

FACULTAT DE MEDICINA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**RELEVANCIA DEL ACETALDEHÍDO,  
LA HIPOXIA Y LA MITOCONDRIA  
EN LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA**

Josep Maria Lluís Duquez

Barcelona, 2004

Programa de doctorado de Biología i Patología Cel.lular del Departament de  
Biología Cel.lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina,  
Universitat de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del

Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres

y

Dr. Albert Parés Darnaculleta

en

la Unitat de Fetge de l'Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic i  
Provincial i el Departament de Patologia Experimental, Institut  
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

**Als meus pares, Pilar i Josep M<sup>a</sup>,  
a la meva iaia Carme i ma germanet Ramon**

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>1. MITOCONDRIA</b>	3
1.1. Estructura y composición	3
1.2. Transporte mitocondrial	4
1.3. Cadena respiratoria mitocondrial y fosforilación oxidativa	5
1.4. Permeabilidad mitocondrial transitoria	7
1.4.1. Componentes del MPT	8
1.4.2. MPT y muerte celular	10
1.4.3. Reguladores del MPT	12
<b>2. GLUTATION</b>	14
2.1. Síntesis de glutation	15
2.2. Funciones del glutation	16
2.3. Glutation mitocondrial	17
2.3.1. Funciones del GSH mitocondrial	17
2.3.2. Propiedades del transporte mitocondrial de GSH	18
<b>3. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO</b>	20
3.1. Estrés en el RE	20
<b>4. HIPOXIA</b>	21
4.1. Hipoxia y transcripción génica: HIF y NF- $\kappa$ B	23
4.1.1. HIF	23
4.1.2. NF- $\kappa$ B	24

---

5. HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA	27
5.1. Metabolismo del etanol	27
5.1.1. Alcohol deshidrogenasa	28
5.1.2. Sistema microsomal de oxidación de etanol	29
5.1.3. Catalasa	29
5.1.4. Metabolismo del acetaldehído	30
5.1.5. Efectos del acetaldehído	30
5.1.6. Hipoxia	31
5.2. Mitocondria y alcohol	33
5.3. Citoquinas y alcohol	35
<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	40
1. CULTIVOS CELULARES	40
1.1. Aislamiento de hepatocitos	40
1.2. Cultivo primario de hepatocitos de rata	41
1.3. Cultivo celular HepG2	42
2. TRATAMIENTOS CELULARES	42
2.1. Acetaldehído	42
2.2. Hipoxia	42
2.3. Disminución selectiva del glutation reducido (GSH)	43
3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MITOCONDRIALES	43
3.1. Aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial	43
3.1.1. HepG2	43
3.1.2. Hígado de rata	44
3.2. Mitoplastos	44
3.3. Valoración de la permeabilidad mitocondrial transitoria	45

---

3.4. Composición lipídica de la membrana mitocondrial	46
3.4.1. Extracción de lípidos	46
3.4.2. Separación e identificación de los fosfolípidos	46
3.4.3. Composición de ácidos grasos en los fosfolípidos	46
3.4.4. Extracción y determinación de colesterol	47
3.5. Enriquecimiento en colesterol	47
3.6. Determinación de la fluidez de membrana	48
3.7. Fluidificación de la membrana mitocondrial	49
3.8. Transporte de GSH mitocondrial y ADP/APT	49
4. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS, GLUTATION Y ROS	50
4.1. Cuantificación de proteínas	50
4.2. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	51
4.3. Determinación de GSH	51
5. VALORACIÓN DE LA MUERTE CELULAR	51
5.1. Viabilidad celular por LDH	51
5.2. Viabilidad celular por MTT	53
5.3. Determinación del tipo de muerte por citometría de flujo	53
6. ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	54
6.1. Obtención de extractos nucleares	54
6.2. Marcaje de la sonda	56
6.3. EMSA	56
6.4. Ensayo de superretraso (Supershift)	57
7. <i>IMMUNOBOLOTS</i> E INMUNOPRECIPITACIÓN	57
7.1. Obtención de extractos citosólicos	57
7.2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS PAGE)	57
7.3. Western-blot	59

---

7.4. Inmunoprecipitación	61
8. DETERMINACIÓN DEL ARN MENSAJERO DE c-IAP2 Y VEGF	61
8.1. Extracción de ARN de células HepG2	61
8.2. RT-PCR	62

## **RESULTADOS**

- Artículo 1: <i>Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress.</i>	63
- Artículo 2: <i>Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity.</i>	64
- Artículo 3: <i>Mitochondrial glutathione depletion sensitizes hepatocytes to hypoxia.</i>	65

<b>DISCUSIÓN</b>	66
------------------	----

<b>CONCLUSIONES</b>	76
---------------------	----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	77
---------------------	----

**ABREVIATURAS**

<b>ADH</b>	ALCOHOL DESHIDROGENASA
<b>ADN</b>	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
<b>ADP</b>	ADENOSÍN DIFOSFATO
<b>AIF</b>	FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS
<b>ALDH</b>	ACETALDEHÍDO DESHIDROGENASA
<b>AMP</b>	ADENOSÍN MONOFOSFATO
<b>ANT</b>	TRANSLOCADOR DE ADENINAS
<b>ATR</b>	ATRACTILOSIDO
<b>AO</b>	ALDEHÍDO OXIDASA
<b>AP-1</b>	PROTEÍNA ACTIVADORA 1
<b>Apaf-1</b>	FACTOR ACTIVADOR DE LA PROTEASA
<b>ARN</b>	ÁCIDO RIBONUCLEICO
<b>ATP</b>	ADENOSÍN TRIFOSFATO
<b>CRM</b>	CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL
<b>CsA</b>	CICLOSPORINA
<b>CyP-D</b>	CICLOFILINA D
<b>DCFDA</b>	DICLOROFLUORESCEINA DIACETATO
<b>DIC</b>	TRANSPORTADOR DE LOS ÁCIDOS DICARBOXÍLICOS
<b>DMEM</b>	DULBECCO'S MODIFIED EAGLES MEDIUM
<b>EMSA</b>	ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA
<b>EPO</b>	HORMONA ERITROPOYETINA
<b>FADH<sub>2</sub></b>	FLAVINA ADENINA DINUCLEOTIDO
<b>γ-GCS</b>	γ-GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA
<b>GD3</b>	GANGLIÓSIDO GD3
<b>GS</b>	GLUTATION SINTETASA
<b>GSH</b>	GLUTATION REDUCIDO
<b>GSSG</b>	GLUTATION OXIDADO
<b>GST</b>	GLUTATION S-TRANSFERASA
<b>HIF</b>	FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA
<b>HNE</b>	HIDROXINONENAL



