

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL DAÑO PRODUCIDO EN CÉLULAS DE
ORIGEN HEPÁTICO HUMANO POR UNA EXPOSICIÓN AGUDA A
ETANOL Y ACETALDEHÍDO**

TESIS

que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental presenta:

Biol. IRMA PATRICIA OLIVARES JIMÉNEZ.

México, D.F., Junio de 1995

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

A una bella dama que me permitió descubrir que
la Ciencia es algo más que buscar y encontrar.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Agradezco al Dr. Alfonso Cárabez Trejo de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por su valiosa colaboración para obtener las microscopias electrónicas.

A mis compañeras del laboratorio de Fisiología Celular de la UAM-I, Leticia Bucio Ortiz y Verónica Souza Arroyo por el apoyo que me brindaron durante la realización del presente trabajo.

Sobre todo, le agradezco a la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz todo el apoyo y la paciencia que tuvo para conmigo, no solo en el trabajo de tesis, sino también durante mis estudios de Maestría.

Esta tesis se llevo a cabo en el laboratorio de Fisiología Celular del departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz y la asesoría del Dr. Edmundo Chávez Cossio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" así como de la M. en C. Leticia Bucio Ortiz.

La Maestría en Biología Experimental cuenta con el apoyo de del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) según convenio PFPN/66/92 por considerarse con el nivel de excelencia.

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada con No. de registro BA92030 durante mis estudios en la Maestría de Biología Experimental y durante el desarrollo de la tesis.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADH	Alcohol Deshidrogenasa
MEOS	Sistema Oxidativo Microsomal
ACH	Acetaldehído
NAD ⁺	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Oxidado
NADH	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Reducido
NADP ⁺	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosfato Oxidado
NADPH	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido
ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
GGT	Gamma Glutamil Transpeptidasa
ALAT	Alanina Amino Transferasa
ASAT	Aspartato Amino Transferasa
DMEM	Medio Modificado de Eagle de Dulbecco
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RN	Rojo Neutro
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium
MDA	Malondialdehido
TCA	Ácido Tricloroacético
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
SH	Grupos Sulfhidrilos

GSH	Glutati3n Reducido
DTNB	5,5'-ditiobis-2-3cido nitrobenzoico
EDTA	3cido etilendiamino-tetra-ac3tico
CL₅₀	Concentraci3n que causa un 50% de la p3rdida de viabilidad celular
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
ANOVA	An3lisis de varianza
h	horas
min	minutos
<i>g</i>	gravedades
rpm	revoluciones por minuto
3c	grados cent3grados
nm	nan3metros
nmol	nanomoles
mU	miliunidades
ml	mililitros
μl	microlitros
mM	milimolar
M	Molar
μg	microgramos
g	gramos
mg	miligramos
ΔA	Cambio en la Absorbancia

CONTENIDO

CONTENIDO	1
1.- INTRODUCCIÓN	3
1.1 METABOLISMO DEL ETANOL	4
1.2 EFECTOS TOXICOS DEL ETANOL	9
1.3 EFECTOS TOXICOS PRODUCIDOS POR EL ACETALDEHIDO	12
1.4 IMPORTANCIA DE ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES	15
2.- OBJETIVO.	18
3.- MATERIAL Y METODOS.	19
3.2 VIABILIDAD CELULAR CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACETALDEHÍDO Y ETANOL.	19
3.3 CONDICIONES DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS.	20
3.4 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTO CON ACETALDEHÍDO Y ETANOL.	21
3.5 CAPACIDAD ADHESIVA, DE LAS CÉLULAS, AL SUSTRATO.	21
3.6 MICROSCOPIA.	23
3.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD .	24
3.8 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN.	26
3.9 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.	27
3.10 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILOS (SH⁻).	28
3.11 CONTENIDO DE PROTEÍNA.	29
3.12 PROCEDENCIA DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.	30
3.13 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE DATOS.	30
4.- RESULTADOS.	32

4.1 VIABILIDAD CELULAR CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACETALDEHIDO Y ETANOL.	32
4.2 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DE APLICADOS LOS TRATAMIENTOS CON ACETALDEHIDO Y ETANOL.	37
4.3 CAPACIDAD ADHESIVA DE LAS CÉLULAS AL SUSTRATO	.38
4.4 MICROSCOPIA	41
4.5 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.	50
4.7 CONSUMO DE OXÍGENO.	55
4.8 CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH).	56
5.- DISCUSIÓN	62
6.- BIBLIOGRAFÍA	71

1.- INTRODUCCIÓN

El alcoholismo y el consumo inmoderado de bebidas alcohólicas son problemas multifacéticos y multicausales que atañen a toda la sociedad y que deben tenerse en consideración, no solo por su relación con la salud física, sino debido a sus consecuencias en la salud mental individual y de la comunidad.

En países desarrollados, el alcoholismo constituye un grave problema social. Sin embargo, es aún mayor en los países en desarrollo, donde se conjugan otros problemas como el desempleo y la desnutrición.

El daño que el alcohólico puede causarse a sí mismo y a los demás es enorme, es necesario mencionar que la expectativa de vida del alcohólico es menor en 10 ó 12 años comparada con la población no alcohólica (Velasco,1981). En cuanto a las relaciones interpersonales, el daño es incalculable: desintegración familiar, separaciones y divorcios, ausentismo laboral y accidentes de trabajo, además de alta coincidencia de alcoholismo con actos criminales. El alcoholismo afecta al 10% ó más de la población en el mundo y después de las enfermedades cardíacas y del cáncer, ocupa el tercer lugar en problemas de salud (Mason,1990). El abuso en el consumo del alcohol puede producir daños más o menos graves en los distintos órganos y sistemas del organismo. Los más frecuentemente afectados son el hígado, el páncreas, el sistema nervioso y el tracto digestivo. De estos el más susceptible de daño es el hígado, ya que es donde se lleva a cabo preferentemente el metabolismo de este tóxico (Geokas et

al, 1981). Las enfermedades hepáticas debidas al alcohol son un problema económico y de salud de los más graves en la actualidad y está presente en la mayoría de los países. En México, la cirrosis es considerada la sexta causa de muerte en sujetos económicamente activos y entre las causas que la producen, el alcoholismo ocupa sin lugar a dudas el primer lugar (Chávez,1983). Una intervención más efectiva y específica es necesaria para combatir este problema. Sin embargo, la terapia que se aplica hasta la fecha no ha resultado efectiva. Parte de este problema radica en el hecho de que muchos de los mecanismos de daño inducidos por este tóxico no están bien comprendidos, en parte, debido a que los innumerables estudios realizados al respecto utilizan protocolos experimentales muy variables que arrojan resultados en ocasiones contradictorios (Zern et al,1982). Por lo tanto, a pesar de que desde hace más de 30 años diversos grupos de investigación se han dedicado a la tarea de determinar el mecanismo involucrado en la toxicidad del etanol, aún no resulta claro si el daño producido se debe al etanol "per se" o a productos de su metabolismo, principalmente al acetaldehído, o bien, se trata de un efecto conjunto.

1.1 METABOLISMO DEL ETANOL

El principal órgano involucrado en el metabolismo del etanol en el ser humano es el hígado, ya que en él se lleva a cabo del 80 al 90% de su oxidación (Rubin et al,1981).

El etanol es una sustancia polar que debido a su tamaño y carga electrónica débil, fácilmente atraviesa las membranas celulares por difusión simple. Después de ser ingerido se absorbe en el tracto gastrointestinal, sobretodo en el estómago e intestino delgado y en menor grado en el colon (Geokas et al,1981).

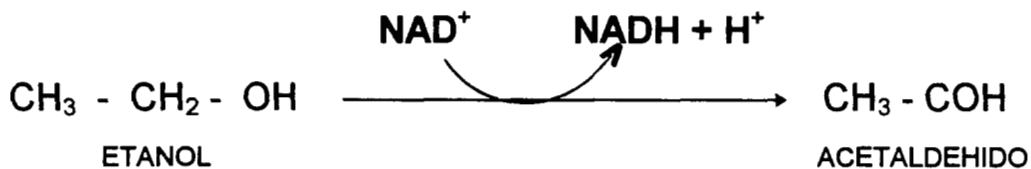
Después de su absorción en el intestino, el etanol pasa a la circulación portal y posteriormente a la circulación sistémica; se difunde rápidamente a través de los capilares y otras membranas y se distribuye en los espacios extra e intracelulares (Kopun et al,1977). Del alcohol absorbido solamente se elimina de un 2 a un 10% de éste mediante la orina y la respiración (Lieber,1980) y se oxida principalmente en el hígado. La especificidad de este órgano para metabolizar el etanol explica las severas alteraciones metabólicas que el etanol puede producir en él.

Los hepatocitos poseen principalmente tres sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el etanol: la alcohol deshidrogenasa (ADH) 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. Estos tres sistemas enzimáticos catalizan la conversión del etanol a acetaldehído (ACH); el que a su vez, es oxidado por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) localizada en el citosol y en las mitocondrias hepáticas, para generar el ácido acético. Finalmente el ácido acético se transforma en acetilCoA la cual se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbóxicos que es el principal sistema celular productor de enlaces químicos de alta energía (Rubin et al,1981).

1.1.1 ALCOHOL DESHIDROGENASA

En el hígado del ser humano la enzima que se encarga del metabolismo del etanol pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena media, la cual contiene en su estructura zinc, como catalizador, así como un grupo tiol (Jönvall, 1994).

La ADH es la encargada de oxidar cerca del 90% del alcohol ingerido para convertirlo en acetaldehído, por lo que se considera que constituye la principal vía de oxidación del etanol.

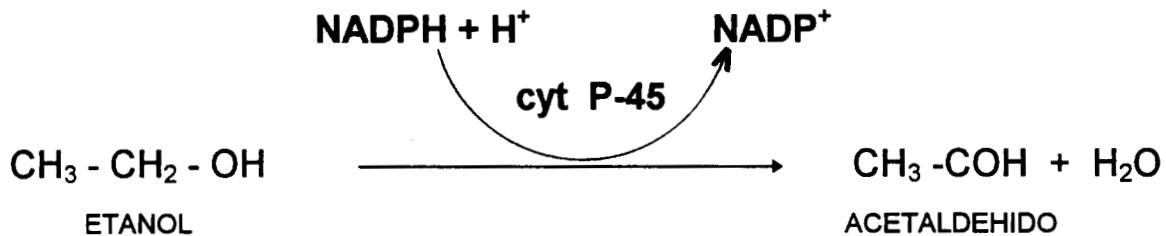


La ADH se encuentra en forma abundante en el citosol de hepatocitos, aunque también se ha reportado que está presente en cantidades pequeñas en el tracto gastrointestinal, los riñones y el pulmón. Las ADH constituyen un sistema enzimático complejo en el cual están presentes diferentes isoenzimas (Jönvall, 1994). Hasta la fecha, se han reportado cinco clases de isoenzimas que se expresan en tejidos humanos y de muchos otros vertebrados, las cuales se distinguen por sus variantes alélicas, lo que se asocia con diferencias funcionales en la unión a coenzimas y por lo tanto a diferencias catalíticas, reflejando en la población diferencias en la sensibilidad a la ingesta del alcohol (Jönvall, 1994). En hepatocitos aislados se ha visto

que la actividad de ADH baja rápidamente. Grunnet et al (1989) reportan que en cultivos primarios de hepatocitos la actividad de la enzima ADH declina un 20% después de 24h, manteniéndose esta actividad por dos semanas.

1.1.2 SISTEMA OXIDATIVO MICROSOMAL

El sistema oxidativo microsomal (MEOS) se localiza en el retículo endoplásmico y también es capaz de metabolizar al etanol (Lieber,1984). Este sistema cataliza la oxidación de etanol en presencia de O_2 y NADPH, resultando la generación de acetaldehído, $NADP^+$ y H_2O (Geokas et al,1981).



En estudios con animales de laboratorio se ha reportado que bajo condiciones normales este sistema metaboliza solo un 10% del tóxico. Sin embargo, existe controversia acerca del papel que juega en condiciones de ingestión crónica con alcohol (Lieber,1984). Nomura et al (1983) observaron, que después de tratar a macacos crónicamente con etanol se presentaba un incremento significativo de este sistema

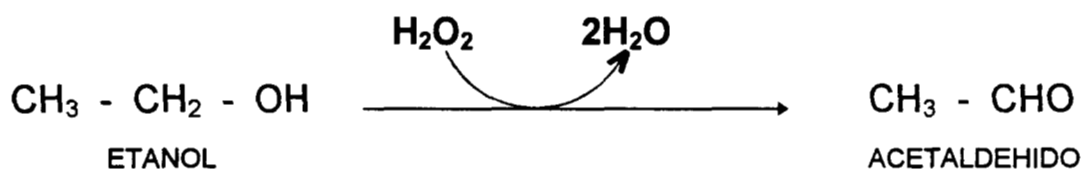
(MEOS) y se ha sugerido que existe una inducción de una forma de citocromo P-450 específica para etanol debida a la ingesta crónica de él (Lieber,1984). Esto se ve apoyado en trabajos con gerbos (roedores mamíferos) donde se ha encontrado que a pesar de que carecen de alcohol deshidrogenasa son capaces de oxidar el etanol en un 80% respecto a un control con ADH. Esta oxidación ha sido asociada con el incremento en la actividad del MEOS y del citocromo P-450 contenido en los microsomas del hígado, después de una ingestión crónica (Lieber,1984). La activación de este sistema puede tener efectos adversos al hígado ya que se incrementa la producción de acetaldehído, así como los efectos adversos asociados con este metabolito.

El incremento en la actividad microsomal puede además afectar el metabolismo de fármacos disminuyendo su eficacia terapéutica ó bien puede potenciar su toxicidad. Esta inducción también es importante en la activación de la carcinogénesis, lo que podría explicar la alta incidencia de cáncer en alcohólicos (Lieber,1990). Por otra parte puede afectar también el metabolismo de ciertos nutrientes esenciales como sería la vitamina A (Lieber,1984).

1.1.3 SISTEMA DE LA CATALASA

La catalasa no solo cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno, sino que también se considera una de las tres vías disponibles en el hígado para metabolizar el etanol, cuando la ingesta de éste es alta. Esta enzima se localiza en los peroxisomas, y puede

oxidar el etanol a acetaldehído y agua cuando existe peróxido de hidrógeno presente en el medio. Chen et al (1992) demostraron que con dosis agudas el sistema de la catalasa no se estimula. Lieber (1984), reporta 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.



1.2 EFECTOS TOXICOS DEL ETANOL

1.2.1 Alteraciones del Estado Redox Celular.

La oxidación del etanol por la ADH provoca la transferencia de hidrógenos al cofactor NAD^+ lo que origina la producción de iones hidruro en exceso. Este proceso altera el estado redox de la célula y se considera como causa primaria de alteraciones posteriores en el metabolismo de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácido láctico, así como un incremento de la síntesis de colágena (Lieber, 1980). Por lo tanto, los cocientes de NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en el citosol y compartimentos de la mitocondria están alterados (Domschke et al, 1974).

El efecto de la oxidación del etanol en el potencial redox, resulta en un incremento en la conversión de piruvato a lactato. El aumento en la producción de lactato y la disminución en su utilización por los tejidos periféricos, incrementa los niveles de lactato (Lieber,1984). Este incremento puede afectar el metabolismo del ácido úrico. Se ha demostrado en humanos que niveles altos de lactato en la sangre, decrecen el ácido úrico urinario y se incrementa la concentración de éste en el suero (Francis,1988). Por otra parte, la alteración del cociente $NAD^+/NADH$ debido a la oxidación del etanol puede afectar el metabolismo de carbohidratos, inhibiendo la gluconeogénesis y esto puede originar hipoglucemia si se presenta una liberación severa de glucógeno (Krebs et al,1969).

1.2.2 Metabolismo de Lípidos.

Las interacciones del etanol con el metabolismo de los lípidos son múltiples y complejas (Lieber et al,1989). La ingestión aguda y crónica del etanol puede inducir un hígado graso, lo que se ha podido observar, tanto en animales de laboratorio como en el ser humano. La alteración del potencial redox, asociado con la oxidación del etanol puede afectar el metabolismo de lípidos, y da como resultado el inicio de un hígado graso. Los hidrógenos equivalentes que se obtienen durante la oxidación del etanol son transferidos, dentro de la mitocondria y esto puede afectar la oxidación de los ácidos grasos. Bajo condiciones normales los ácidos grasos son oxidados por la β -oxidación mitocondrial y por el ciclo del ácido cítrico, también presente en

mitocondria. Después de la administración de etanol, la actividad del ciclo del ácido cítrico disminuye parcialmente debido a la deficiencia en NAD⁺. Al introducirse los hidrógenos producidos por la oxidación del etanol a la mitocondria, estos se utilizan en vez de los producidos por el ciclo del ácido cítrico, que se obtienen a partir de la oxidación de dos carbonos derivados de ácidos grasos. Por lo tanto, los ácidos grasos utilizados para obtención de energía, que se lleva a cabo normalmente en el hígado, son reemplazados por el etanol (Lieber,1984). Entonces, estas alteraciones son la causa probable de que la grasa proveniente de la dieta y de fuentes endógenas se comience a depositar en el hígado, siendo una de las primeras causas de la formación del hígado graso (Lieber,1984).

