4 and tromboxane B2. *Am. J. Pathol.* 152: 367-373.

Nanji, A., Kmeitry, U., Sadrzadeh, H. (1994): Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205: 243-7.

Neuman, G.M., Koren, G. Tiribelli, C. (1993): *In vitro* assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 97: 932-941.

Neuman, G. M., Cameron, G.R., Shear, H.N., Bellentani, S. Tiribelli, C. (1995): Effect of tauroursodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on ethanol-induced cell injuries in the Human HepG2 cell line. *Gastroenterology.* 109: 555-563.

Neushawander-Tetri, B., Bellezo, J. Britoon. R., Bacon, B., Fox, S. (1996): Thiol regulation of endotoxin -induced release of tumor necrosis factor  $\alpha$  from isolated rat Kupffer cells. *Biochem. J.* 320: 1005-1010.

Nolan J. P. (1981): Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology.* 1: 458-465.

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

Nolan, J.P. (1988): Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury. An idea whose time has come again. *Hepatology.* 8: 232-6.

Nomura, F., Pikkarainen, P., Jauhonen, P., Arai, M., Gordon, E.R., Bararona, E., Lieber, C.S. (1983): Effect of ethanol administration on the metabolism of ethanol of baboons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 78-83.

Organización Panamericana de la Salud-México. Problemas y riesgos específicos de salud. Información técnica. México, D.F. OPS. 1997. 1.

Olivares, I.P., Bucio, L., Souza, V., Cárabez, A., Gutiérrez-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.

Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poñi, G., Gentilini, P., Dianzani, M.U. (1993): Stimulation of lipid peroxidation or 4-hidroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194:1044-1050.

Perrot, N., Nalpas, B., Yang, C.S., Beaune, P.H. (1989): Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver by ethanol and drug intake. *Eur. J. Clin. Invest.* 19: 549-555.

Porquet, D., Appel, M., Fournier, T., Bartaux, O., Biou, D., Féger, J. (1992): Evaluation of the hepatotoxicological effects of a drug in an *in vivo* / *in vitro* model. *Experientia*. 48: 257-261.

Portolés.T.M. Ainaga,J.M., Pagani,R. (1993): The induction of lipid peroxidation by *E.coli* lipopolisaccharide on rat hepatocytes as an important factor in etiology of endotoxic liver damage. *Biochem. Biophys. Acta*. 1158: 287-282.

Poot,M., Teubert,H., Rabinovitch,P.S., Kavanagh,T.J. (1995): The novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J.Cell. Physiol*. 163: 555-560.

Rietschel T.E. and Brade, H. (1992): Bacterial Endotoxins. *Sci. Am*. 267: 26-33.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F., U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M., Brade, H. (1994): Baterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8: 217-225.

Rubin, E. and Lieber,S.C. (1981): Ethanol Metabolism in the Liver, En: *Progress in Liver Diseases*. H. Popper and F. Schaffner (eds.). Grune and Stratton. New York. pp.58-63

Sadd, B., Frei, K., Scholl,F., Fontana, A., Maier, P. (1995): Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor  $\alpha$  mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes.*Eur. J. Biochem*. 229: 349-355.

Sadrzadeh, S.M.H., Nanji.A.A., Meydani M., (1994): Effect of chronic ethanol intake on plasma and liver alpha and gamma tocopherol levels in normal and vitamin E deficient rats:relationship to lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol*. 47: 2005-2010.

Salaspuro,M., Lindros, K. (1985). Metabolism and toxicity of acetaldehyde. En: *Alcohol Related Diseases in Gastroenterology*.H.K. Seitz and B. Kimmerell, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 105-123.

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Planeación, Dirección General de Estadística e Informática. Mortalidad. Principales causas de mortalidad general. México, D.F. 1995. 69.

Schuman, R.R., Leong,S.R., Flaggs,G.W., Gray,P.W., Wright,S.D., Mathison,J.C., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 249: 1429-1431.