---

<b>HP</b>	3-HIDROXIL-4-PENTENOATO
<b>IAP</b>	PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA APOPTOSIS
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	INTERFERÓN $\gamma$
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	PROTEÍNA INHIBIDORA KAPPA B
<b>IKK</b>	COMPLEJO I $\kappa$ B QUINASA
<b>IL-1</b>	INTERLEUQUINA 1
<b>K<math>m</math></b>	CONSTANTE DE AFINIDAD
<b>LPS</b>	LIPOPOLISACÁRIDO
<b>mARN</b>	ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO
<b>MEOS</b>	SISTEMA MICROSOMAL DE OXIDACIÓN DE ETANOL
<b>mGSH</b>	GLUTATION MITOCONDRIAL REDUCIDO
<b>MPT</b>	PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL TRANSITORIA
<b>NAD<sup>+</sup></b>	NICOTIN ADENÍN DINUCLEOTIDO (FORMA OXIDADA)
<b>NADH</b>	NICOTÍN ADENÍN DINUCLEÓTIDO (FORMA REDUCIDA)
<b>NADPH</b>	NICOTÍN ADENÍN DINUCLEÓTIDO FOSFATO
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	FACTOR NUCLEAR KAPPA B
<b>ODD</b>	DOMINIO DE DEGRADACIÓN DEPENDIENTE DE OXÍGENO
<b>OGC</b>	TRANSPORTADOR DE OXOGLUTARATO
<b>PBR</b>	RECEPTOR DE BENZODIAZEPINAS
<b>pVHL</b>	PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES DE VON-HIPPEL-LINDAU
<b>RE</b>	RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
<b>ROS/NOS</b>	SUSTANCIAS REACTIVAS AL OXÍGENO / NITRÓGENO
<b>SREBP</b>	PROTEÍNA REGULADORA DE LA UNIÓN AL ESTEROL
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	FACTOR TRANSFORMANTE DE CRECIMIENTO BETA 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
<b>UPR</b>	RESPUESTA A PROTEÍNAS NO PLEGADAS
<b>VDAC</b>	CANAL ANIÓNICO DEPENDIENTE DE VOLTAJE
<b>VEGF</b>	FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL
<b>V<math>_{max}</math></b>	VELOCIDAD MÁXIMA
<b>XO</b>	XANTINA OXIDASA









# INTRODUCCIÓN

## 1. MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos especializados en la transformación de la energía de oxidación en energía quimioosmótica, lo que se traduce en la síntesis de ATP a partir de ADP. Además de proporcionar la energía necesaria para que las células lleven a cabo sus múltiples funciones, en estos últimos años se ha puesto de relieve su papel en la regulación de la muerte celular, al actuar como almacén de diferentes proteínas apoptogénicas.

### **1.1. Estructura y composición**

Las mitocondrias son orgánulos móviles y plásticos, de un diámetro comprendido entre 0.5-1  $\mu\text{m}$ , y su asociación con los microtúbulos determina la orientación y distribución típica observada en el citoplasma de diferentes tipos celulares.

La estructura básica de la mitocondria consiste en dos membranas altamente especializadas, una interna y otra externa, que delimitan dos compartimentos diferentes; el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial.

En el espacio intermembrana, aparte de residir diferentes proteínas proapoptóticas, se encuentra la enzima adenilatoquinasa que transforma el AMP en ADP, el cual es rápidamente fosforilado a ATP. Gracias a esta enzima, el AMP citosólico puede ser utilizado para la regeneración de ATP.

Por otra parte, la matriz mitocondrial contiene la maquinaria implicada en la síntesis proteica (ADN, ARN y ribosomas) y es donde tienen lugar las reacciones del ciclo de Krebs.

La membrana externa presenta ciertas analogías de composición con la membrana citoplasmática y el retículo endoplasmático. Contiene un 40% de lípidos, principalmente fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol) con cadenas de ácidos grasos muy insaturados, y un 60% de proteínas, que corresponden principalmente a enzimas como la acil-CoA-sintetasa, la NADH-

citocromo-b<sub>5</sub>-reductasa, la monoamino oxidasa y sobretodo el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Este canal es el responsable de que la membrana externa actúe como un tamiz permeable a moléculas menores de 5000 Da. La mayoría de sustratos no pueden atravesar la membrana interna, provocando que el espacio intermembranal sea equivalente en su composición química al citosol.

La membrana interna forma pliegues orientados hacia el interior, llamados crestas mitocondriales, que aumentan considerablemente su superficie. Su composición química difiere en muchos aspectos de la externa, siendo mucho más rica en proteínas (80%) debido a la presencia de gran cantidad de transportadores específicos y de los complejos enzimáticos constituyentes de la cadena respiratoria. La composición lipídica de la membrana interna es particular, no hay apenas colesterol y el total de fosfolípidos se distribuye en 45-50% fosfatidilicolinas, 25-35% fosfatidiletanolaminas y 10-20% cardiolipina (Cunningham CC et al. 1982). La cardiolipina, es un difosfatidil glicerol con cuatro cadenas de ácidos grasos altamente enriquecidos en ácido linoleico (18:2), que no se encuentra en ninguna otra membrana celular de mamíferos y es responsable de la impermeabilidad de la membrana interna a los iones. Estos fosfolípidos de carga negativa, se encuentran íntimamente asociados a los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria de forma que, cambios en su proporción, afectan directamente al funcionamiento mitocondrial (Cunningham CC et al. 1987).