1.2.3 Metabolismo de proteínas.

Cuando el etanol se administra a ratas en dosis aguda, se produce una rápida disminución en la concentración de la mayoría de los aminoácidos del plasma (Eriksson et al,1980) lo que también ha sido observado en el hombre (Eriksson et al,1983). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual ocurre esto no está claro. En estudios realizados *in vivo* se han obtenido resultados contradictorios acerca de este punto. En estudios *in vitro*, la síntesis de proteínas hepáticas decrece en exposiciones agudas de etanol. El mecanismo propuesto para este decremento incluye: disminución en el cociente RNA/DNA, disgregación de polisomas, producción de acetaldehído, generación excesiva de equivalentes reducidos, cambios en la actividad específica

de los precursores de síntesis de proteínas y deterioro en la secreción de proteínas (Girbes et al, 1983;Thalia et al, 1983).

1.2.4 Lipoperoxidación.

Se considera que el etanol incrementa la lipoperoxidación de las membranas. Valenzuela et al (1980) han reportado niveles elevados de malondialdehído y dienos conjugados en membranas de células de animales sujetos a intoxicación aguda con etanol. Litov et al (1978) han sugerido que la lipoperoxidación podría ocurrir como resultado de la producción de aniones superóxido durante la transformación metabólica del etanol debida a la intervención del sistema oxidativo microsomal y del acetaldehído por la aldehído deshidrogenasa.

La mayor cantidad de superóxidos celulares son producidos en la mitocondria, ya que como consecuencia de la ingesta aguda de etanol la función mitocondrial está alterada y por tanto se tiene una mayor cantidad de oxígeno disponible para ser utilizado por la superóxido dismutasa para la generación de peróxidos, lo que representa una proporción significativa del oxígeno utilizado por la cadena respiratoria (Nordmann,1992).

1.3 EFECTOS TOXICOS PRODUCIDOS POR EL ACETALDEHIDO

La concentración de ACH en los tejidos y en la circulación sanguínea después de una ingestión aguda de etanol es baja, aún en el hígado (Lindros et al, 1975), mientras que en casos de ingestiones

crónicas se ha podido determinar un incremento de este tóxico (Lieber,1984), lo que indica que podría existir un aumento en la producción de ACH a partir de la oxidación del etanol o bien una disminución del catabolismo del acetaldehído. Palmer et al (1985), han demostrado que la actividad de la ALDH 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 ACH es una molécula sumamente reactiva, y por tanto, su acumulación en el organismo después de la ingestión de alcohol puede producir muchas alteraciones patológicas (Salaspuro et al,1985). El incremento en la concentración de ACH asociado con la ingesta crónica del etanol puede reducir la actividad de varias rutas involucradas en la disposición de equivalentes reducidos (Lieber,1984) y esto a su vez, podría resultar en una disminución del metabolismo de ACH. Esto es, el ACH puede causar disfunción de la mitocondria lo que provoca la elevación de los niveles del tóxico y por tanto el aumento en el daño mitocondrial y la alteración del funcionamiento hepático.

Por microscopía electrónica de transmisión de muestras de hígados de individuos alcohólicos, se ha observado alteraciones mitocondriales como son hinchamiento y daño en la matriz, lo que se ha relacionado con cambios funcionales tales como decremento en la oxidación de ácidos grasos y del metabolismo del ACH (Hasumura et al,1976). En ratas intoxicadas crónicamente con etanol la disminución en la oxidación del ACH puede ser relacionada con la reducción en el contenido de citocromo a y b (Koch et al,1977) y de la actividad de la

succinato deshidrogenasa presente en la membrana interna mitocondrial (Oudea et al,1970). Cederbraum et al (1974) consideran que estos efectos se pueden deber a la combinación del efecto tóxico conjunto del etanol y el ACH. por otra parte, la fosforilación oxidativa sufre efectos similares con el ACH a los encontrados con un tratamiento crónico con etanol. En tanto que las mitocondrias hepáticas son más susceptibles a la acción del ACH después de una ingestión crónica con etanol.

Los cambios funcionales asociados directamente con el etanol han sido atribuidos a efectos del tóxico sobre la membrana mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo por el cual el etanol y el ACH alteran la estructura y función de la membrana de la mitocondria no ha sido claramente definido. Shaw et al (1983) han reportado que el ACH establece uniones hemiacetal con la cisteína y el glutatión, disminuyendo la cantidad de glutatión disponible para la protección celular frente a radicales libres, los que a su vez aumentan considerablemente con la ingesta crónica del etanol como consecuencia de la inducción del MEOS.

Tuma et al (1984) han propuesto que el ACH actúa a nivel molecular reaccionando con grupos nucleofílicos presentes en proteínas, alterando de esta manera su estructura y función. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que las proteínas pueden ser modificadas por el ACH, a través de un ataque nucleofílico, originando complejos tanto estables como inestables. Los nucleófilos más estudiados capaces de formar complejos con el ACH son los grupos α -

amino terminales de péptidos y proteínas y ϵ -amino en la cadena lateral de residuos de lisina (Gidley et al,1981).

En estudios realizados incubando trozos de hígado o microsomas hepáticos con etanol radiactivo se detectaron uniones covalentes entre moléculas residuales de etanol y proteínas hepáticas (Medina et al, 1985; Nomura et al, 1981). En este proceso ha sido implicado el ACH, ya que éste es capaz de unirse a un gran número de proteínas aisladas (Donohue et al,1983; Tuma et al,1991). Las proteínas modificadas por el acetaldehído han sido encontradas tanto en células de animales experimentales, como en humanos que han ingerido etanol (Lin et al,1988; Niemela et al,1990). Worrall et al (1990) han reportado que las proteínas unidas al ACH pueden actuar como neoantígenos y estos promover una respuesta inmunológica. Por tanto, se considera que el ACH juega un papel importante en la toxicidad del etanol ya que se ha probado que interfiere con algunas funciones enzimáticas y celulares (Sorrell et al,1978) , así como también se ha reportado que decrece la reparación del DNA y genera radicales libres que traen como consecuencia alteración de las membranas celulares (Lieber,1988).

1.4 IMPORTANCIA DE ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

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 preguntas a nivel celular. Para poder estudiar las alteraciones producidas a nivel celular, los sistemas celulares *in vitro* constituyen un buen modelo de estudio

ya que la respuesta que se obtiene es directa, sin interferencia de otros procesos homeostáticos que se presentarían en el animal completo. Se ha determinado que algunos sistemas celulares *in vitro* mantienen tanto la morfología como las funciones específicas, como es el caso de los hepatocitos (Gómez-Lechón et al,1990) lo que valida la utilización de este tipo de sistemas. Diversos investigadores han utilizado estos sistemas como una alternativa en los trabajos experimentales cuyo objetivo es estudiar los efectos a nivel celular de algunas sustancias tóxicas (Donato et al ,1991). Entre los modelos *in vitro* a nivel celular están: 1) Hepatocitos aislados, mantenidos en suspensión, 2) Cultivos primarios y 3) 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 y debido al estrés que sufren durante el aislamiento, algunas de sus funciones se alteran severamente, no teniendo la seguridad de si el efecto observado por la presencia del 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, por lo que han sido utilizados para evaluar el potencial tóxico de algunas sustancias y sus metabolitos (Kremers et al,1988). En ellos se han realizado, sobre todo, estudios de metabolismo de fármacos, ya que mantienen la actividad del sistema citocromo P-450. Sin embargo, estudios del efecto crónico de tóxicos

no pueden llevarse a cabo, ya que en un lapso de 7 a 10 días pierden las funciones hepatocelulares y empiezan a degenerar presentando cambios fenotípicos, desdiferenciación y disminución en su capacidad inicial para metabolizar los fármacos (Kremers et al,1994).

Aunque el empleo de líneas celulares es reciente, son un sistema *in vitro* que ha sido utilizado ampliamente. Algunas ventajas para considerarse como un excelente sistema modelo en el laboratorio son: facilidad de manejo, "inmortalidad", así como estabilidad fenotípica (Donato et al,1991). La línea celular WRL-68 obtenida a partir de hígado fetal humano normal presenta muchas de las funciones específicas del hígado, como son: morfología típica de hepatocitos, patrón de citoqueratinas específicas, secreción de albúmina y actividad de algunas enzimas características como GGT, ALAT y ASAT (Gutiérrez et al,1994). Por lo que se considera un buen sistema para estudiar los efectos tóxicos de sustancias químicas a nivel celular.

Cada uno de los sistemas utilizados en investigación presenta ventajas y desventajas para su uso. Sin embargo, la complejidad de un sistema *in vivo* hace imposible el poder evaluar el efecto tóxico del etanol y el acetaldehído a nivel celular. En cambio un sistema *in vitro*, como la línea celular WRL-68, nos puede permitir evaluar el daño producido por el etanol y la principal sustancia de su metabolismo, el acetaldehído, a nivel celular.

2.- OBJETIVO.

Evaluar las alteraciones producidas por el etanol y el acetaldehído en un tratamiento agudo de manera independiente, sobre un sistema modelo *in vitro* como son las células WRL-68 (células hepáticas de origen fetal humano).

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular WRL-68, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio utilizado para el cultivo fue Medio Modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) de Sigma, al cual se le adicionó suero de ternera suplementado con Fe (8%) (Hyclone), aminoácidos no esenciales (1%) (Microlab), piruvato de sodio (1%) (Microlab) y 100 U/ml de penicilina con 100 µg/ml de estreptomicina (Microlab). Al medio así preparado lo denominaremos en lo sucesivo medio normal. Las células se sembraron en botellas de plástico estériles para cultivo (Costar), con medio normal y se mantuvieron en una incubadora a 37°C de temperatura , bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. El medio de cultivo se cambio cada tercer día y cada 5 días las células se levantaron de la caja de cultivo utilizando una solución tripsina-verseno al 0.025% (Microlab) y se resembraron a una dilución de entre 1:3 a 1:6. Todos los experimentos se realizaron después de 24 h de resembradas las células, cuando el cultivo presentaba fase logarítmica de crecimiento.

3.2 VIABILIDAD CELULAR CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACETALDEHÍDO Y ETANOL.

En multicámaras de cuatro pozos (Nunc) se sembraron 40,000

células / pozo con medio normal, incubándolas a 37°C y 90% de humedad con una atmósfera de 5% de CO₂. A las 24 h se cambió este medio por uno que contenía disuelto las distintas concentraciones de acetaldehído (0,1,5,10,15 y 20 mM), se selló perfectamente cada multicámara utilizando película plástica (Parafilm) y se incubaron a distintos tiempos (30,60,120,180 y 240min). Al final de cada uno de los tiempos las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.4. Para determinar la viabilidad celular se agregó una solución de azul de tripano a una concentración final del 0.2% disuelto en cloruro de sodio al 0.9%. Posteriormente se contaron mediante un hemocitómetro, las células que no incluyeron el colorante y que al microscopio óptico se observaban refringentes. Para determinar la viabilidad de las células en presencia del etanol se siguió el mismo procedimiento, utilizando concentraciones de etanol (0,10, 50, 100,150 y 200 mM).

3.3 CONDICIONES DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS.

El acetaldehído y el etanol se disolvieron de manera independiente en el medio de cultivo normal. El acetaldehído a una concentración de 10 mM y el etanol a 200 mM. Estas soluciones se prepararon siempre previamente a ser utilizadas para evitar la variación de la concentración, ya que son sustancias que se evaporan fácilmente. El tiempo de exposición de las células a estas soluciones fue de 2 h, siendo incubadas bajo las condiciones antes mencionadas.

3.4 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTO CON ACETALDEHÍDO Y ETANOL.

Se sembraron 60,000 células / pozo en multicámaras de cuatro pozos en medio normal. 24 h después, el medio de cultivo fue reemplazado por los medios correspondientes a los tratamientos con acetaldehído ó con etanol. En una tercera multicámara, se cambió el medio por medio normal. Las multicámaras fueron selladas con película plástica. A las dos horas de exposición, las células se lavaron con solución de PBS, se agregó medio normal y se dejaron crecer durante 24 y 48 h. Pasado este tiempo las células se lavaron con solución de PBS y se despegaron del sustrato de la caja utilizando tripsina-verseno. Las células así obtenidas se suspendieron en 1ml de PBS y se contaron en un contador automático (Coulter Counter).

3.5 CAPACIDAD ADHESIVA, DE LAS CÉLULAS, AL SUSTRATO.

3.5.1 Facilidad para despegarse del sustrato después de su exposición a los tóxicos.

Se sembraron 500,000 células en cajas Petri de 3 cm de diámetro, con medio normal. A las 24 h se cambió este medio por medio que contenía los tóxicos a las concentraciones ya establecidas. Pasadas las dos horas de exposición las células se lavaron con solución de PBS y se adicionaron 300 μ l de tripsina para despegarlas

del sustrato de la caja. A cada minuto se colectaron las células contenidas en el volumen total de tripsina y se agregó nuevamente tripsina. Este procedimiento se siguió hasta que se despegó el total de las células. En cada volumen tomado se contaron las células utilizando el contador automático.

3.5.2 Facilidad para adherirse al sustrato después de su exposición a los tóxicos.

Se sembraron 500,000 células en cajas de Petri de 3 cm de diámetro, con medio normal. A las 24 h se cambió esta solución por los medios que contenían 200 mM de etanol ó 10 mM de acetaldehído. A las dos horas, las células se lavaron con solución de PBS y se adicionó tripsina para despegarlas del sustrato. Las células se resembraron en cajas de Petri nuevas, con medio de cultivo normal y se mantuvieron bajo condiciones de cultivo. Una hora después las células que aún permanecían sin adherirse al sustrato se contaron, para conocer el porcentaje de células adheridas y no adheridas al sustrato. De esta manera las células se contaron cada hora, durante seis horas y posteriormente a las 24 h. Las células fueron contadas en el contador automático.

3.6 MICROSCOPIA.

3.6.1 Microscopia óptica.

Las células se observaron diariamente utilizando un invertoscopio con contraste de fases (Zeiss), con el fin de observar el crecimiento y desarrollo de las células.

3.6.2 Microscopia electrónica de transmisión.

Se colocaron cubreobjetos de plástico (Termanox) estériles en multicámaras de cuatro pozos y sobre éstos se sembraron 80,000 células, se aplicaron los diferentes tratamientos y a las dos horas se les retiró el medio de cultivo. Para fijar las células se les agregó una solución de glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos pH 7.4 durante 15 min a 4°C de temperatura. Posteriormente se recambió la solución y se dejó otros 105 min. Al cabo de este tiempo se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, suplementado con sacarosa 0.25 M. La postfijación se hizo con OsO₄ al 20 % en amortiguador de fosfatos. Las muestras se deshidrataron con una serie gradual de concentraciones de etanol y se embebieron en Epon 812. La observación de las células se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 100B) en la Facultad de Medicina en el Dpto. de Biología Celular y Tisular de la UNAM.

3.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD .

3.7.1 Prueba de rojo neutro (RN).

La prueba de citotoxicidad de rojo neutro se realizó de acuerdo al método desarrollado por Borenfreud et al (1985), el cual se basa en la captación del rojo neutro por los lisosomas de las células. En cajas de cuatro pozos se sembraron 60,000 células / pozo y al cabo de 24 h se aplicaron los diferentes tratamientos. Concluido el período de exposición, tanto en las células control como las expuestas a los tratamientos, el medio fue sustituido por otro que contenía 40 µg de rojo neutro / ml, el cual había sido previamente incubado por 24 h a 37 °C y centrifugado por 10 min a 1500g para remover los cristales precipitados. Las cámaras conteniendo las células con los diferentes tratamientos fueron incubados con la solución de RN. Posteriormente, se retiró este medio y las células fueron lavadas rápidamente con una solución fijadora que contenía CaCl₂ al 1% y formaldehído al 0.5%. Se adicionaron 0.5 ml de una solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% para extraer el colorante. Las multicámaras conteniendo esta solución se agitaron por 10 min a temperatura ambiente, se tomó el volumen total en una celda de 800 µl de capacidad y se leyó el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 540 nm. El control que contenía células incubadas con medio normal, se utilizó como blanco para calibrar el espectrofotómetro.