Shaw,S., Rubin,K.P., Lieber, C.S. (1983): Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. Evidence of lipid peroxidation. *Digest. Dis. Sci*. 28: 585-589.

- Shibayama Y., Asaka S., Nakata K. (1991): Endotoxin hepatotoxicity augmented by ethanol. *Exp Mol. Pathol.* 55: 196-202.
- Shigenaga.M.K., Hagen,T.M., Ames,.B.N. (1990): Oxidative damage mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10771-1078.
- Song, B.J., Veech, R.L., Park, S.S. Gelboin, H.V., Gonzalez. F.J. (1988): Structure and regulation of the ethanol-inducible cytochrome P450. *Adv. Alcohol. Subst. Abuse.* 7: 205-207.
- Sörensen, T.I. (1989): Alcohol and liver injury. Dose-related or permissive effect? *Liver.* 9: 189-197.
- Speisky, H., Macdonald, A., Giles, H.G., Orrego., H. Israel, Y. (1985): Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.* 225: 565-572.
- Sugino,K., Dohi, K., Yamada,K., Kawasaki,T. (1987): The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery.* 101: 746-752.
- Tanner,A.R., Bantock, I., Hinks, L. Lloyd, B., Turner, N.R., Wright, R. (1986): Depressed selenium and vitamin E levels in an alcoholic population: Possible relationship to hepatic injury through increase lipid peroxidation. *Dig. Dis. Sci.* 31: 1307-1312.
- Thot C.A. and Thomas, P. (1992): Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology.* 16: 255-266.
- Thurman,R.G.(1998): Mechanism of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am. J. Physiol.* 275: G605-G611.
- Tietze. F. (1969): Enzymic method for quantitaive determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Tsukamoto, H. (1993): Oxidative stess, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol.* 10: 465-467.
- Ulevitch R.J., Johnston, A.R. and Weinstein D.B. (1979): New function for high density lipoproteins: their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J.Clin. Invest.* 64: 1516-1524.
- Ulevitch,J., Tobias, P. (1994): Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 125-130.
- Uysal,M., Özdemirler,G., Kutalp,G., Özdermiler. H. (1989): Mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver after acute acetaldehyde and ethanol intoxication. *J.Appl.Toxicol.* 3:155-158.

- Valenzuela, A., Fernandez, N., Fernandez, V., Ugarte, G., Videla, L. (1980): Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and the activity of the enzymes related to peroxide metabolisms in rat liver. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 111:11-13.
- Videla, L., Fernandez, V., De Marinis, A. (1982): Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatments in the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 965-970.
- Videla, L.A., Fraga, C.G., Koch, O.R., Boveris, A. (1983): Chemiluminescence of the "in situ" rat liver after acute ethanol intoxication. Effect of (+) - cyanidanol 3. Biochem. Pharmacol. 32: 2822-2825.
- Wakabayashi, T., Adachi, K., Matsushashi, T., Wozniak, M., Antosiewicz, J., Karbowski, M. (1997): Suppression of the formation of megamitochondria by scavengers for free radicals. Mol. Aspects. Med. 18: 51-61.
- Weiner, F.R., Giambrone, M.A., Czaja, M.J., Shah, A., Annoni, G., Takahashi, S., Eghbali, M., Zern, M.A. (1990): Ito cell gene expression and collagen regulation. Hepatology. 11: 111-117.
- Wlodek, L., Rommelspacher, H. (1994): Ethanol-induced changes in the content of thiol compound and lipid peroxidation in livers and brains from mice: protection by thiazolidine derivatives. Alcohol. 6: 649-657.
- Woessner J.F. (1961): The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys. 93: 440-447.

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 \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ de 1999.

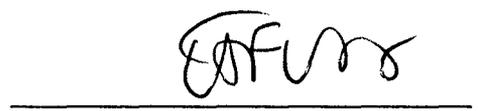
Comité tutorial



Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz



Dra. Leticia Bucio Ortiz



Dra. Teresa I. Fortoul Vandergoes