## **1.2. Transporte mitocondrial**

Mientras que la membrana externa es permeable a la mayoría de solutos, la membrana interna es impermeable y sólo pueden difundir a través de ella pequeñas moléculas neutras, como por ejemplo: oxígeno, agua, dióxido de carbono, amoníaco, acetato y etanol. El resto de transportes pasivos o activos que se realizan a través de esta membrana, están controlados por canales o transportadores específicos.

Para la fosforilación oxidativa, la mitocondria necesita importar desde el citosol, ADP y fosfato inorgánico, mientras que el ATP generado en este proceso es liberado al citosol. Para ello, intervienen dos transportadores presentes en todas las mitocondrias:

el translocador de ADP/ATP (ANT) y el transportador de fosfato inorgánico (Palmieri F et al.1993). Existen también transportadores que permiten la entrada a la mitocondria de equivalentes reductores o sustratos para la fosforilación oxidativa, entre ellos, cabe destacar, el transportador de piruvato, el translocador de aspartato/glutamato, el transportador de oxoglutarato y el transportador de carnitina (Palmieri F 1994).

La matriz mitocondrial se encuentra cargada negativamente debido al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial, por lo que el transporte de cualquier anión se verá afectado por este potencial de membrana. La mayoría de transportadores realiza un intercambio equimolar de aniones (*sistema antiporte*) o bien los aniones se transportan conjuntamente con protones (*sistema simporte*), con la excepción del ANT y el translocador de aspartato/glutamato, que son transportadores electrogénicos al transferir una carga eléctrica neta.

Otros transportadores tienen una distribución más limitada y reflejan su papel en funciones específicas como la gluconeogénesis (transportador de ácidos dicarboxílicos), la síntesis de ácidos grasos (transportador de citrato), la síntesis de urea (transportador de ornitina, el de glutamato y el de glutamina) o la termogénesis (proteína desacopladora).

### **1.3. Cadena respiratoria mitocondrial y fosforilación oxidativa**

En 1925 se describe el concepto de cadena respiratoria y fosforilación oxidativa (Keilin D 1925). Posteriormente, Mitchell P et al. 1961 propone un modelo de acoplamiento de la oxidación de complejos respiratorios con la fosforilación del ADP en ATP que se denomina acoplamiento quimioosmótico. Este modelo se basa en el uso por la ATPasa del gradiente electroquímico creado a partir de la oxidación de los sustratos respiratorios.

Trabajos posteriores confirman esta teoría y establecen la organización de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en cinco grandes complejos enzimáticos, localizados en la membrana interna mitocondrial: complejo NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato Q reductasa (complejo II), complejo b-c<sub>1</sub> (complejo III), complejo citocromo



oxidasa (complejo IV) y la ATPasa (complejo V) que permite el acoplamiento de las oxidaciones de los sustratos de la respiración con la fosforilación del ADP (Rich PR 2003) (Figura 1).

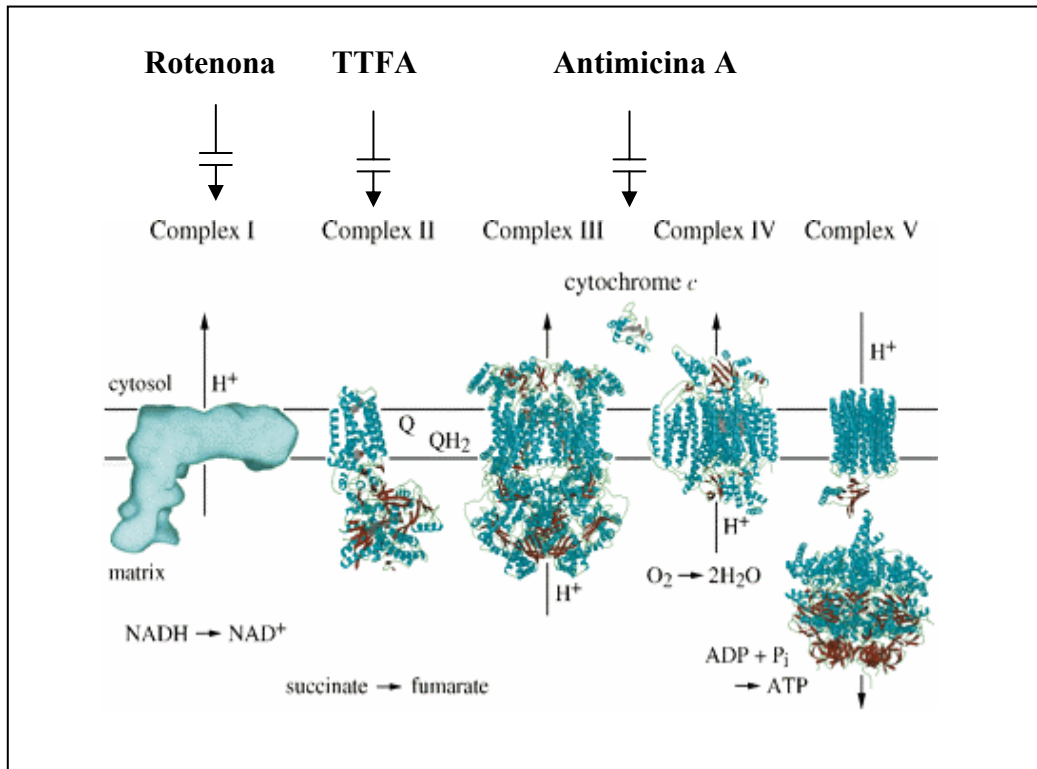
El ciclo de Krebs funciona bajo estrecha dependencia de la CRM, compartiendo el enzima succinato deshidrogenasa que está altamente regulado por el estado redox celular y por el potencial de fosforilación intramitocondrial (Tyler D 1992). La organización de los enzimas del ciclo permite un desaprovechamiento mínimo de intermediarios hacia ciclos fútiles y dirige de manera óptima el poder reductor hacia la CRM (Robinson JB et al. 1987).

Los cofactores reducidos  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$ , que se liberan en el ciclo de Krebs, proporcionan cada uno de ellos un par de electrones a la CRM. Los electrones pasan de un componente al siguiente, a través de reacciones de óxido-reducción, hasta llegar al final de la misma, donde se ceden al oxígeno molecular para formar  $\text{H}_2\text{O}$ .