3.7.2 Actividad extracelular de lactato deshidrogenasa (LDH).

La actividad extracelular de lactato deshidrogenasa se determinó por el método de Moldeus, et al (1978), el cual se basa en la oxidación de lactato en presencia de NAD^+ por acción de la LDH para formar piruvato y NADH_2 . La velocidad de aparición de NADH_2 se mide espectrofotométricamente en la región del ultravioleta cercano (340 nm). Se sembraron 200,000 células en cajas petrí de 3 cm de diámetro. Al término del tratamiento se tomó el medio de cultivo, se centrifugó a 1500 g por 10 min, se eliminó el botón y se utilizó el sobrenadante. La solución reactiva que contenía amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5, lactato de sodio 0.6 mM, NAD^+ 0.18 mM, se incubó a 37°C durante 2 min. En una celda espectrofotométrica se mezclaron 1 ml de solución reactiva y 0.050 ml del medio de cultivo para cada uno de los tratamientos y se determinó el cambio de absorbancia a 340 nm, tomando la lectura cada minuto durante 5 min. La actividad de la enzima se determinó en base a la relación:

$$\text{Actividad} = [(\Delta A_r / \Delta t) - (\Delta A_b / \Delta t)] \times [V_T / 6.22 \times d \times V_S]$$

donde, ΔA_r es el cambio en la absorbancia de la muestra, ΔA_b es el cambio en la absorbancia del blanco, Δt es la variación en el tiempo, V_T el volumen total en la cubeta, V_S el volumen del medio de cultivo y d el grosor de la cubeta. El 6.22 es una constante que nos indica la velocidad de oxidación del lactato a piruvato. Los resultados fueron expresados en $\text{U} / 10^6$ células.

3.7.3 Prueba de MTT .

La prueba de MTT se determinó por el método de Mosmann (1983), que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la mitocondria de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) soluble en agua (amarillo), a formazan (azul) insoluble en agua, lo que, de manera indirecta indica la integridad de la membrana interna mitocondrial. Se sembraron 50,000 células / pozo en multicámaras de cuatro pozos, al término del tratamiento las células se lavaron con solución de PBS y se les agregó una solución de 0.25 mg/ml de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37 °C y 90% de humedad. Pasado este periodo las células se lavaron con solución de PBS y se les agregó 800 µl de una solución de HCl 0.04 N en 2-isopropanol, por pozo durante 15 min, para disolver el formazan. Esta solución se centrifugó a 1500 g por 5 min y se determinó el cambio de absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer).

3.8 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

El grado de lipoperoxidación se determinó mediante el método de Buege, et al (1978), el cual se basa en la formación de malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. En botellas de 162 cm² fueron sembradas 20×10^6 células con medio normal. A las 24 h el medio fue reemplazado por los medios que contenían los tóxicos. Al finalizar las dos horas de exposición las células se lavaron con PBS, se rasparon con un gendarme de goma para despegarlas de la botella de

cultivo y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Con el fin de romper las células, esta suspensión se colocó en un sonicador ultrasónico (XL, Heat Systems) con una micropunta, donde se aplicaron 3 series de 20 pulsaciones / s durante 5 segundos con una potencia de 130 watts, con descanso de 1 segundo entre cada serie. De esta suspensión se tomó 0.2 ml para determinar proteína y al resto se le adicionó 2 ml de una solución reactiva de ácido tricloroacético (TCA) al 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N. Las muestras se agitaron vigorosamente y después se incubaron en baño de agua a 100°C durante 25 min. Se dejaron enfriar y se centrifugaron a 3500 g por 10 min y fue leída la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en el espectrofotómetro. La concentración de MDA se determinó mediante la siguiente relación:

$$C = A / E I$$

donde **C** es la concentración de MDA, **A** es la absorbancia, **E** es el coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5 / \text{cm M}$) y **I** es el grosor de la celda. Los resultados se expresaron en nmol de MDA por mg de proteína.

3.9 DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.

Se sembraron 8×10^6 células en botellas de 75 cm². Después de 24h se aplicaron los diferentes tratamientos y al finalizar el tiempo de exposición las células se lavaron con solución de PBS. Se

despegaron del sustrato de la botella de cultivo, utilizando tripsina- verseno y se resuspendieron en 3 ml de PBS. El volumen total se fraccionó en tres partes iguales y cada alicuota se llevó a 3 ml de volumen final, con PBS. La muestra se colocó en la celda de un oxímetro (YSI modelo 5300) donde se introdujo el electrodo para oxígeno y los datos se registraron mediante un graficador. De la pendiente de la gráfica se obtuvo el consumo de oxígeno en nanoátomos de O /min. El electrodo fue previamente calibrado con una solución 0.01 M de ditionita de sodio.

3.10 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILOS (SH).

Para determinar la cantidad de grupos sulfhidrilos (SH), se utilizó la técnica de Tietze (1969), con el reactivo de Ellman la cual se basa en la reducción del 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) en presencia de grupos SH, dando como resultado una coloración amarilla. Se sembraron 200,000 células en botellas de cultivo de 25 cm² y medio normal, a las 24 h se cambio el medio por otro que contenía acetaldehído ó etanol. Al finalizar el tratamiento se lavaron las células con PBS. Mediante un gendarme de goma las células se despegaron y se resuspendieron en 500 µl de PBS. De este volumen se tomó una alícuota de 0.1 µl para determinar proteína, el resto se dividió en dos partes, una de ellas para determinar los grupos SH-totales y la otra para determinar tanto los grupos SH-solubles (glutación) como los SH-proteicos. La primera se solubilizó en buffer de TRIS 0.2 M - EDTA 0.02

M suplementado con dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 1% pH 8.2. Se tomó una alícuota de 100 μ l, se le agregaron 700 μ l de buffer de fosfatos (0.1 M) a pH 7.5 y 50 μ l de DTNB para finalmente llevar esta solución a un espectrofotómetro donde se leyó el cambio de absorbancia a 412 nm. A la segunda parte se le agregaron 200 μ l de ácido sulfosalicílico al 4% a 4°C y se dejó toda la noche en el refrigerador a 4°C para precipitar las proteínas. Posteriormente se centrifugó a 3000 g / 10 min, se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se agregaron en una celda semimicro del espectrofotómetro junto con 700 μ l de la solución buffer de fosfatos y 50 μ l de la solución de DTNB. La solución se agitó y al cabo de 10 min se leyó la absorbancia a 412 nm para determinar los SH-solubles (glutación). El botón del centrifugado se disolvió en 200 μ l de la solución buffer de TRIS. Se completó el volumen a 800 μ l con la solución de fosfatos y se agregó 50 μ l de la solución de DTNB para determinar los SH-proteicos. La cuantificación de los grupos SH se realizó en base a una curva estándar de GSH. Los resultados fueron expresados en nmol de SH / mg de proteína.

3.11 CONTENIDO DE PROTEÍNA.

El contenido de proteína en las células , se determinó en base al método de Lowry, et al (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 %. (sol. A) y otra con sulfato de cobre al 0.5% (sol.B), se mezclaron tomando 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B para

obtener una solución a la que llamamos solución C. A una alícuota de la muestra se le adicionaron 5 ml de la solución C y 0.5 ml de folín 1N y se dejó incubar a temperatura ambiente por un lapso de tiempo de 45 a 60 min. Posteriormente, se leyó el cambio de absorbancia a 660 nm. Para determinar la concentración de proteína de las muestras problema se utilizó una curva estándar con albumina de bovino.

3.12 PROCEDENCIA DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.

La línea celular fue obtenida de la American Type Culture Collection ATCC (Rockville, Maryland, USA). Las cajas y multicámaras para el cultivo se adquirieron de Costar (Cambridge M.A., USA). El suero de ternera bovino fue adquirido de Hyclone (Logan, Utha. USA). El piruvato de sodio, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina de Microlab (México, D.F). Todos los reactivos químicos y bioquímicos utilizados fueron de grado analítico, de alta pureza, de los laboratorios Merck (Darmstadt, Alemania), Química Sigma (St. Louis MO, USA). El alcohol grado analítico fue bidestilado y conservado en refrigeración igual que el acetaldehído.

3.13 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE DATOS.

La prueba estadística utilizada fue una prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tukey. Se utilizó un nivel de significancia de $p \leq$

0.05. Los experimentos se realizaron tres veces de manera independiente y en cada caso por triplicado.

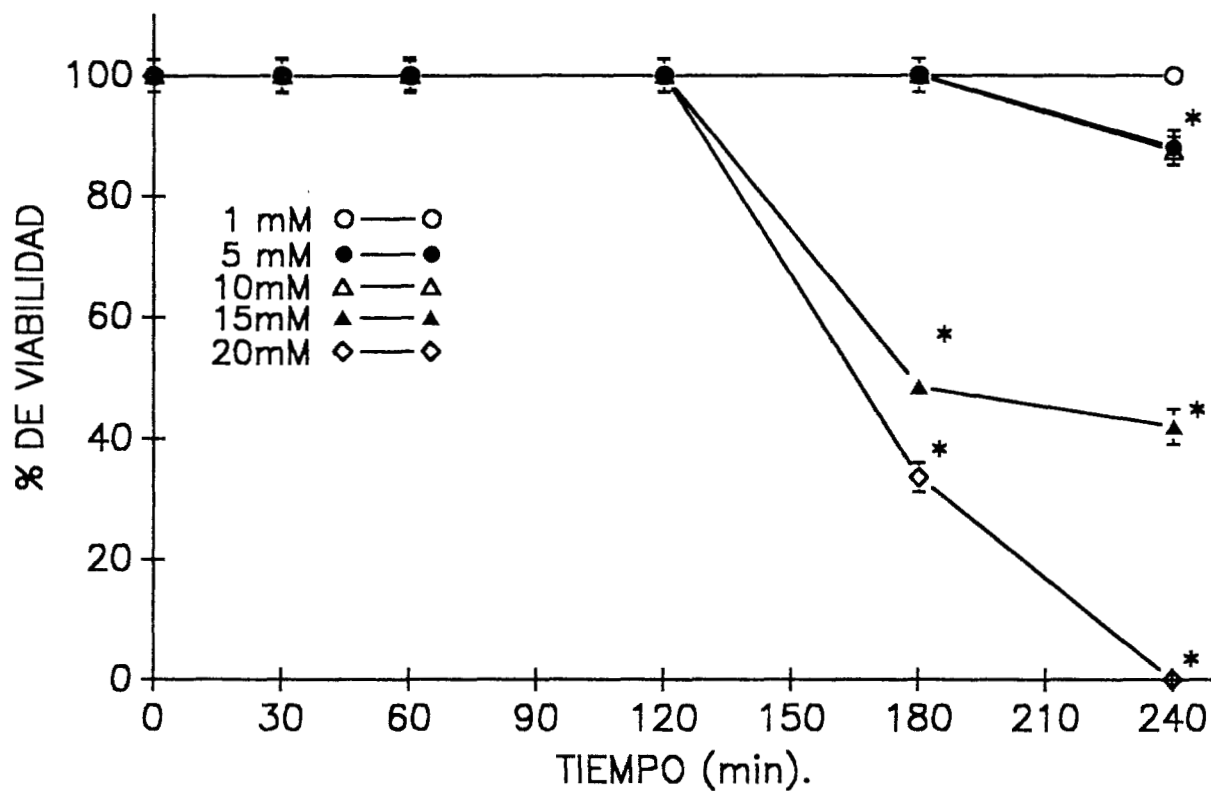
222864

4.- RESULTADOS

4.1 VIABILIDAD CELULAR CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACETALDEHIDO Y ETANOL.

Primero, se evaluó la viabilidad de las células en presencia del acetaldehído, ya que reportes en la literatura indican que es más tóxico que el etanol. En estudios donde se ha comparado el daño producido por etanol ó acetaldehído, la concentración que se utiliza de etanol es 10 a 20 veces más alta que en el caso del acetaldehído. En la figura 1 se muestra el porcentaje de viabilidad de las células en presencia del acetaldehído a diferentes concentraciones y distintos tiempos de exposición, con respecto a las células control donde no se aplicó ningún tóxico. Se observa que el comportamiento que presentaron las células fue dosis dependiente, ya que a medida que aumenta la concentración del tóxico aumenta la mortalidad. Con 10 mM no se apreció mortalidad mediante esta técnica, presentando las células una viabilidad igual al control (100%). Los datos de viabilidad graficados en la figura 1, también se muestran en la tabla I, donde, además del porcentaje de viabilidad se representa, mediante cruces, la existencia de alteraciones morfológicas al ser observadas al microscopio óptico a pesar de presentar 100% de viabilidad.

FIGURA 1 CURVA DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETALDEHIDO . CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (n=3)



*Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control

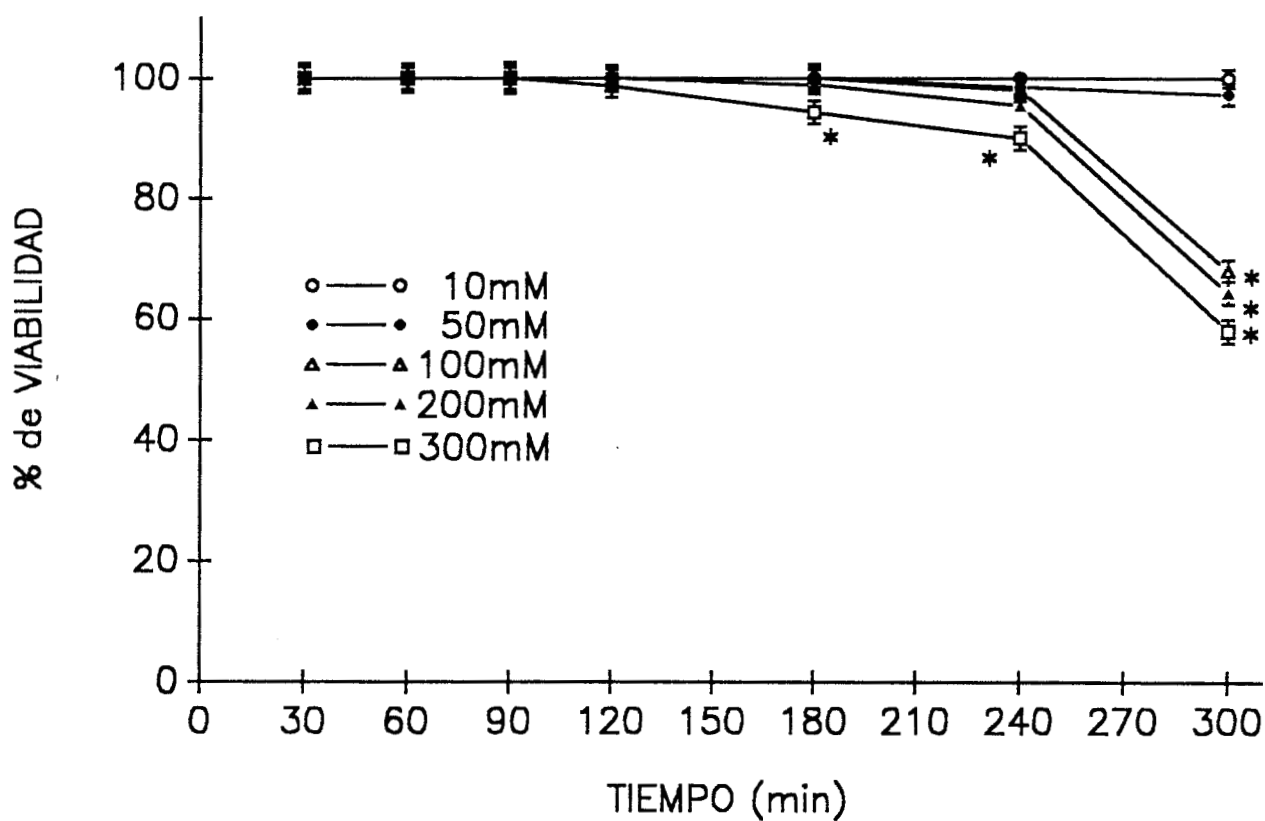
TABLA 1.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE CÉLULAS EXPUESTAS A
ACETALDEHÍDO.

TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mM)				
	1.0	5.0	10.0	15.0	20.0
30	100	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100
120	100	100	100	100 +	100 + +
180	100	100	100 +	48.5 +	35.5 +
240	100	88	87.5	42 + +	0.0

Cada cifra representa el valor promedio de tres repeticiones.

En esta tabla se puede observar que en el tratamiento con 15mM de acetaldehído durante 120 min de exposición, a pesar que se obtuvo un 100% de viabilidad de las células, al observarse al microscopio óptico, no todas las células presentaban forma redonda, ni se veían refringentes. Igual ocurrió con las células expuestas a 10 mM durante 180 min, en cambio a concentraciones de 10 mM y 120 min de exposición las células presentaron 100% de viabilidad y no se apreciaron alteraciones morfológicas. El porcentaje de viabilidad en el caso de la exposición de las células al etanol se presenta en la figura 2. Se observa un comportamiento dosis dependiente, donde la viabilidad comienza a disminuir a partir de 100 mM de etanol y 240 min de exposición al tóxico. Llegando a un mínimo de 67% de viabilidad con respecto al control a dosis de

FIGURA 2 CURVA DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



*Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

300 mM y 300 min de exposición. En la tabla 2, al igual que en el caso del acetaldehído, se presenta el porcentaje de viabilidad de las células y mediante pequeñas cruces se señala la apreciación del estado de las células por observaciones al microscopio óptico. Se puede observar en esta tabla que al igual que con el acetaldehído hubo condiciones en las que a pesar de tener 100% de viabilidad las células presentaban alteraciones morfológicas como es el caso de 200 mM con 180 min de exposición y 300 mM con 120 min de exposición. En cambio con 200 mM durante 120 min de exposición no se observó daño morfológico en las células.

TABLA 2.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE CÉLULAS EXPUESTAS A ETANOL.

TIEMPO(min)	CONCENTRACIÓN (mM)				
	10	50	100	200	300
30	100	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100
120	100	100	100	100	100++
180	100	100	100	100++	35.5+
240	100	100	99.8	98.7	94.3
300	100	98.0	96.0	85.0	67.1

Cada cifra representa el valor promedio de tres repeticiones.

Considerando que el objetivo del presente trabajo era evaluar el efecto tóxico de cada solvente a nivel celular, era necesario

encontrar las dosis que nos permitieran detectar el daño tóxico sin que se produjera la muerte celular, así mismo se requerían tiempos cortos de exposición de tal manera que las células no tuvieran tiempo de adaptarse a estas condiciones adversas y traslapar el efecto tóxico con la respuesta celular. En base a estos criterios, los tratamientos elegidos fueron: 10 mM para el acetaldehído y 200 mM para el etanol con un periodo de exposición de 120 min.

4.2 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DE APLICADOS LOS TRATAMIENTOS CON ACETALDEHÍDO Y ETANOL.

En la tabla 3 se presenta la capacidad de proliferación de las células después de aplicados los tratamientos. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación de las células expuestas al acetaldehído o al etanol con respecto al grupo control.

TABLA 3.- CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DE QUE SE APLICARON LOS TÓXICOS POR DOS HORAS.

TRATAMIENTO	A LAS 24 H	A LAS 48 H
ETANOL	100 %	100 %
ACETALDEHÍDO	49 %	30 %

Cada cifra representa el valor promedio de tres repeticiones.

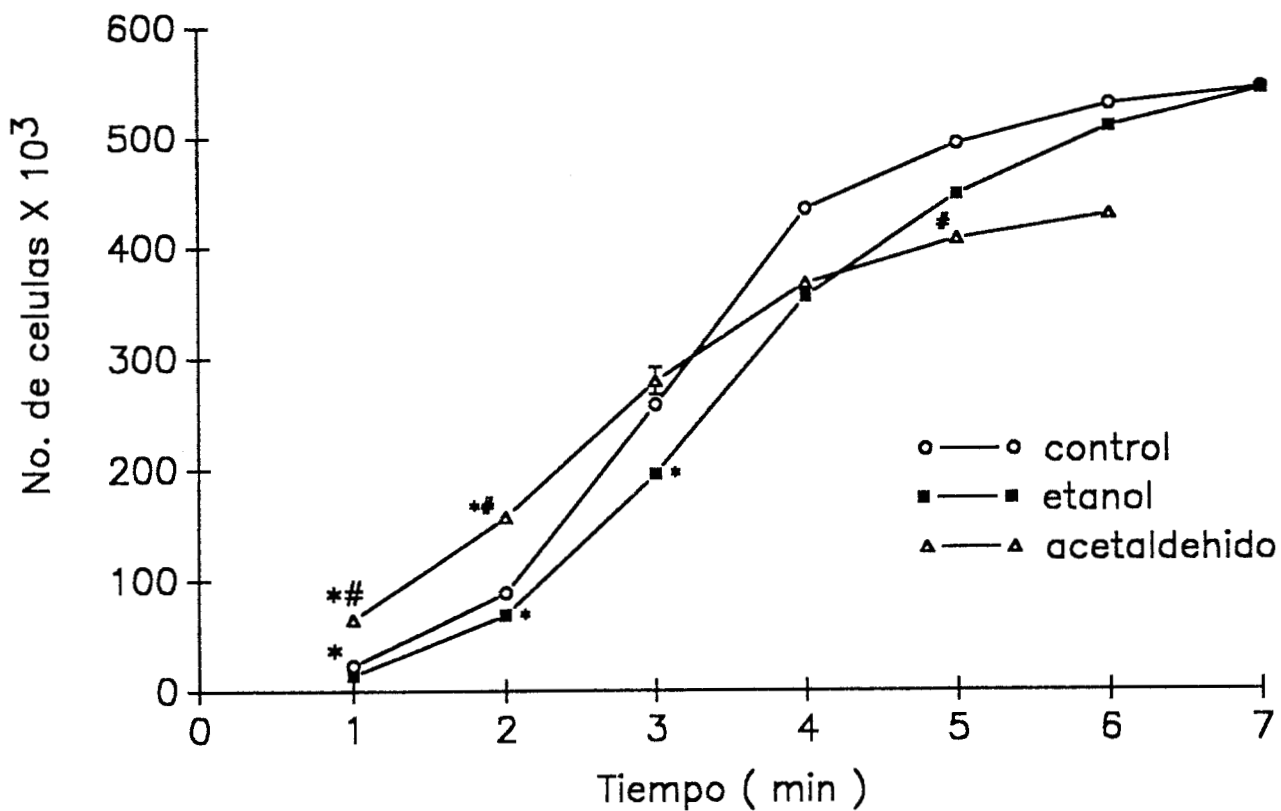
Se observa que a las 24 h las células tratadas con etanol presentaron un porcentaje de proliferación igual que en las células

control, en cambio en las células tratadas con acetaldehído la proliferación disminuyó, presentando un 49% del valor de la proliferación con respecto a las células control. Esto se hace más evidente a las 48 h donde la proliferación en células tratadas con acetaldehído disminuyó a un 30% con respecto al control, en cambio las células que estuvieron expuestas al etanol no sufrieron ninguna alteración en su capacidad proliferativa.

4.3 CAPACIDAD ADHESIVA DE LAS CÉLULAS AL SUSTRATO .

La capacidad de las células para adherirse al sustrato se determinó de dos maneras diferentes; una de ellas, mediante el tiempo que tardaron las células en despegarse del sustrato al aplicar tripsina, después de ser expuestas a los tóxicos y la otra, despegando las células y resembrándolas, para determinar su capacidad de volver a adherirse a la caja. En la figura 3 se grafican los resultados de las células que se despegaron con la tripsina después de haber estado expuestas a los tóxicos. Estos resultados se expresan como el número de células despegadas con respecto al tiempo. Se observa que el comportamiento de las células tratadas con etanol fue parecido al del grupo control, en cambio, las que estuvieron expuestas al acetaldehído se despegaron más fácilmente después de su exposición al tóxico. También observamos que el número total de células se terminó de despegar un minuto antes en

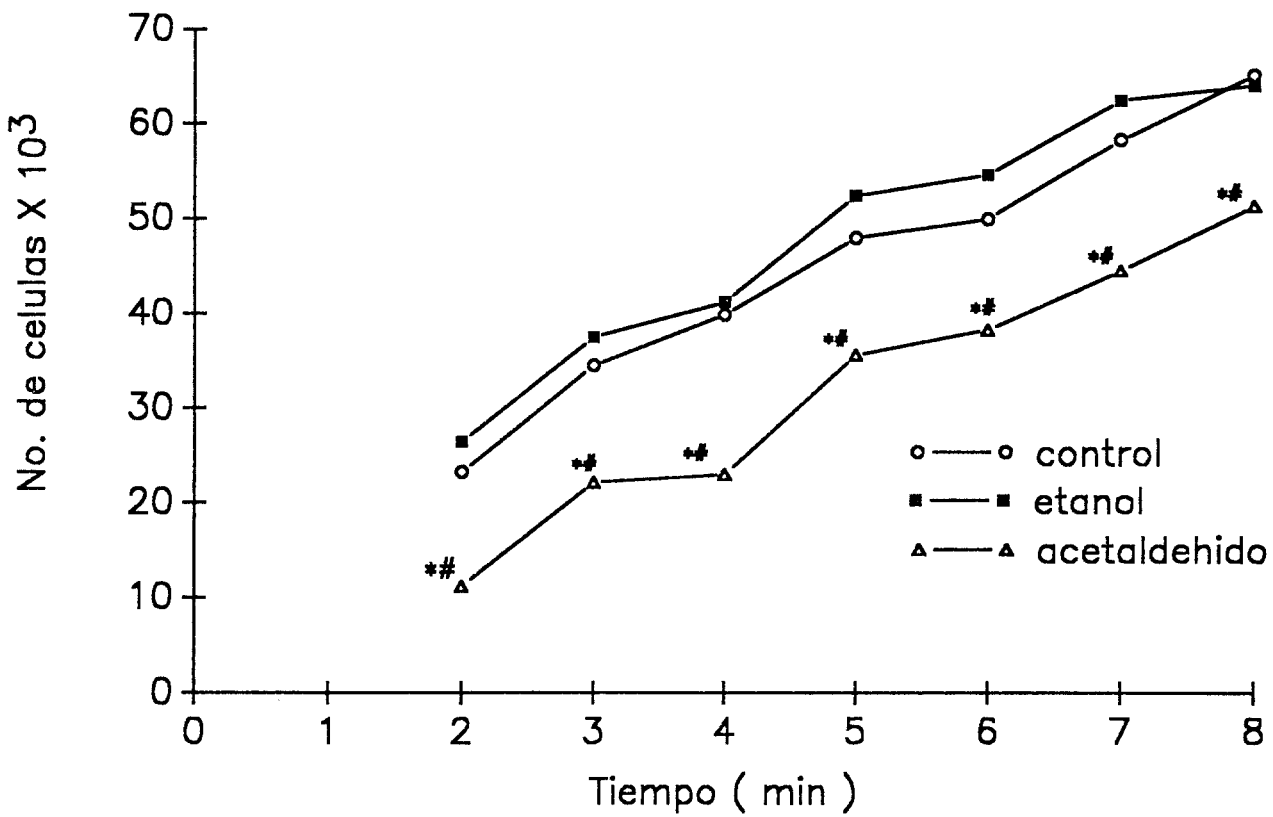
FIGURA 3 FACILIDAD DE LAS CÉLULAS PARA DESPEGARSE DEL SUSTRATO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON ETANOL (200 MM) Ó ACETALDEHIDO (10MM), POR 2H. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehido.

FIGURA 4 CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS PARA VOLVERSE A PEGAR AL SUSTRATO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON ETANOL (200MM) Ó ACETALDEHIDO (10MM). CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehido.

el grupo con tratamiento para acetaldehído que las del grupo control o las células tratadas con etanol. En la figura 4 se presentan los resultados de las células que se pudieron volver a pegar después de haber estado en contacto con los tóxicos y de que se les agregó tripsina para despegarlas del sustrato. Los resultados se expresan como el número de células que se pegaron con respecto al tiempo. Se puede observar que el comportamiento de las células tratadas con etanol es muy parecido al grupo control, en cambio las que estuvieron en contacto con el acetaldehído presentan una curva más baja, en un 50% es decir que sólo la mitad de la población logró recuperarse para volverse a pegar a la superficie de la caja.

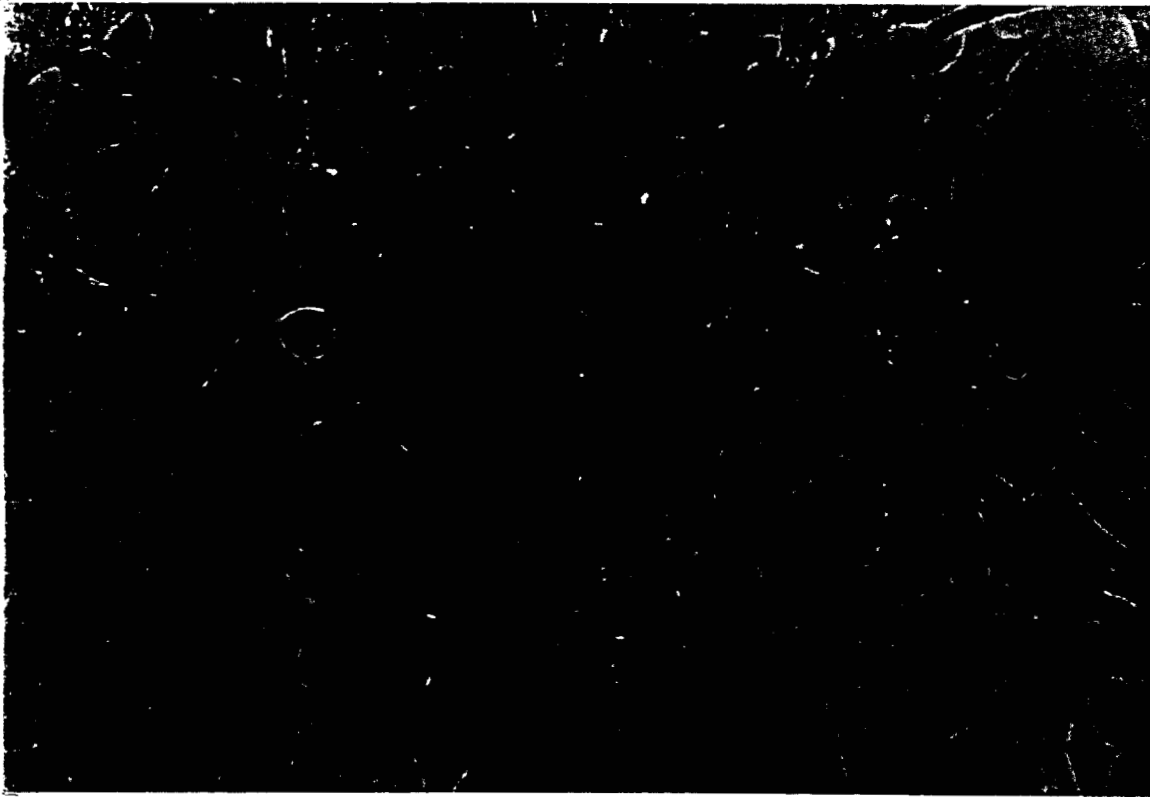
4.4 MICROSCOPIA .

En la figura 5 observamos las fotografías de las microscopias ópticas de las células. En del grupo control (A) se observan a las células de forma poligonal , alargadas, muchas de ellas binucleadas y su distribución en toda la superficie es uniforme. En las células con etanol (B) estas presentan la misma apariencia aunque se pueden observar una gran cantidad de dendritos celulares. En tanto que las células que fueron tratadas con acetaldehído (C) se contraen y pierden su apariencia alargada, observándose redondeadas. Se observa daño a nivel de membrana celular haciendo difícil observar los contornos celulares.

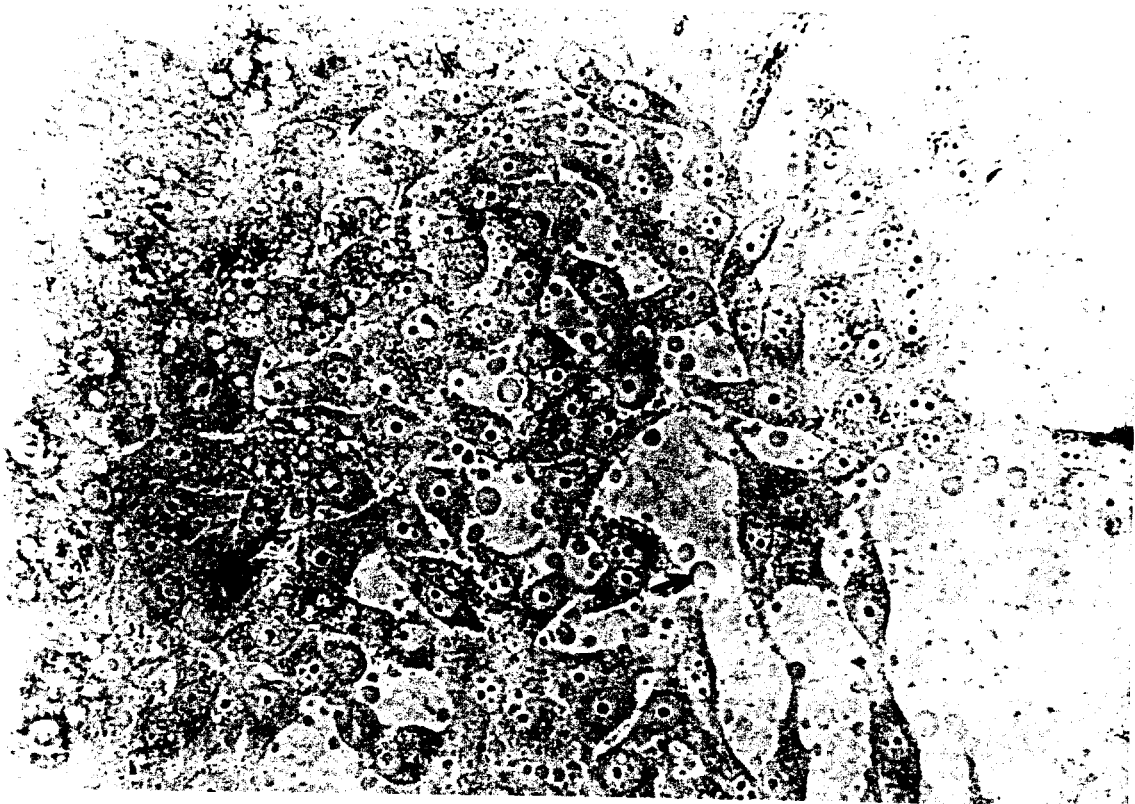
222864

FIGURA 5. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LAS CÉLULAS WRL-68. CÉLULAS CONTROL:
A (512X). CÉLULAS CON ETANOL: B (512X). CÉLULAS CON ACETALDEHIDO: C
(512X).