En las sucesivas reacciones, los componentes de la CRM permiten la extrusión de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Estos protones pueden, en base al gradiente electroquímico que se crea, penetrar nuevamente al interior de la matriz a través de un canal presente en el complejo ATPasa, siendo responsables de la fosforilación del ADP en ATP.

En condiciones fisiológicas, la reducción del  $\text{O}_2$  a agua en la cadena respiratoria es incompleta (96-98%), dando lugar a la formación de radicales libres. Los complejos con capacidad de producción de sustancias reactivas al oxígeno (ROS) son el complejo I y sobre todo el complejo III, donde la autooxidación de la ubisemiquinona provoca principalmente la formación del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que dismuta a peróxido de hidrógeno de forma espontánea o por la acción de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Turrens JF et al. 1980).

El flujo de electrones puede ser inhibido específicamente por diferentes sustancias que actúan en puntos concretos de la cadena respiratoria: la rotenona bloquea el transporte de electrones entre el  $\text{NADH}$  y el coenzima Q, la antimicina inhibe el transporte entre el citocromo b y el citocromo  $c_1$  y el tenoiltrifluoroacetona (TTFA) evita la incorporación de electrones al complejo II (Figura 1).



**Figura 1.** Componentes e inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial

#### 1.4. Permeabilidad mitocondrial transitoria

Hunter DR et al. 1976 describió el proceso irreversible de la permeabilidad mitocondrial transitoria o apertura del poro mitocondrial (MPT), que se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a solutos de tamaño menor o igual a 1500 Da. La apertura de este canal no específico, permite un equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana mitocondrial, disipando el gradiente de protones y desacoplando la cadena respiratoria. Además, se produce un hinchamiento de la mitocondria debido a una hiperosmolaridad de la matriz. Como la membrana interna está invaginada en forma de crestas y posee mayor superficie que la membrana externa, al expandirse el volumen de la matriz puede provocar la permeabilidad y/o la ruptura de la membrana externa (Green DR et al. 2002), liberando las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial.

La caracterización bioquímica de la mitocondria ha permitido la identificación de un poro dependiente de calcio y de voltaje que controla la permeabilidad mitocondrial

(Bernardi P et al. 1994). Este complejo multiproteico se localiza en los lugares de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa, y por tanto, la apertura del poro permite la comunicación entre la matriz mitocondrial y el citosol.

#### ***1.4.1. Componentes del MPT***

No se conoce en su totalidad la composición del poro mitocondrial, aunque se han descrito diversos componentes (Crompton M et al. 2002), los que constituyen el núcleo del poro son el translocador de adeninas (ANT), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la ciclofilina D (CyP-D) y diferentes proteínas que se asocian a esta unidad básica como el receptor de benzodiazepinas, creatina quinasa, hexoquinasa, bax y la glicerol quinasa (Figura 2). A continuación describimos más en detalle los principales componentes :

##### ➤ ANT

Muchos de los agentes que provocan la apertura del poro son ligandos del ANT. Este transportador antiporte, anclado en la membrana interna, que intercambia ADP/ATP es esencial para mantener la carga energética en el citosol. Normalmente el ANT está cerrado pero cuando es ocupado por un sustrato transportable, modifica su conformación donde el lugar de unión ADP/ATP cambia su orientación de la matriz mitocondrial (estado m) a el citosol (estado c). Los ligandos que se unen al ANT en el estado m inhiben el MPT (bongkrelic) mientras que los que se unen en el estado c lo inducen (atractilósido) (Halestrap AP et al. 1990). Pero el ANT, por si sólo, no provoca el MPT ya que requiere de la colaboración de otros componentes como VDAC o Bax.

##### ➤ VDAC

VDAC, la proteína más abundante de la membrana externa mitocondrial, es un canal que permite el paso de solutos de hasta 5kDa de peso molecular hacia los sistemas de transporte específicos de la membrana interna. La formación de los complejos VDAC-ANT mantienen los puntos de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa,