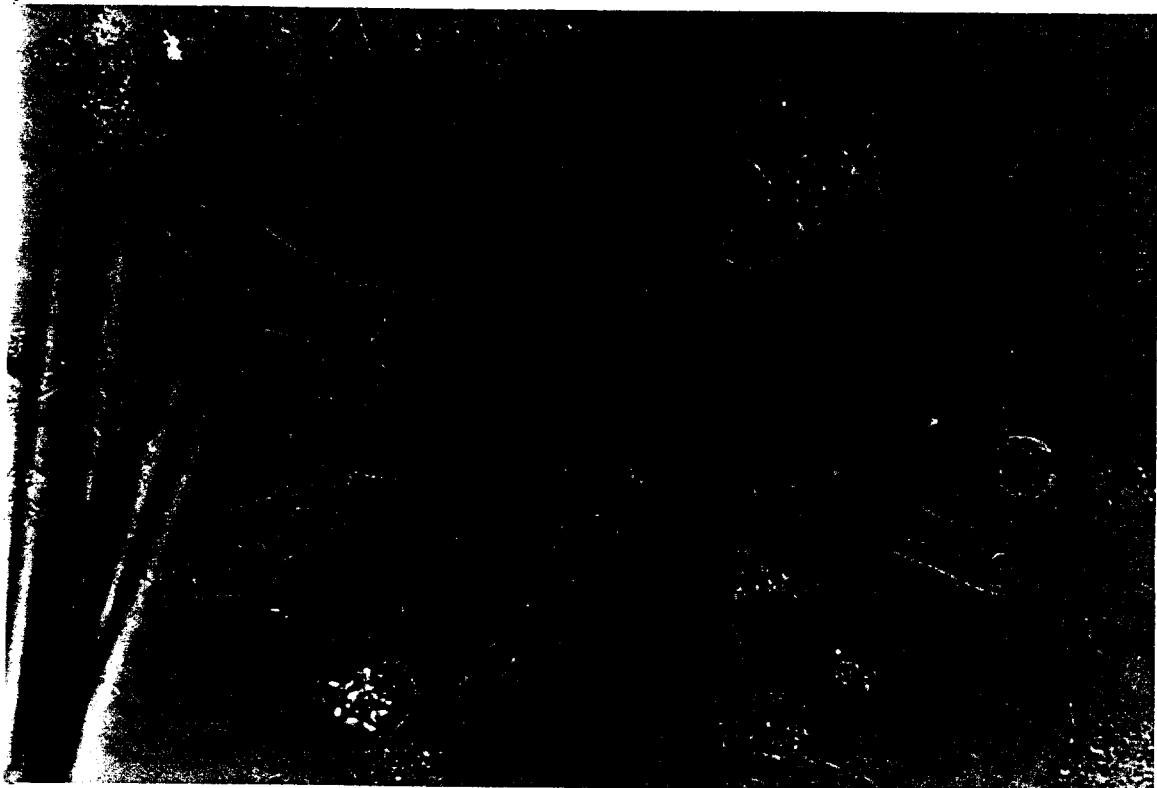
A



B



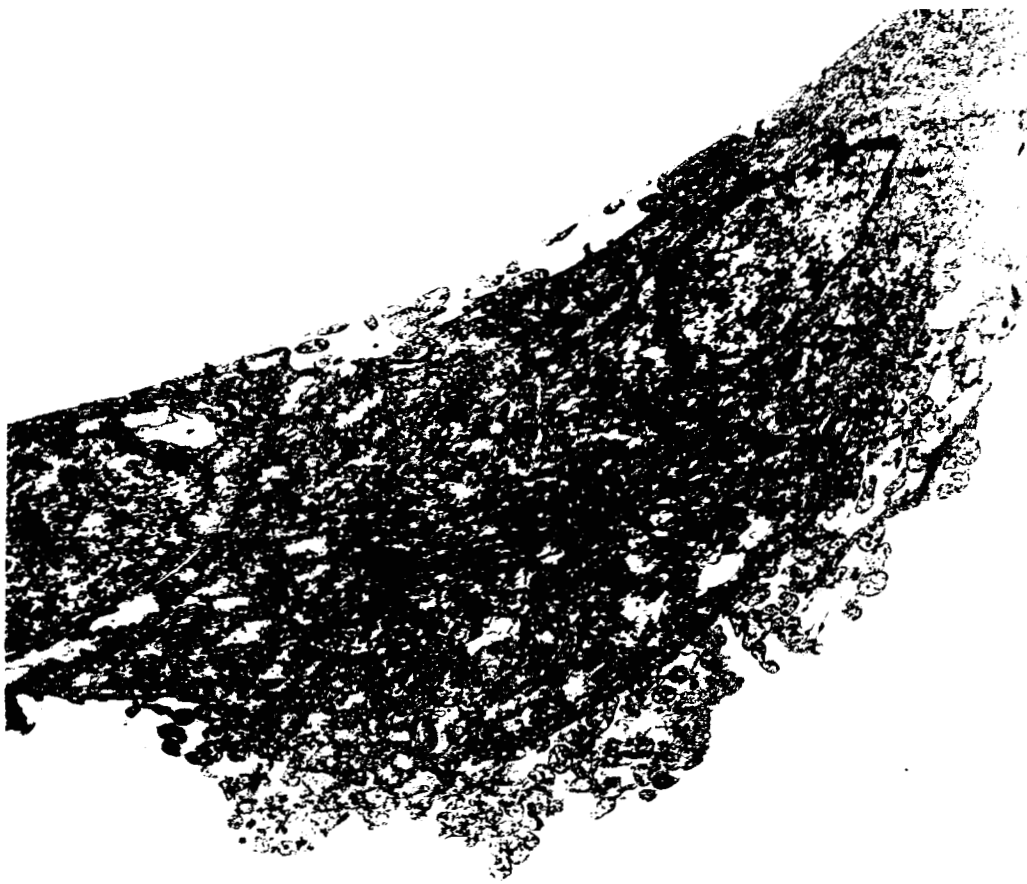
C



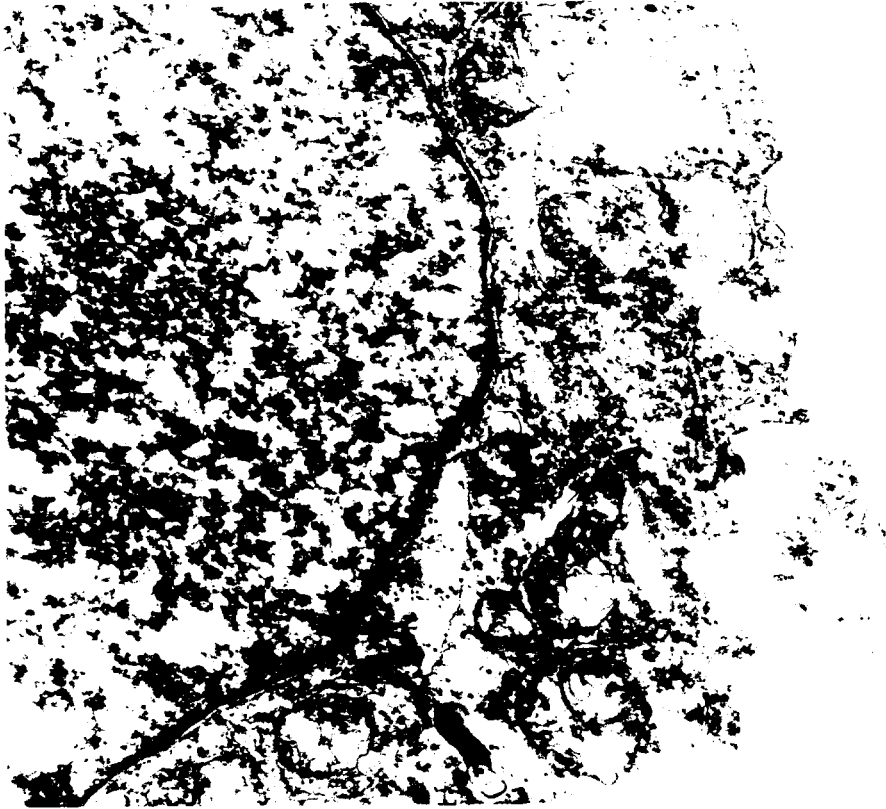
Los cambios ultraestructurales observados por microscopía electrónica de transmisión se muestran en la figura 6. En las células control (A) se aprecia la ultraestructura característica de las células en cultivo que han crecido sobre un sustrato rígido. El tamaño y forma del núcleo son característicos, así como los organelos intracitoplásmicos, las mitocondrias de tamaño y aspecto normal, presentan crestas bien definidas. Las células presentan una membrana plasmática con numerosas prolongaciones que sugieren actividad absorptiva. En cambio en las células que estuvieron en contacto con el etanol se aprecia gran cantidad de vacuolas con material residual. El retículo endoplásmico rugoso se observa desorganizado y con numerosos ribosomas libres (B,C). El núcleo presenta poca cromatina condensada, que se organiza en la superficie de la membrana interna (C). En el nucleolo se observa compactación del material interno (D). En las células tratadas con acetaldehído la membrana celular presenta gran cantidad de prolongaciones citoplásmicas (E) que sugieren cambios en la plasticidad de la misma, así como grandes zonas de acumulación de material granular (no caracterizado), tanto en el citosol como en el núcleo que parecen no estar vacuolizados. En (F) se observan algunos fagosomas secundarios con fragmentos celulares, incluso es posible observar residuos de estructuras que pertenecieron a una mitocondria. En (G) se observan grandes cuerpos residuales muy densos dentro del citosol.

FIGURA 6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LAS CÉLULAS WRL-68. CÉLULAS CONTROL: A (9240X). CÉLULAS CON ETANOL: B (25200X), C (25200X) Y D (25200X). CÉLULAS CON ACETALDEHIDO: E (9240X), F (14700X) Y G (25200X).

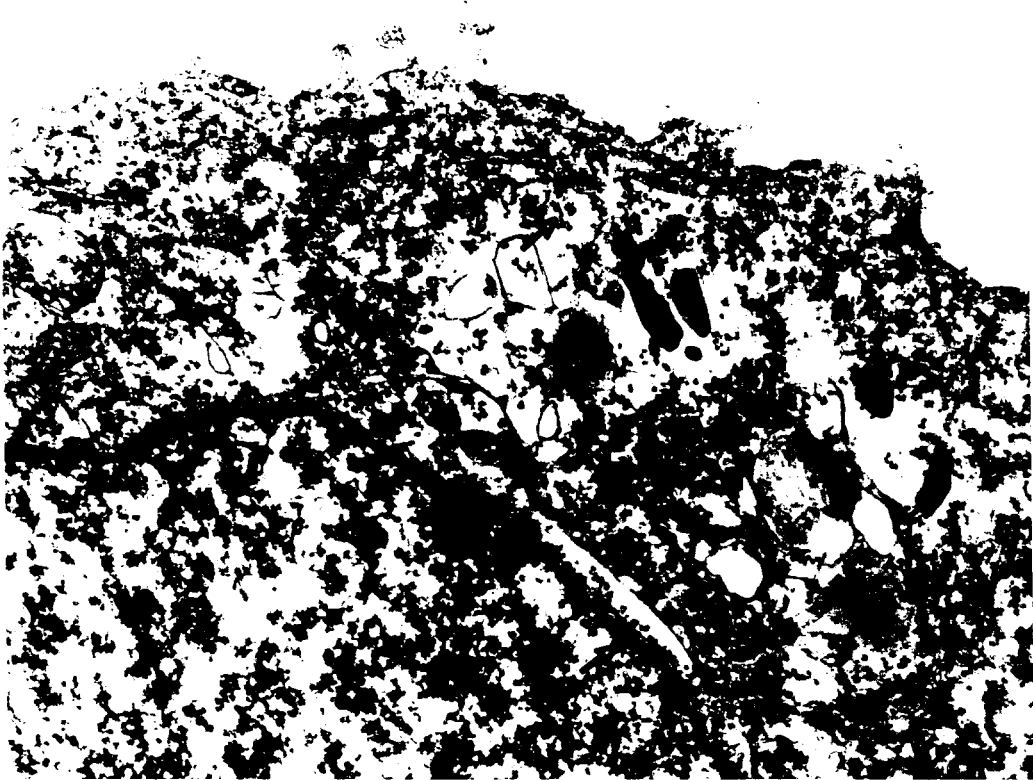
A



B



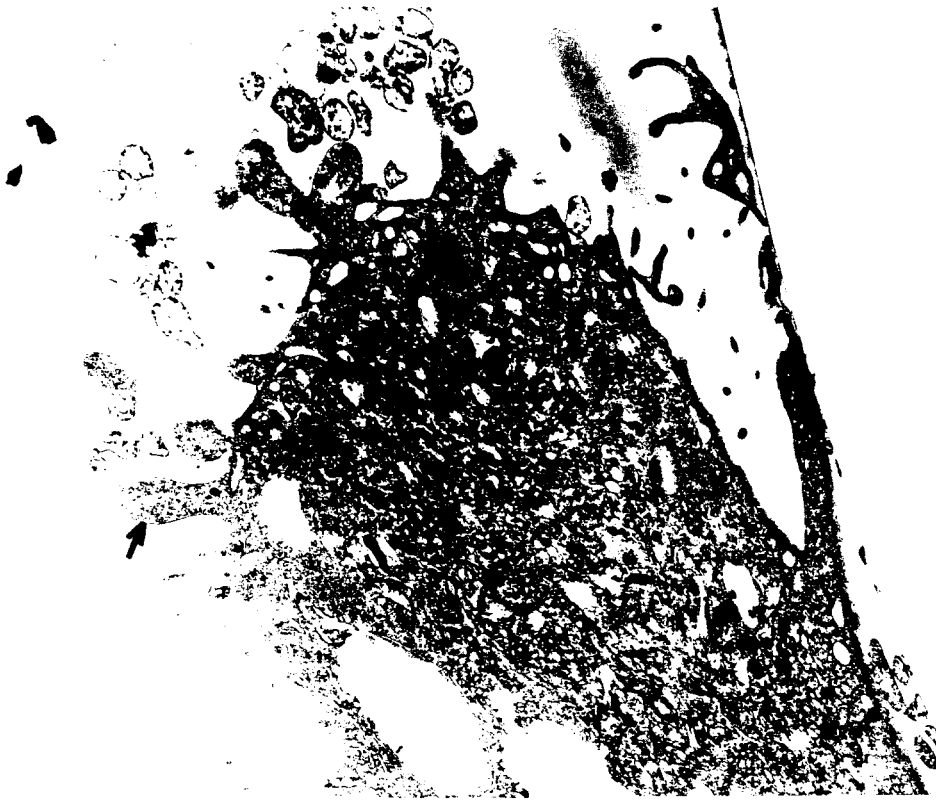
C



D



E



F





4.5 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.

Se determinaron varias pruebas consideradas como medidas de citotoxicidad, entre ellas la prueba con rojo neutro, que está relacionada con la cantidad de colorante absorbido por los lisosomas de las células. Se considera que cuanto más dañada se encuentra la célula menor es la cantidad de colorante que absorben los lisosomas. En la figura 7 se presentan los resultados de esta prueba expresados como porcentaje de la absorbancia con respecto al control. Se observa que la cantidad de rojo neutro captado por las células tratadas con etanol fue ligeramente menor (88.69%) respecto al control, mientras que en las células expuestas al acetaldehído la cantidad de colorante que se captó fue mucho menor (57.29%) respecto a las células donde no se aplicó ningún tóxico, por lo tanto este grupo presentó más daño que el de las células que estuvieron en contacto con el etanol.