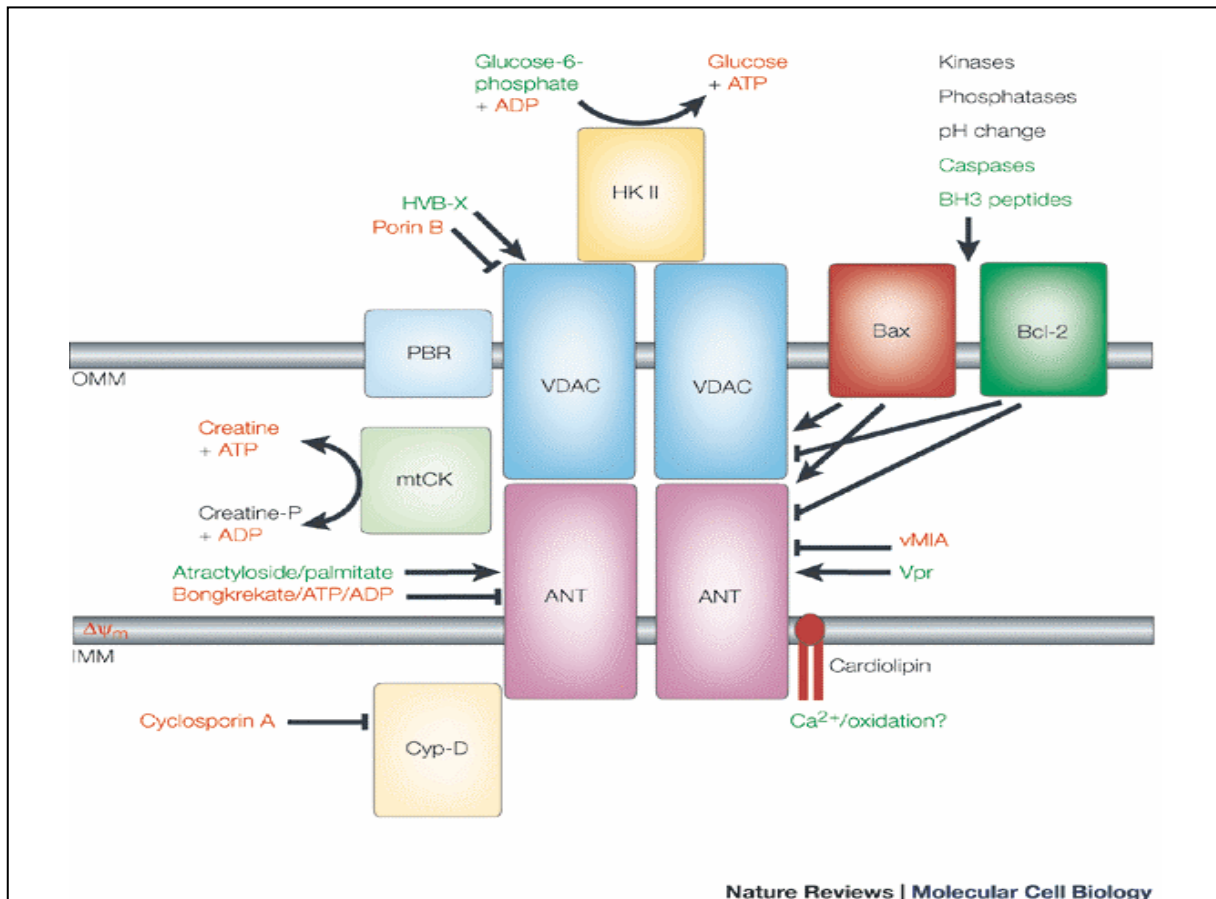
y son imprescindibles para un metabolismo energético celular eficaz. De hecho, este complejo es capaz de reclutar toda una serie de quinasas (hexoquinasa, glicerol quinasa, creatina quinasa) acoplado el uso del ATP en el citosol, con su transporte desde la matriz mitocondrial. También el receptor de benzodiazepinas (PBR) interacciona con VDAC. Esta proteína se encuentra en la membrana mitocondrial externa, y se encarga del transporte de colesterol de la membrana externa a la interna, regulación de la síntesis de esteroides, y del transporte de porfirina (Castedo M et al. 2002). La sobreexpresión celular de PBR y el uso de sus ligandos farmacológicos demuestran su papel regulador en la apoptosis, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Casellas P et al. 2002). Ensayos de reconstrucción y permeabilización de VDAC en liposomas (Shimizu et al. 1999), muestran la participación de otros complejos en el desarrollo del MPT.

#### ➤ CyP-D

La CyP-D es una chaperona con actividad peptidil-prolil-cis-trans isomerasa que está localizada en la matriz mitocondrial. La función celular de la CyP-D es controvertida, pero su actividad catalítica la involucra en el plegamiento y cambio conformacional de ciertas proteínas mitocondriales (Matouschek A et al. 1995). Su integración en el complejo ANT-VDAC se estableció mediante cromatografía de afinidad, y dado que la CyP-D reside en la matriz mitocondrial, la unión sólo puede ser vía ANT. Posteriormente, la reconstrucción del complejo VDAC-ANT-CyP-D en liposomas reprodujo los efectos observados en mitocondria intacta durante el MPT (Crompton M et al. 1998). Desafortunadamente, no se ha generado el ratón deficiente en el poro mitocondrial para evaluar su papel *in vivo*, probablemente porque VDAC y ANT son proteínas esenciales para el correcto funcionamiento celular.

Se ha observado que la ciclosporina (CsA) inhibe la apertura del poro al unirse al centro activo de la CyP-D y así bloquear su interacción con el ANT. Sin embargo, en algunos tipos celulares de origen neuronal, la CsA tan solo es capaz de provocar una inhibición transitoria de la apertura del poro, indicando la existencia de una vía independiente de la CyP-D para el MPT (Andreyev A et al. 1999). Células que sobreexpresan la CyP-D son menos sensibles al daño mediado por el estrés oxidativo,

manteniendo la funcionalidad mitocondrial (Lin DT et al. 2002), sugiriendo que la CyP-D interacciona con las proteínas del poro evitando que se produzcan modificaciones en sus componentes debida a la acción de los radicales libres (Kim JS et al. 2003).



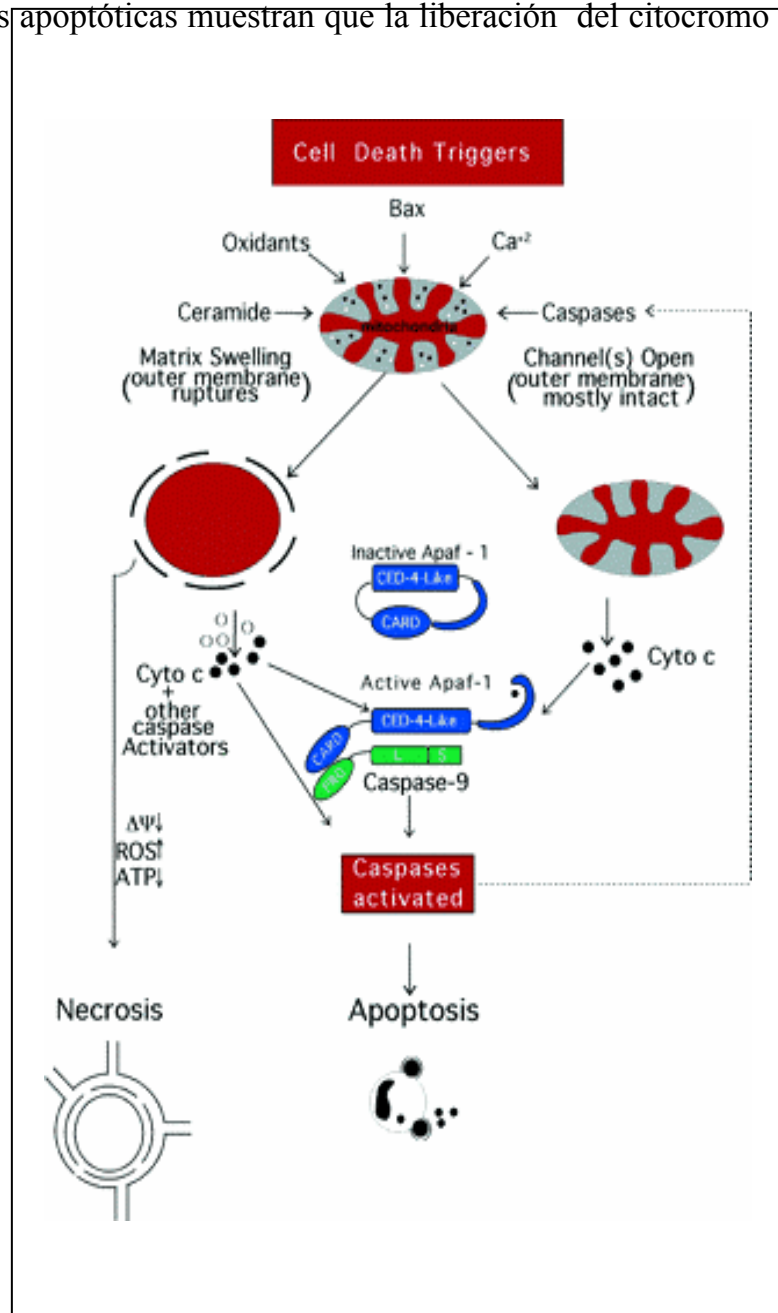
**Figura 2.** Componentes y reguladores del MPT

### 1.4.2. MPT y muerte celular

La apoptosis y la necrosis son dos modalidades de muerte celular, que se distinguen claramente por sus características morfológicas y bioquímicas. A pesar de que el proceso apoptótico y los factores que lo desencadenan no son del todo conocidos, se tiende a pensar que la apoptosis y la necrosis representan los dos extremos de un proceso continuo, ya que ambos tipo de muerte ocurren simultáneamente en tejidos expuestos al mismo estímulo. El MPT ha mostrado jugar un papel clave tanto en la muerte por apoptosis como por necrosis (Kim JS et al. 2003). Si el proceso del MPT es general, afectando a la mayoría de mitocondrias en la célula y la vía

glicolítica está comprometida, los niveles de ATP celular disminuyen y esto provoca la muerte necrótica. En cambio, si el proceso progresa de manera más lenta donde la glicólisis sea capaz de mantener los niveles de ATP, se produce un colapso del potencial de membrana, hinchamiento mitocondrial, permeabilización o ruptura de la membrana externa y la liberación no regulada de las proteínas solubles del espacio intermembrana mitocondrial, dando lugar a la muerte apoptótica. Estudios de inmunofluorescencia en células apoptóticas muestran que la liberación del citocromo

*c* de 15kDa (Liu X et al. 1996) y Smac/DIABLO de 23kDa (Green D et al. 2002) al citosol, se produce al mismo tiempo que otras proteínas de mayor peso molecular como el factor inductor de apoptosis o AIF de 53kDa, Omi/HtrA2 de 39kDa (Yang Q-H et al. 2003) y las caspasas mitocondriales de tamaño alrededor 50 kDa (Susin SA et al. 1999). El factor AIF trasloca al núcleo, donde estimula (independiente de ATP y de caspasas) la degradación del ADN en fragmentos de alrededor de 50 kb y la condensación de la cromatina (Susin SA et al. 1999). En el citosol, la unión de dATP / ATP a Apaf-1 provoca un cambio de



**Figura 3.** El MPT regulador de la muerte apoptótica y necrótica

conformación que permite la unión al citocromo *c*. Esto favorece el reclutamiento de la procaspasa 9 que en presencia de ATP forma el complejo llamado apoptosoma. Debido a la actividad autocatalítica de este complejo, la caspasa 9 (señalizadora) es capaz de activar al resto de caspasas 3 (efectora), 6 y 7 (Rodríguez J et al. 1999), que gracias su actividad proteolítica son letales para la célula. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) suprimen la muerte celular al unirse e inhibir a las caspasas 3, 7 y prevenir la activación de la procaspasa 9 (Deveraux QL et al. 1999). Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 interaccionan con el dominio BIR de las IAPs facilitando al apoptosoma la activación de la cascada de caspasas efectoras (Chai J et al. 2000).

Por lo tanto, en situaciones donde el ATP celular está disminuido durante la etapa inicial del proceso apoptótico, el apoptosoma no se puede formar y las células mueren por necrosis (Chautan M et al. 1999).

### ***1.4.3. Reguladores del MPT***

#### ➤ Proteínas de la familia Bcl-2/Bax

Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) están anclados en diferentes membranas (mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo) a través del dominio hidrofóbico carboxi-terminal. Por otro lado, los factores proapoptóticos de esta misma familia: Bax, Bid, Bak y Bim residen principalmente en el citosol y translocan a la mitocondria intercalándose en la membrana mitocondrial externa para iniciar el proceso apoptótico. Bid es hidrolizado por la caspasa 8 y su unión a Bax o Bak provoca un cambio conformacional en estas proteínas, permitiendo su inserción en la membrana mitocondrial externa, donde oligomerizan formando canales. La relevancia de estos dos miembros, se ha mostrado en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en Bax y Bak que son resistentes a un amplio panel de agentes inductores de la muerte celular por apoptosis (Wei MC et al. 2001).

Bim y Bak pueden heterodimerizar con Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> bloqueando su función antiapoptótica (Desagher S et al. 2000, Puthalakath H et al. 1999). Los miembros de esta familia pueden formar tanto canales de forma autónoma (Eskes R et al. 1998) como colaborar con los componentes del poro mitocondrial (Martinou JC et al. 2001).

Recientemente se ha descrito que Bax y Bcl-2 regulan el MPT a través de su interacción con ANT y que son capaces de modificar su función como transportador antiporte de ADP/ATP (Belzacq AS et al. 2003).

➤ Calcio

La mitocondria está implicada en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Un exceso de calcio en la célula, se puede compensar de forma eventual al aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, como se observa tras la señalización entre células o la estimulación por citoquinas. La mayoría de agentes apoptóticos, provocan un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, que al acumularse en la mitocondria disminuye el potencial de membrana, provocando la generación de ROS, despolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo *c* y posterior muerte celular (Kruman I et al. 1998). Bcl-2 aumenta la permeabilidad del retículo endoplasmático (RE) para el  $\text{Ca}^{2+}$ , reduciendo su acumulación en la mitocondria (Murphy RC et al. 2001). Por otro lado, un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , activa la fosfatasa calcineurina que desfosforila a Bad causando su translocación a la membrana mitocondrial (Wang HG et al. 1999).