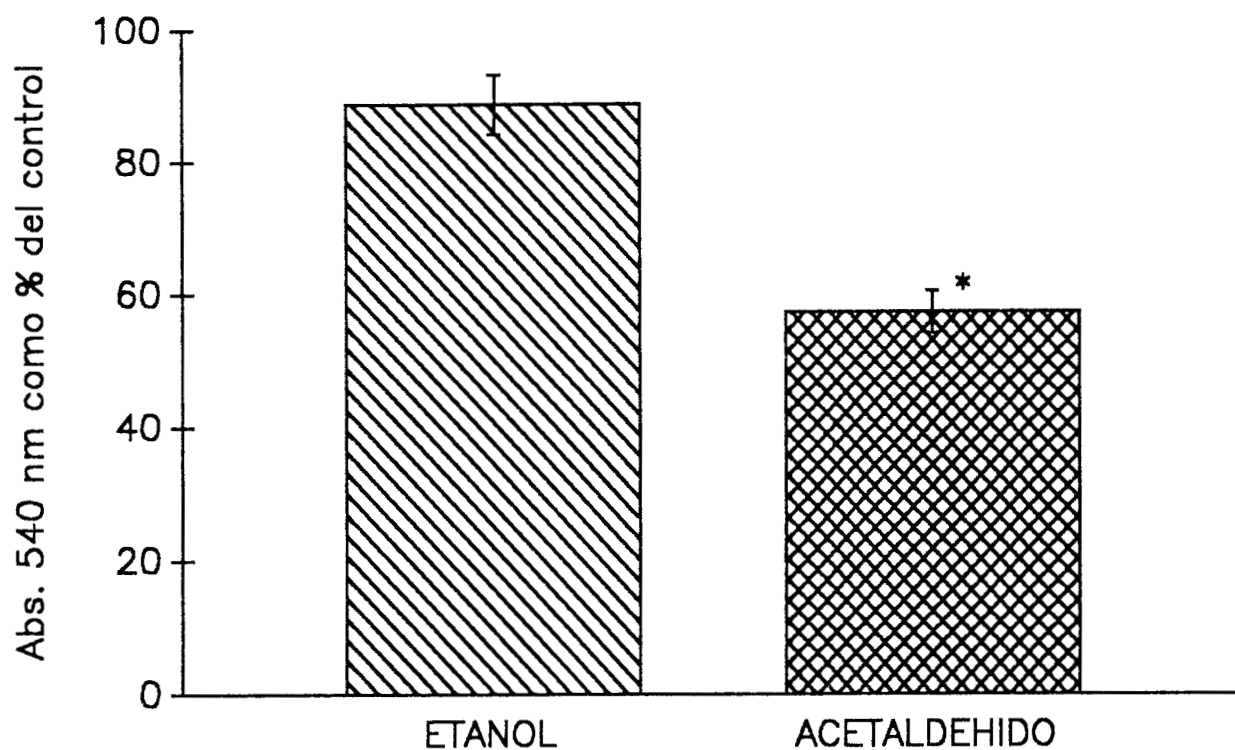
La prueba de actividad extracelular de lactato deshidrogenasa se basa en que la LDH es una enzima citosólica que se libera al medio de cultivo en caso de daño en la membrana celular. De tal manera que a mayor daño en la célula, mayor actividad de la enzima en el medio de cultivo. La actividad extracelular de lactato deshidrogenasa expresada como unidades de enzima por millón de células, que se determinó en el medio de cultivo se presenta en la figura 8. En células tratadas con etanol la actividad fue de 287.83

U/10⁶ células, lo que representa un 86.9% de incremento con respecto a las células control, mientras que en las células que estuvieron en presencia del acetaldehído solamente se obtuvo 228.73 U/10⁶ células, lo que representa un 48.52 % de incremento con respecto al grupo control. En base a estos datos podemos decir que la actividad extracelular de LDH es un parámetro más sensible para cuantificar la toxicidad producida por el etanol que por el acetaldehído.

En la figura 9 se presentan los resultados de la prueba de citotoxicidad con MTT. Esta prueba se basa en la capacidad que tiene la deshidrogenasa succínica de la mitocondria de reducir una sal de tetrazolium para producir formazan, de tal manera que a menor cantidad de formazan producido la célula se encuentra más dañada. Los resultados se expresan como porcentaje del cambio de absorbancia con respecto al que produce el formazan extraído de las células control. Se puede observar que en las células tratadas con etanol, la cantidad de formazan que se produjo fue del 66.13% respecto de la absorbancia registrada en el grupo control. En tanto que en las células que estuvieron en contacto con el acetaldehído, el formazan producido fue de solo el 37% del valor control. Esto nos indica que la funcionalidad mitocondrial de las células que han sido expuestas al acetaldehído ha sufrido mayor daño que la de aquellas que fueron tratadas con etanol.

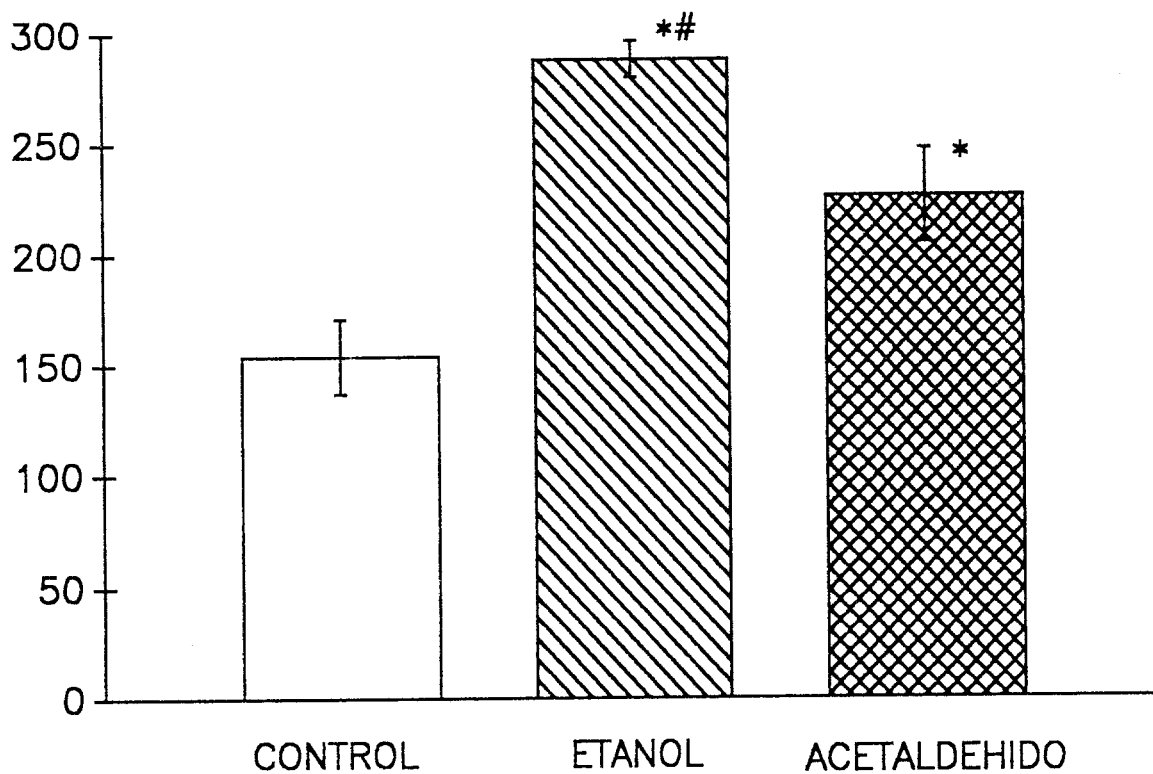
222864

FIGURA 7 EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE LA CAPTACIÓN LISOSOMAL DEL ROJO NEUTRO. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

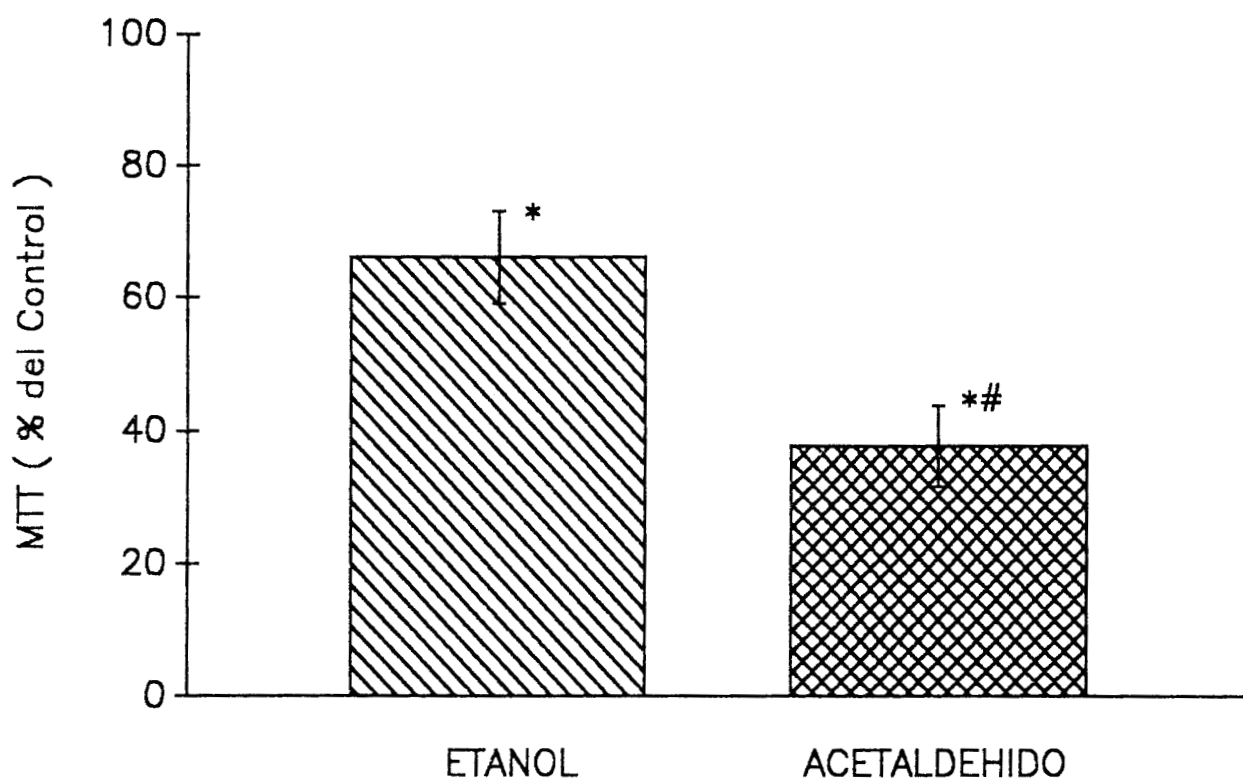
FIGURA 8 EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE LA LIBERACIÓN AL MEDIO, DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) POR LAS CÉLULAS WRL-68. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N = 3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehido.

FIGURA 9 EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MITOCONDRIAL SUCCINATO DESHIDROGENASA. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehído.

4.6 EFECTO DE LOS TOXICOS EN EL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

El incremento en el grado de lipoperoxidación que se produjo en las membranas de las células expuestas a etanol ó acetaldehído, se determinó mediante la cuantificación de malondialdehído producido en presencia de ácido tiobarbitúrico. Los resultados de esta prueba se muestran en la figura 10, expresados como nmol de MDA / mg de proteína, donde se puede observar que tanto el etanol como el acetaldehido producen un incremento en el grado de lipoperoxidación. Para las células que estuvieron en contacto con el etanol la cantidad de MDA fue de 2.56 nmol /mg de proteína lo que equivale a un 278% más que en las células control, mientras que para las células que fueron expuestas al acetaldehído la cantidad fue de 2.02 nmol de MDA/ mg de proteína, lo que equivale a un 219% más que en el grupo control, donde la cantidad de MDA es de apenas 0.92 nmol / mg de proteína.

4.7 CONSUMO DE ÓXIGENO.

El daño que sufre la célula debido a la presencia de agentes tóxicos también se puede ver reflejada en el consumo de oxígeno de las células. Los resultados se presentan en la figura 11 expresados en nanoátomos de oxígeno consumidos por millón de células en cada minuto. Podemos observar que las células expuestas al etanol no presentaron una disminución significativa en el consumo de

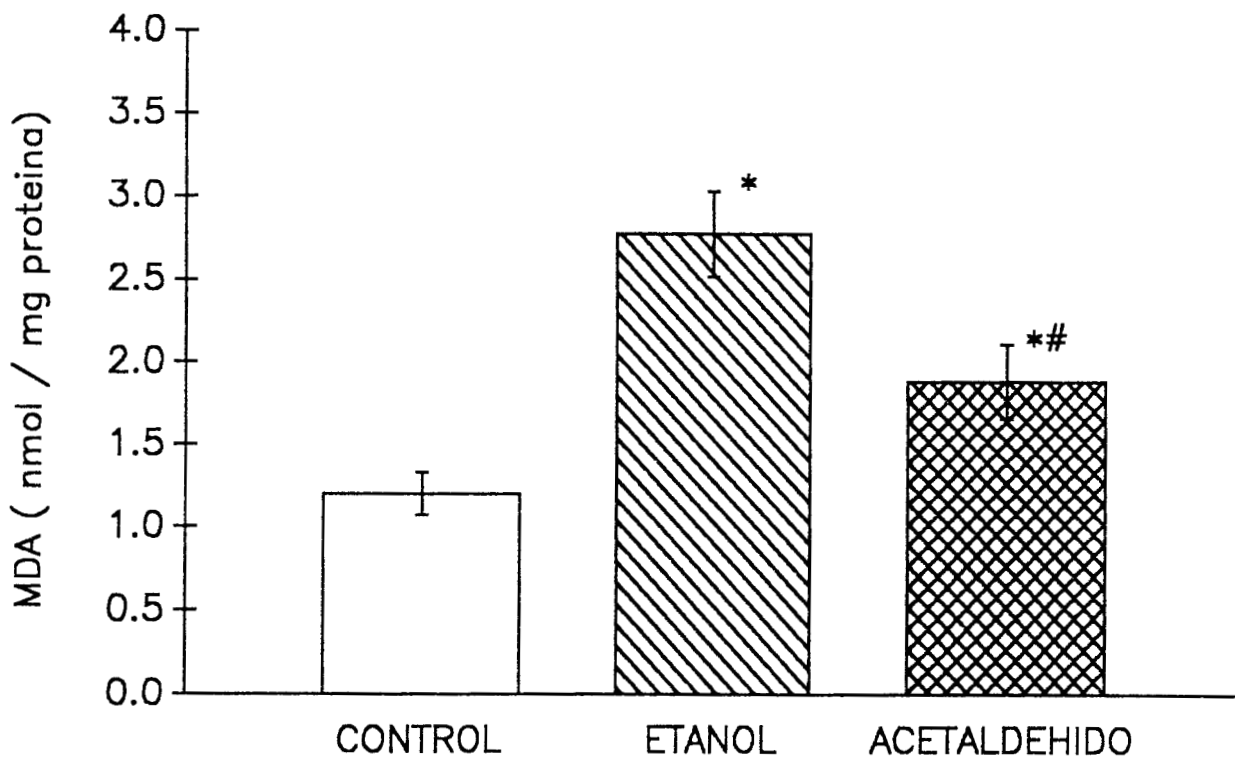
oxígeno. En cambio, aquellas que estuvieron en contacto con el acetaldehído disminuyeron hasta un 39.76% la cantidad de oxígeno consumido. Estimando esta prueba como indicador de la capacidad respiratoria de las células, encontramos que está siendo afectada únicamente en las células expuestas al acetaldehído.

4.8 CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH).

El contenido de grupos sulfhidrilo en las células fue determinado por separado en dos fracciones, una correspondiente a los grupos SH solubles que se considera como glutatión (GSH) y la otra a los SH de la parte proteíca. Se determinaron los grupos tioles totales (datos no presentados), como una manera de corroborar que la suma de los valores de GSH y SH proteícos correspondía al valor obtenido.