➤ Composición lipídica y fluidez de la membrana mitocondrial

La membrana mitocondrial tiene una composición lipídica peculiar con bajos niveles de colesterol, y es la única membrana eucariota que contiene cardiolipina. Este fosfolípido determina la inserción de Bid en la membrana mitocondrial (Lutter M et al. 2000). Recientemente se ha demostrado que la producción endógena de ROS por parte de la mitocondria favorece la liberación del citocromo *c* al peroxidar la cardiolipina (Petrosillo G et al. 2003). Por otro lado, las propiedades dinámicas de la bicapa están vinculadas al MPT. Se ha descrito que la formación del poro depende de la fluidez de la membrana mitocondrial (Ricchelli F et al. 1999), y en esta línea, la inserción de Bax aumenta la difusión de los lípidos en la bicapa lipídica mitocondrial (Epanand RF et al. 2003).

➤ Generación de ROS

Varios compuestos inducen la expresión de las enzimas de la cadena respiratoria, incrementando los ROS y provocando la muerte celular vía MPT (Chandra D et al.



2002). Los productos derivados de la peroxidación lipídica, como el hidroxinonenal (HNE), consecuencia de la generación de ROS/NOS, inducen MPT tanto *in vitro* como *in vivo* (Moncada S et al. 2002). En células endoteliales, la hipoxia/reperfusión estimula la sobreproducción del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno, generados por la xantina oxidasa (XO), que son claves para la apertura del poro. Evidencia de ello es la observación de que la inhibición de la XO con alopurinol previene la muerte celular.

Los radicales libres son capaces de provocar el MPT al oxidar los tioles de las proteínas del poro (Chernyak BV et al. 1996). Por ejemplo, se ha observado que el anión superóxido provoca el MPT, independiente de Bax y Bak, al interactuar con VDAC (Madesh M et al. 2001).

#### ➤ Mensajeros lipídicos

La ceramida generada en la membrana plasmática por la acción de las esfingomielinasas o por la activación de la ceramida sintasa, reduce la concentración umbral de  $Ca^{2+}$  necesario para el MPT (Szalai G et al. 1999). Estudios en mitocondria aislada de hígado de rata, han mostrado que la ceramida es capaz de inducir directamente la apertura del poro debido a su interacción con el complejo III de la cadena respiratoria que provoca la generación de ROS (García-Ruiz C et al. 1997).

El gangliósido GD3, derivado de la ceramida, es un potente inductor del MPT independiente de  $Ca^{2+}$ , tanto en mitocondria aislada como *in situ* (Scorrano L et al. 1999, Garcia-Ruiz C et al. 2000) y este efecto es inhibido por Bcl-2 (Rippo MR et al. 2000).

Por otro lado, ácidos grasos saturados como el palmitato, que se acumula en la isquemia de corazón, provocan el MPT en mitocondria aislada, al interactuar con el ANT (Kroemer G et al. 1998).

## **2. GLUTATION**

El glutatión (GSH) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en la célula, en concentraciones del orden milimolar, con gran eficacia estructural y que participa

activamente en numerosos procesos de desintoxicación. Se trata de un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato y glicina, responsables de su destino metabólico, y la cisteína donde su grupo sulfhidrilo (-SH), gracias a su potencial reductor, es el responsable de sus funciones metabólicas.

## 2.1. Síntesis de glutathion

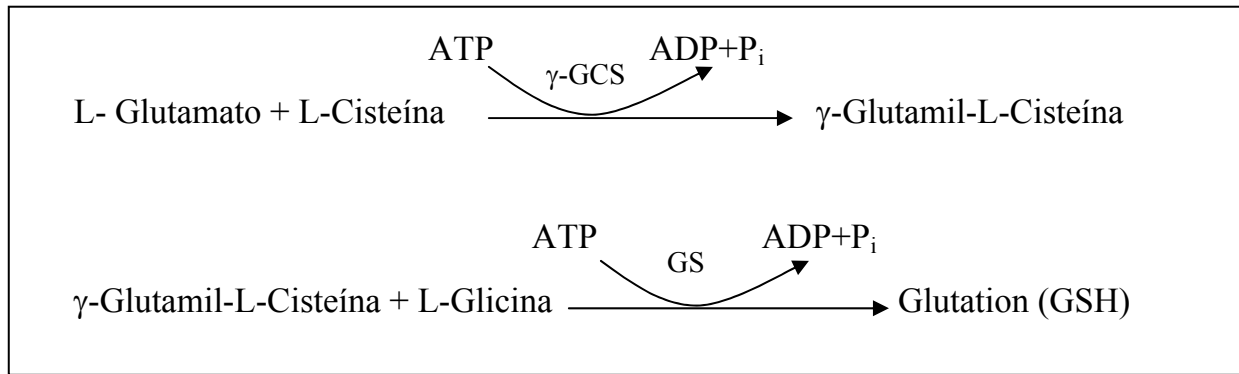
El GSH se sintetiza en todas las células de mamíferos, pero los principales órganos encargados de la homeostasis del GSH son el hígado, el pulmón y el riñón.

Su biosíntesis es el resultado del acoplamiento secuencial de dos reacciones enzimáticas dependientes de ATP, catalizadas por los enzimas:  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y la GSH sintetasa (GS) (Meister A et al. 1989).

El primer paso en la síntesis del GSH es la unión del glutamato y la cisteína a través del grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato, que a diferencia del clásico enlace peptídico mediante el grupo  $\alpha$ -carboxilo, le confiere resistencia a la hidrólisis por peptidasas. La única peptidasa capaz de hidrolizar al GSH es la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa, enzima encargada de su transporte y presente en la superficie externa de ciertos tipos celulares. Esta reacción catalizada por la  $\gamma$ -GCS, es la etapa limitante de la síntesis de GSH. La enzima requiere de  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  para su actividad, presenta especificidad hacia el glutamato y es inhibida por concentraciones fisiológicas de GSH, al competir por el sitio de unión al glutamato, y por la disponibilidad de su precursor la cisteína. La actividad de la  $\gamma$ -GCS puede ser inhibida específicamente y de forma irreversible por la butionina L-sulfoximina (Griffith OW et al. 1979).