En la figura 12 se presentan los resultados obtenidos en la fracción soluble, es decir la cantidad de GSH reducido que resulta importante para la célula ya que es un agente hepatoprotector a nivel celular. En las células del grupo control se obtuvieron 281 nmol de GSH / mg de proteína. No se encontró una diferencia significativa en las células tratadas con etanol (259 nmol de GSH/mg de proteína), mientras que en las células que fueron tratadas con acetaldehído se observó una disminución dramática (22.6 nmoles/mg de proteína) correspondiendo al 7.9% del

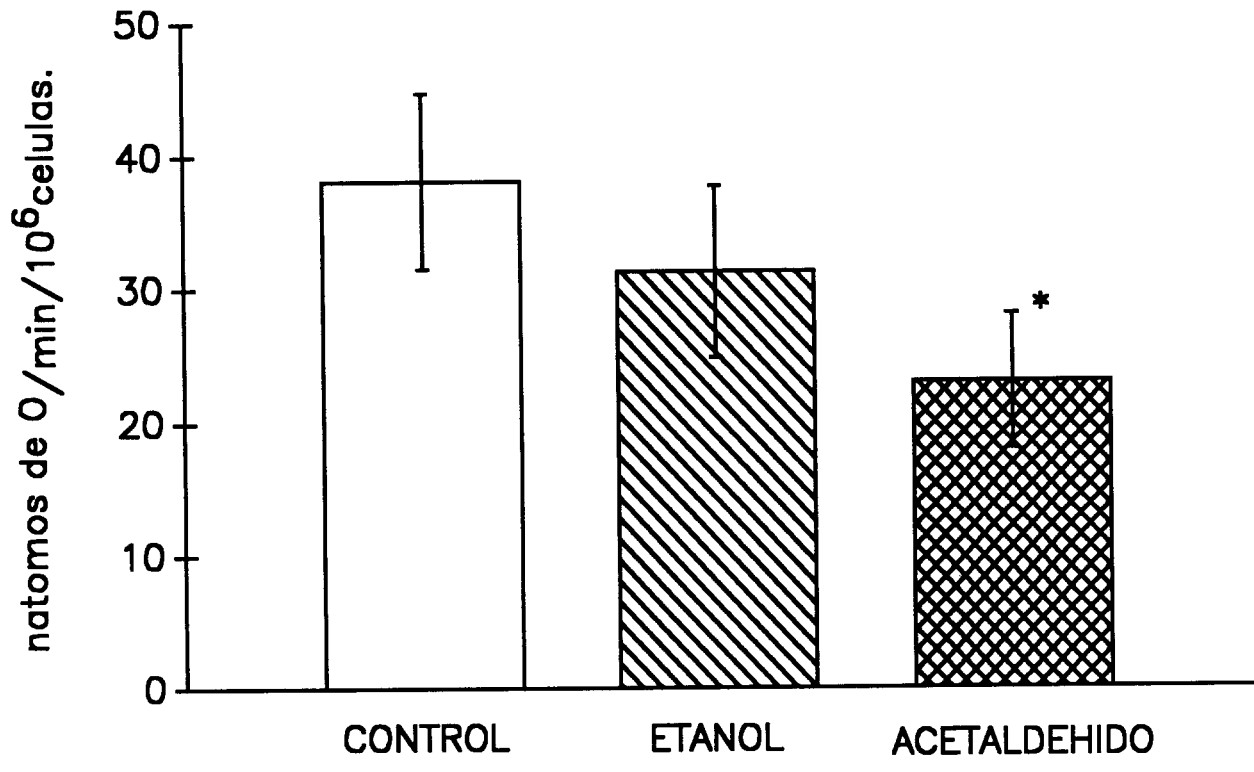
FIGURA 10 EFECTO DEL ETANOL (10mM) Ó ACETALDEHIDO (200mM) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHIDO (MDA), PARA DETERMINAR EL AUMENTO EN EL GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

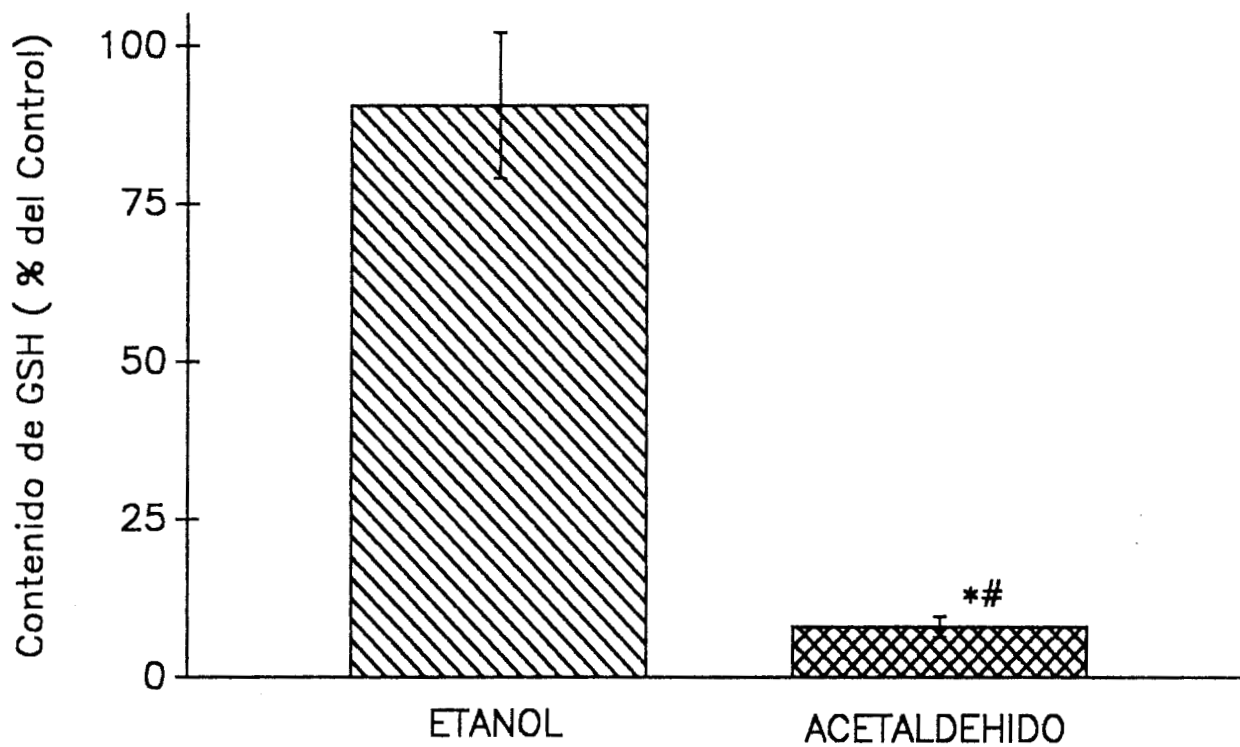
Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehido.

FIGURA 11. EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE LA CAPACIDAD RESPIRATORIA CELULAR. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO ± D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

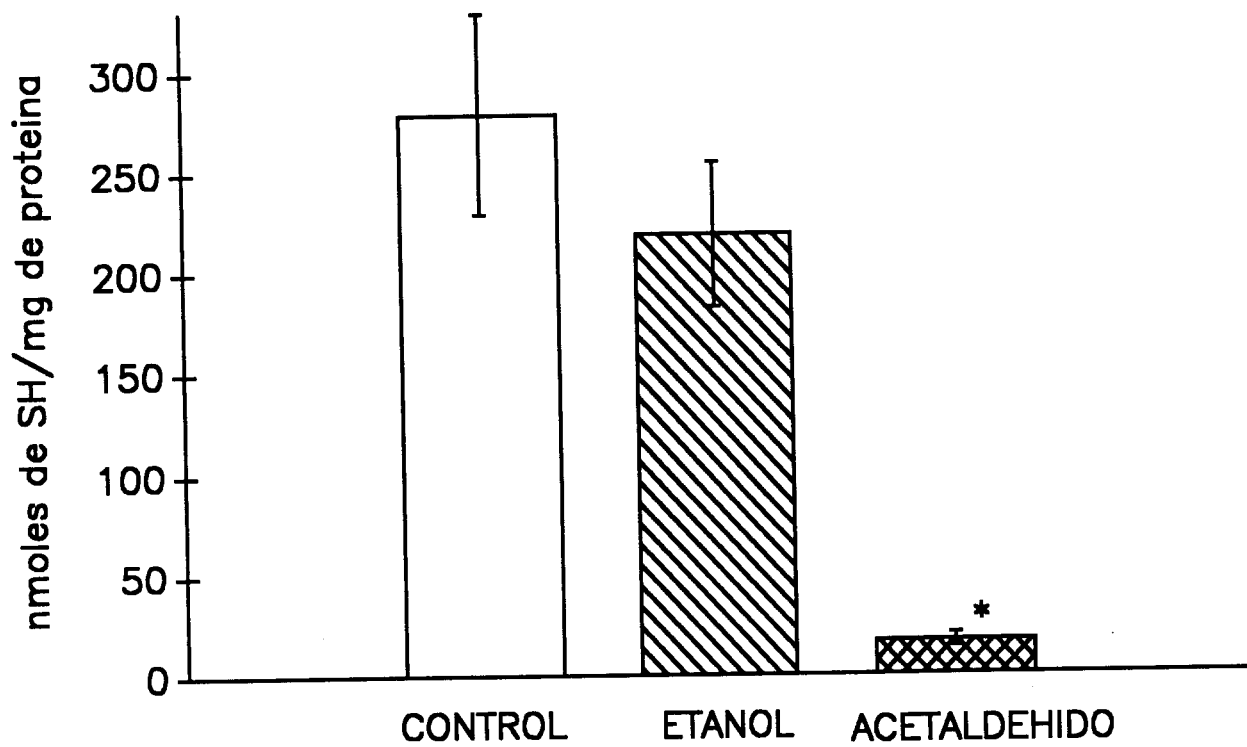
FIGURA 12. EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE EL CONTENIDO DE GRUPOS TIOLES SOLUBLES, GLUTATIÓN (GSH). CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N = 3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

Diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre etanol y acetaldehido.

FIGURA 13. EFECTO DEL ETANOL (200mM) Ó ACETALDEHIDO (10mM) SOBRE EL CONTENIDO DE GRUPOS TIOLES DE LAS PROTEÍNAS CELULARES. CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO \pm D.S. (N=3).



* Diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control.

contenido de GSH del grupo control. Es decir que las células que estuvieron en contacto con el acetaldehído presentan menor cantidad de glutatión, que se traduce en una menor capacidad de protección.

En la figura 13 se presentan los resultados de la cantidad de grupos SH libres presentes en las proteínas. Determinar estos grupos resulta importante ya que se encontraron algunos reportes en la literatura que indican que es posible que el acetaldehído se pegue a los SH de las proteínas. Se puede ver que con el etanol no hubo cambio significativo en el contenido de SH de las proteínas de las células, en cambio en las células que estuvieron en contacto con el acetaldehído, solamente se encontraron 5.5 nmol de SH / mg de proteína, lo que corresponde a un 94.5% de disminución de grupos SH disponibles, lo cual nos indica que muy probablemente el ACH está interactuando con los SH de las proteínas.

222864

5.-DISCUSIÓN

La contribución del presente trabajo estriba en poder comparar mediante distintas pruebas de citotoxicidad, el daño producido por el etanol y el acetaldehído a nivel celular. Para poder lograr este objetivo se utilizó como sistema modelo la línea celular WRL-68, que son células de origen hepático fetal humano de la cual, en estudios previos, se ha reportado que a pesar de presentar características hepáticas (Gutiérrez et al, 1994), no mantienen la actividad de alcohol deshidrogenasa, ni presentan contenido de citocromo P-450 (Gutiérrez et al, 1995), por lo cual, las células WRL-68 parecen ser un sistema ideal para poder comparar la toxicidad del etanol y del acetaldehído de manera independiente.

Los criterios utilizados para elegir las dosis que sirvió para evaluar los efectos tóxicos a nivel celular, de cada uno de los solventes fueron:

- que mantuvieran un 100% de viabilidad durante el tratamiento.
- que las células no presentaran daño morfológico aparente.
- que el tiempo de tratamiento fuera corto, con el fin de evaluar únicamente el efecto del tóxico.

La viabilidad celular tanto en presencia del acetaldehído como del etanol fue dosis dependiente, es decir, que a mayor concentración del tóxico se observa una disminución de la viabilidad celular. Así, encontramos que con el acetaldehído la concentración óptima para

nuestro estudio, resultó ser 10 mM con un tiempo de exposición de 120 min, ya que bajo estas condiciones se observaba un 100 % de viabilidad. Además, aún cuando las células estuvieron en contacto con el solvente no mostraron ninguna alteración morfológica por microscopía óptica, que indicara que las células estuvieran dañadas. Tomando en cuenta los mismos criterios, la concentración de 200 mM resultó ser la adecuada para el caso del etanol. Esta concentración para el etanol como se puede observar, es 20 veces mayor a la del acetaldehído, lo que nos indica que el efecto tóxico del acetaldehído es mayor que el del etanol. Esto resulta congruente con lo reportado por Brien et al (1983) y Uysal et al (1989), que señalan que de acuerdo a los valores de CL_{50} , en homogenado de hígado, el acetaldehído es de 10 a 20 veces más tóxico que el etanol.

Se han involucrado diferentes mecanismos para explicar la toxicidad producida por el etanol y el acetaldehído. Entre ellos están la lipoperoxidación y la formación de complejos con proteínas en el caso del acetaldehído. Es por ello, que además de las pruebas de citotoxicidad se evaluaron la formación de radicales libres y la disponibilidad de grupos SH en las proteínas celulares. En este último caso, se evaluó tanto los SH⁻ disponibles en la fracción proteica como en la no proteica. Diversos autores (Reed et al, 1984; Kaplowitz et al, 1985; Farburg et al, 1989) consideran que los SH determinados en la fracción no proteica pueden considerarse como una medida del contenido de glutatión en estado reducido, es decir aquel que tiene la capacidad de proteger a la célula. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que la disminución de un 10% en el contenido de

glutación después de la exposición a etanol no fue estadísticamente diferente con respecto al control. Sin embargo, algunos reportes señalan que la administración aguda de etanol a roedores produce una disminución del 30-50% en el contenido del GSH hepático (MacDonald et al,1977; Fernández et la, 1981; Shaw et al,1983). Speisky et al (1985) y Devi et al (1993) reportan que la administración de etanol provoca una disminución progresiva en el contenido de GSH. Sin embargo, sus datos muestran que a las 2h de tratamiento no se observa cambio sino a tiempos más prolongados. Con el acetaldehído el contenido de GSH disminuyó drásticamente, en un 94%. Es decir que en presencia del acetaldehido la capacidad protectora de la célula está disminuida considerablemente. Esta disminución se puede explicar en función de un incremento de la liberación celular de este hepatoprotector (Callans,1987), de la disminución en la síntesis de GSH (Speisky et al., 1985; Lauterberg et al., 1982), oxidación del GSH debida a la lipoperoxidación excesiva provocada por el aumento en la formación de radicales libres (Shaw et al,1983) ó bien podría deberse a los tres procesos en conjunto. También se considera que la unión del acetaldehído al GSH es una causa de la disminución de este hepatoprotector. Viña et al (1980), han propuesto que la pérdida del GSH en hepatocitos aislados y tratados con etanol, se debe a las interacciones de ACH con el GSH de manera que forman complejos GSH-ACH 1:1, probablemente vía una unión tioacetal. Lyon et al (1985), no encontraron estos complejos y Speisky et al (1985), reportan que este mecanismo actúa en la pérdida de solamente en un 6% del total del glutatión *in vivo*. Lyon et al (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 de acetaldehído presente. En esta reacción la interacción de ACH con glutatión peroxidasa dependiente de selenio, se inhibe y se promueve la acción de glutatión oxidasa.

Con respecto a los sulfhidrilos presentes en la fracción proteica, encontramos que la disminución de grupos SH de las células tratadas con etanol no es significativa con respecto al control. En cambio, en las células que estuvieron en contacto con el acetaldehído la disminución fue de 94.5%, lo que nos permite establecer que el etanol prácticamente no interacciona con los SH de las proteínas, en cambio el ACH debido a su reactividad, muy probablemente interacciona con los grupos SH disminuyéndolos en forma dramática en su forma reducida. Farbizewski et al (1988) supone que la disminución de SH en proteínas del plasma de ratas tratadas con etanol es debida a la producción de complejos inestables formados con el acetaldehído. Otros trabajos han establecido que el ACH se une covalentemente a la albúmina (Tuma et al., 1984), a las proteínas de las membranas de eritrocitos (Gaines et al.,1977), a la tubulina (Jennett et al.,1980), a proteínas de microsomas hepáticos (Nomura et al.,1981), a una variedad de enzimas (Mauch et al.,1985) y a la hemoglobina (Lumeng et al.,1985), todas ellas ricas en grupos tioles. Cederbraum et al (1976), encontró que los grupos tioles de la cisteína, también pueden formar complejos con el ACH *in vitro*.

Se considera a la lipoperoxidación como uno de los mecanismos básicos involucrados en el daño celular y tisular. Algunos trabajos han establecido que la lipoperoxidación parece ocurrir en el hígado de animales después de la administración aguda de etanol (Videla et al.,1982; Di Luzio, 1968; Valenzuela et al,1980; Shaw et al.,1984). Sin embargo, hasta el momento ningún autor ha explicado como se inicia la generación de radicales libres después de la exposición al etanol. También, se han reportado niveles altos de radicales libres en homogenado de hígado de rata aislado después de tratamientos con acetaldehído (Videla et al,1982)

En nuestro estudio, el aumento en el grado de lipoperoxidación con respecto al grupo control fue de 278% para las células que estuvieron en contacto con el etanol, mientras que para aquellas que estuvieron en contacto con el acetaldehído el incremento fue menor, 219%, indicando que hubo una mayor generación de radicales libres en presencia del etanol. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Uysal et al (1989), en homogenado de hígado de rata tratada con etanol o con acetaldehído, donde el grado de lipoperoxidación se eleva 127.8% con el acetaldehído, mientras que con el etanol el incremento es de 137.1% a las 2h de tratamiento, encontrando un valor máximo a las 4h de tratamiento.

Estos resultados concuerdan con la liberación de LDH ya que en las células que estuvieron en contacto con el etanol la liberación de la enzima al medio de cultivo, fue de un 86.9% valor mayor al encontrado

con el acetaldehído donde sólo se registró un 48.52% de aumento en la actividad extracelular de la enzima, en relación al grupo control. Esta prueba nos indica que la integridad de la membrana en presencia del etanol está más deteriorada, tal vez debido al rompimiento de los dobles enlaces en los lípidos de la membrana por la gran cantidad de radicales libres que se forman con el etanol, no así con el acetaldehído (Uysal et al., 1989).

Por otra parte, algunos autores (Sinceaur et al, 1985; Ribiere et al, 1988) consideran que el aumento en el grado de lipoperoxidación se relaciona con daño en la mitocondria. Nuestros resultados con la prueba del MTT, indican que a nivel de la mitocondria existe un mayor daño en presencia del acetaldehído, con un 60% menos de formazan producido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que con el etanol donde sólo se obtuvo una disminución del 40%. Esta suposición se vió reforzada cuando determinamos la capacidad respiratoria de las células y encontramos que en presencia del etanol la disminución en el consumo de oxígeno no fue significativa, mientras que con el acetaldehído fue de un 39.76%. Lo que nos indica que la función mitocondrial se encuentra alterada en presencia del ACH.

La prueba de citotoxicidad mediante la captación del colorante rojo neutro, nos permite estimar el daño producido en el metabolismo de la célula. En este estudio, la prueba nos indicó que únicamente el acetaldehído origina daño a nivel de los lisosomas ya que los datos

obtenidos con el etanol no presentan una diferencia significativa con respecto al grupo control.

Hasta este momento, los resultados obtenidos nos indican que con excepción de la liberación de LDH y el grado de lipoperoxidación el acetaldehído parece ejercer un mayor daño a nivel celular que el etanol. Por lo que el siguiente punto que consideramos, fue evaluar algunos parámetros que nos indicaran el funcionamiento general de la célula, como son: la capacidad de proliferación después del tratamiento, así como la determinación de la capacidad de adhesión de las células al sustrato, la cual determinamos: primero, mediante la evaluación de la fuerza con que están adheridas al sustrato es decir, la facilidad para despegarse y la segundo como la facilidad que tienen para adherirse nuevamente al sustrato.

Con respecto a la capacidad de las células WRL-68 para proliferar después del tratamiento con cada uno de los tóxicos, encontramos que las células tratadas con etanol presentan la misma capacidad proliferativa que las células control. Sin embargo, las células tratadas con acetaldehído reducen su capacidad de proliferación en aproximadamente un 50% en las primeras 24 h, siendo aún más evidente a las 48 h en donde encontramos que las células presentan un 30% de capacidad proliferativa con respecto al control. Es decir que el tratamiento con acetaldehído provoca alteraciones celulares que no le permiten duplicarse normalmente a pesar de que el tóxico estuvo únicamente 2h en contacto con las células y que éstas presentaron un

100% de viabilidad, es decir las células sufrieron daños funcionales irreversibles que no le permiten proliferar normalmente.

Con respecto a la fuerza con que están adheridas al sustrato encontramos que las células tratadas con acetaldehído se pegan más lentamente y en menor cantidad al sustrato, ya que aún después de 8h no logran adherirse a la caja. De estos resultados inferimos que en las células tratadas con acetaldehído la capacidad de sintetizar proteínas está disminuida, ya que no son capaces de sintetizar todas las proteínas que han sido digeridas por la tripsina y que son necesarias para su adhesión al sustrato. Mas aún, las células tratadas con acetaldehído presentaron una mayor facilidad para despegarse del sustrato, lo cual nos indica que la interacción célula-sustrato es más pobre en el caso del tratamiento con este tóxico.

Por último realizamos observaciones de las células mediante microscopía óptica y por microscopía electrónica de transmisión, con lo que pudimos constatar que las células con acetaldehído son las que han sufrido mayor daño en general. Por microscopía óptica se observa que éstas se han contraído perdiendo su apariencia poligonal característica. Por microscopía electrónica el daño que se observa es sobre todo a nivel de las mitocondrias, que incluso aparecen rotas y del citoesqueleto se presenta muy aumentado.

De estos resultados podemos concluir que el acetaldehído produce un mayor daño con respecto al etanol a nivel celular, ya que

con excepción del grado de lipoperoxidación y el aumento de la actividad extracelular de LDH todos los parámetros determinados se ven alterados en mayor magnitud en presencia del acetaldehído. El mecanismo tóxico de cada una de las sustancias parece involucrar múltiples procesos celulares que dan como resultado un deterioro celular generalizado.

Por tanto muy probablemente el daño producido debido a la ingesta de etanol se debe tanto al etanol "per se" como al acetaldehído.

6.- BIBLIOGRAFÍA

Abdulla, A. y Badawy, B. (1978) The Metabolism of Alcohol. *Clin. Endocr. Metab.* 7: 2-6.

Borenfreund, E. y Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24:119-124.

Brien, J.F. y Loomis, C.W. (1983) Pharmacology of acetaldehyde. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61: 1-22.

Borenfreund, E. y Puerner, J.A. (1985) Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicol.* 39: 121-134.

Buege, J.A., y Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation, en: *Methods in Enzymology*. Vol. 52, Part C, de. by Fleischer, S. and Packer, L., Academic Press, New York, pp. 302-310.

Callans, D.J., Wachter, L. y Mitchell, M.C. (1987) Effect of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in rat. *Hepatology*. 7: 496-501.

Cederbaum, A.I., Lieber, C.S. y Rubin, E. (1974) Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions. *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 560-569.

Cederbaum, A.I. y Rubin, E. (1976) Protective effect of cysteine on the inhibition of mitochondrial function by acetaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* 25:963-973.

Chávez Rivera, Y. (1983) Cardiopatías y cardiomiopatías: confusión conceptual. Su clasificación y expresión sintomáticas, fisiopatología y clínica. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 53: 253-270.

Chen, L. H., Hu, N. y Huang, T. L. (1992) Effects of acute alcohol intoxication on liver antioxidant defense systems in rats. *Biochem. Arch.* 8: 95-100.

Deneke, S.M. y Fanburg, B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257: L163-L173.

Denizot, F. y Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol Methods.* 89: 271- 277.

Devi, B., Henderson, G.I., Frosto, T.A. y Schenker, S. (1993) Effect of ethanol on rat fetal hepatocytes: Studies on cell replication, lipid peroxidation and glutathione. *Hepatology.* 3: 648-659.

Di Luzio, N.R. (1968) The role of lipid peroxidation and antioxidants in ethanol-induced lipid alterations. *Exp. Mol. Phatol.* 8:394-402.

Domschke, S., Domschke, W. and Lieber, C.S. (1974) Hepatic redox state: Attenuation of the acute effects of ethanol induced by chronic ethanol consumption. *Life Sci.* 15: 1327-1334.

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

Eriksson, T., Magnusson, T., Carlsson, A., Hagman, M. y Jagenburg, R. (1983) Decrease in plasma amino acid in man after an acute dose of ethanol. *J. Studies. Alcohol* 44: 215-221.

Eriksson, T., Carlsson, A., Liljequist, S., Hagman, M. y Jagenburg, R. (1980) Decrease in plasma amino acid in rat after acute administration of ethanol. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 512-513.

Fernandez, V. y Videla, L.A. (1981) Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia.* 37:392-394.

Gaines, K.C., Salhany, J.M., Tuma, W. y Sorrell, M.F. (1977) Reactions of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS Lett.* 75: 115-119.

Geokas, M.C., Lieber, C.S., French, S. y Halsted, C.H. (1981) Ethanol, the liver, and the gastrointestinal tract. *Ann. Int. Med.* 95:198-211.

Gidley, M.J., Hall, L.D., Sanders, J.K.M., et al. (1981) Acetaldehyde-enkephalins: Structure proof and some conformational deductions from one and two-dimensional proton nuclear magnetic resonance spectral. *Biochem.* 20: 3880-3883.

Girbes, T., Susin, A., Ayuso, M.S. y Parrilla, R. (1983) : Acute effects of ethanol en the control of protein syntesis in isolated rat liver cell. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 37-49.

Grunnet, N., Vind, C. y Dich, J. (1989) Maintenance of alcohol dehydrogenase activity in long- term culture of hepatocytes from females rat. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 13: 25-28.

Gutiérrez, M.C., Bucio, L., Souza, V., Gómez, J.L., Campos, C y Cárabez, A. (1994) Expression of some hepatocyte-like funcional properties of WRL-68 cell in culture. *In Vitro and Developmental Biology.* 30A: 366-371.

Gutiérrez, M.C., Bucio, L., Souza, V., y Carabez, A. (1995) The effect of chronic and acute ethanol treatment on morfology, lipid peroxidation, enzyme activities and Na⁺ transport systems on WRL-68 cells. *Human & Exp. Toxicol.* 14: 324-334.

Hasumura, Y., Teschke, R. y Lieber, C.S. (1976) Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251: 4908-4913.

Jennett, R.B., Tuma, D.J. y Sorrell, M.F. (1980) Effect of ethanol and its metabolites. *Pharmacology.* 21: 363-368.

Jönvall, H. (1994) The alcohol dehydrogenase system. en: *Molecular basis of alcohol use and abuse*. De. by B. Jansson, H. Jönvall, U. Rydberg, L. Terenius & B.L.Vallee. pag: 221-229.

Kaplowitz, N., Yee, A. W. T. y Ookhtens, M. (1985) The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 715-744.

Koch, O.R., Boveris, A., Sitotzky De Favelukes, S., et al (1977) Biochemical lesion of liver mitochondrial from rats after chronic alcohol consumption. *Exp. Mol. Pathol.* 27: 213-220.

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

Krebs, H.A., Freedland,R.A., Hems,R. y Stubbs, M. (1969) Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem. J.* 112: 117-124.

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. y Thome, J. P. (1994) Expression and induction of drug-metabolizing enzymes in cultured fetal rat hepatocytes. *Cell. Biol. and Toxicol.* 10: 117-125.

Lauterberg, B.H., Davies, H. y Mitchell, J.R. (1982) Ethanol suppress hepatic glutathione synthesis in rat in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 31: 2031-2037.

Lauterburg, B.H., Admas, J.D. y Mitchell, J.R. (1984) Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology.* 4:586-590.

Lieber, C. S., Seitz, H.K., Garro, A.J. y Worner, T.M. (1981) Alcohol as a co-carcinogen. en: *Frontiers in Liver Disease*. Ed. by P.D. Berk and T.C. Chalmers. Thieme-Stratton. New York. pp. 320-355.

222864

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

Lieber, C.S. (1984) Alcohol and the liver: 1984 update. *Hepatology*. 4: 1243-1260.

Lieber, C.S. (1988) Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 241-247.

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

Lin, R.C., Smith, R.S. y Lumeng, L. (1988) Detection of a protein-acetaldehyde adducts in the liver of rats fed alcohol chronically. *J. Clin. Invest.* 81:615-619.

Lindros, K.O. y Eriksson C.J.P. (1975) The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. *Finn. Found. Alcohol Stud.* 23: 67-81.

Litov R.E., Irving, D.H., Downey, J.E. y Tappel, A.L. (1978) Lipid peroxidation a mechanism involved in acute ethanol toxicity as demonstrated in vivo pentane production in the rat. *Lipids* 13 1/8: 305-307.

Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Lumeng, L. y Minter, R.G. (1985) Formation of acetaldehyde-hemoglobin adducts in vitro and in vivo demonstrated by high performance liquid chromatography. *Alchol. Clin. Exp. Res.* 9:209.

Lyon Y. y Kaplowitz, N. (1985) Acetaldehyde-dependent oxidation of glutathione catalyzed by rat liver cytosol. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 3: 949-957.

MacDonald, C.M., Dow, J. y Moore, M.R. (1977) A possible protective role for sulphydryl compounds in acute alcoholic liver injury. *Biochem. Pharmacol.* 26: 1529-1531.

Mason J.O. (1990) Preface. en *Seventh Special Report to the U.S. Congress on Alcohol and Health* (Edited by Gordis E.) U.S. Dept. Health and Human Services, Rockville, MD. pp. IX-X.

Mauch, T.J., Donohue, T.M., Zetterman, R.K. y Sorrell, M.F. (1985) Covalent binding of acetaldehyde to lysine-dependent enzymes can inhibit catalytic activity. *Hepatology*. 5:1056.

Medina, V.A., Donohue, T.M., Sorrell, M.F. y Tuma, D.J. (1985) Covalent binding of acetaldehyde to hepatic proteins during ethanol oxidation. *J.Lab. Clin. Med.* 105: 5-10.

Moldeus, P., Hogberg, J. y Orrenius. (1978) Isolation and use of liver cells. En: W.B. Jacob (ed.) *Meth. Enzimol.* pp. 60-71.

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

Niemela, O., Juvonen, T. y Parkkila, S. (1990) Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J. Clin. Invest.* 87: 1367-1374.

Nomura, F. y Lieber, C.S. (1981) Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: Enhancement after chronic alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 131-137.

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

Nordmann, R., Ribiere, C. y Rouach, H. (1992) Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radical Res. Commun.* 12: 219-240.

Oudea, M.C., Launay, A.N., Queneherve, S., et al. (1970) The hepatic lesions produced in the rat by chronic alcoholic intoxication:

Histological, ultrastructural and biochemical observations. *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.* 15: 748-764.

Reed, D.J. y Farris, M.W. (1984) Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 36: 25S-33S.

Ribiere, C., Saffer, C., Sabouralt, D. y Nordmann, R. (1988) cerebral and hepatic mitochondrial respiratory functions after chronic ethanol treatment. *Alcohol Alcohol.* 23:A71.

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

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

Shaw, S., Rubin, K.P. y 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.

Sinceaur, J., Ribiere, C., Sabouralt, D. y Nordmann, R. (1985) Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication: possible role in hepatotoxicity. en: *Free radicals in liver injury*. eds. Oxford: IRL Press. pp:175-177.

Sorrell, M.F. y Tuma, D.J. (1978) Selective impairment of glycoprotein metabolism by ethanol and acetaldehyde in rat liver slices. *Gastroenterology.* 75: 200-205.

Speisky, H., MacDonald, A., Giles, H.G., Orrego, H. y Israel, Y. (1983) *Hepatology.* 3:800.

Speisky, H., MacDonald, A., Giles, H.G., Orrego, H. y Israel, Y. (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. *Biochem. J.* 225:565-572.

Thalia David, E., Fischer, Y. y Moldave, K. (1983) Studies of the effects of ethanol on eukaryotic protein synthesis in vitro. *J. Biol. Chem.* 258: 7702-7706.

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

Tuma, D.J., Donohue, T.M., Medina, V., et al. (1984) Enhancement of acetaldehyde-protein adduct formation by L-ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 377-381.

Tuma, D.J., Smith, S.L. y Sorrell, M.F. (1991) Acetaldehyde and microtubules. *Ann. NY Acad. Sci.* 625: 786-792.

Uysal, M., Ozdemirler, G., Kutalp, G. y Oz, H. (1989) Mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver after acute acetaldehyde and ethanol intoxication. *J. Appl. Toxicol.* 9: 155-158.

Valenzuela, A., Fernandez, N., Fernandez, V., Ugarte, G. y Videla, L.A. (1980) Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and the activity of the enzymes related to peroxide metabolism in rat liver. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 111: 11-13.

Vassault, A. (1983) Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. en: Bergmeyer HU, Bergmeyer J. & Grassl M (eds). *Methods of enzymatic analysis. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*, 3rd edn, pp118-126. Verlag-Chemie, Weinheim.

Velasco, F.R. (1981) Esa enfermedad llamada alcoholismo. Ed.Trillas. México.

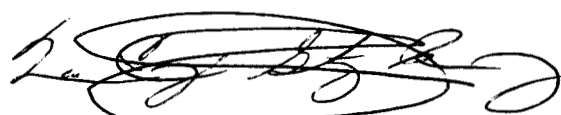
Videla, L.A., Fernandez, V. y DeMarinis, A. (1982) Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatments in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104:965-970.

Viña, J., Estrella, J.M., Guerri, C. y Romero, F.J. (1980) Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 188: 549-552.

Worrall, S. de Jersey, J., Shanley, B.C., et al. (1990) Antibodies against acetaldehyde-modified epitopes: Presense in alcoholic, non-alcoholic liver disease and control subjects. *Alcohol Alcoholism.* 25: 509-517.

Zern, M.A., Shafritz, D.A. y Shields, D. (1982) Hepatic protein synthesis and its regulation. en: *The Liver. Biology and Pathobiology.* De. by Y. M. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz, Raven Press, New York pp 103.121.

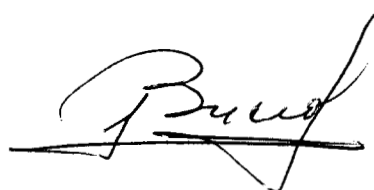
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 2 de Junio de 1995.



Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz.



Dr. Edmundo Chávez Cossio.



M. en C. Leticia Bucio Ortiz.