Recientemente, Shi ZZ et al. 2000 han observado que el ratón deficiente en la  $\gamma$ -GCS no es viable, demostrando que la síntesis de GSH es indispensable durante las etapas iniciales del desarrollo en mamíferos.

Finalmente, la síntesis se completa con la unión de glicina al dipéptido  $\gamma$ -glutamylcisteína a través de la enzima GSH sintetasa que no es retroinhibida por el glutathion. La glicina, como aminoácido terminal, es básica en la especificidad estructural de las enzimas dependientes de GSH y confiere protección frente a la degradación intracelular producida por la  $\gamma$ -glutamylciclotransferasa (Meister A 1988).



**Figura 4.** Síntesis de glutatión

## 2.2. Funciones del glutatión

La concentración intracelular de GSH es un indicador muy sensible de la funcionalidad y viabilidad celular. De hecho, el desarrollo de diferentes patologías se ha visto acompañado de una disminución de los niveles de glutatión (Wu G et al. 2004). Las principales funciones son:

➤ Almacenamiento de cisteína

La cisteína en plasma es rápidamente autooxidada a cistina, fenómeno que implica una marcada toxicidad. La disminución de este efecto nocivo se consigue controlando los niveles de cisteína libre o mediante el almacenamiento de ésta en forma de GSH, cuyo grupo –SH es menos lábil que el de la cisteína libre (Cooper AJ 1983). De manera que cuando el GSH es hidrolizado extracelularmente se recupera la cisteína.

➤ Desintoxicación

La desintoxicación de xenobióticos o sus metabolitos es una de las principales funciones del GSH. Estos compuestos electrófilos se conjugan con el GSH, tanto de manera espontánea como catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST), dando lugar a mercapturatos que serán posteriormente eliminados.

➤ Reducción de peróxidos de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y peróxidos orgánicos

Si el peróxido de hidrógeno no es reducido a agua, en presencia de ciertos metales de transición ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), puede dar lugar a través de la reacción de Haber-Weiss, a la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), altamente reactivo y responsable de la formación de peróxidos lipídicos. La GSH peroxidasa dependiente de selenio cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua utilizando el GSH como cofactor, dando lugar a la formación de la especie oxidada de glutatión (GSSG). En presencia de NADPH, el GSSG es reducido de nuevo por la GSH reductasa, estableciéndose de esta manera el denominado ciclo redox del GSH .

➤ Integridad grupos tioles

Mantenimiento de los niveles de tioles esenciales en proteínas, previniendo su oxidación o reduciendo uniones disulfuros inducidas por el estrés oxidativo.

➤ Conjugación con compuestos endógenos, como los intermediarios del metabolismo de las prostaglandinas, leucotrienos y varias hormonas

➤ Modulación de procesos relacionados con los microtúbulos

➤ Reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos

### **2.3. Glutation mitocondrial**

El GSH es sintetizado en el citosol celular y su disponibilidad en los diferentes compartimentos celulares está determinada por complejas interacciones entre su utilización, transporte, síntesis y la tasa de reducción del GSSG a GSH (Wahllander A et al. 1975). El glutatión mitocondrial (mGSH) constituye entre un 10-15% del total celular y se encuentra en una concentración similar a la del citosol, de 9-12 mM (Garcia-Ruiz C et al. 1994).

#### ***2.3.1 Funciones del GSH mitocondrial***

➤ Reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en la respiración mitocondrial

Como consecuencia del metabolismo aeróbico celular se generan radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproductos de la respiración mitocondrial, especies reactivas que pueden conducir a la oxidación de lípidos de membrana y otras macromoléculas e interfiriendo en procesos metabólicos. Puesto que la mitocondria carece del enzima catalasa, la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende exclusivamente del glutation mitocondrial y de la actividad de la enzima GSH peroxidasa (Fernandez-Checa JC et al. 1997).

➤ Mantenimiento de la viabilidad celular

El glutation mitocondrial (mGSH) tiene un papel fundamental en la viabilidad celular (Fernandez-Checa JC et al. 1998). Por ejemplo, se ha observado que la disminución selectiva de los niveles de mGSH es un evento que precede a la muerte apoptótica en timocitos (Macho A et al. 1997) y sensibiliza a los hepatocitos frente al estrés oxidativo y TNF- $\alpha$  (Colell A et al. 1998, Fernandez-Checa JC et al. 1989). Además de jugar un papel clave en el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial a través de la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, manteniendo los grupos sulfhidrilos en estado reducido (Armstrong JS et al. 2002).

### ***2.3.2. Propiedades del transporte mitocondrial de GSH***

El transporte de GSH a la mitocondria, es energéticamente desfavorable porque el GSH al pH fisiológico es un anión, y la matriz mitocondrial tiene carga negativa comparada con el citosol. Este hecho junto a los resultados observados tras la expresión funcional del transportador de mGSH, descarta la posibilidad de que el transporte de glutation del citosol a la mitocondria sea por simple difusión. A pesar de la gran cantidad de estudios cinéticos y funcionales del transportador de GSH mitocondrial, su caracterización molecular no ha sido posible hasta la fecha. En 1990 Martensson J et al. describieron un sistema de transporte del GSH en mitocondria de hígado de rata, formado por dos componentes dependientes de ATP: uno de alta afinidad, saturable a 1-2mM de GSH y otro de baja afinidad pero gran capacidad.

Estos valores cinéticos y su estimulación por ATP han sido corroborados por otros trabajos (Collel A et al. 1997). Posteriormente se ha descrito la cis inhibición del transporte del GSH a la mitocondria por parte del glutamato y del malato, sin ver ningún efecto de los ácidos monocarboxílicos (Chen Z et al. 1998, 2000). Estos resultados sugieren la participación de los transportadores de glutamato en el transporte de GSH. Sin embargo parece poco probable, porque ambos transportadores antiporte glutamato/hidroxilo y glutamato/aspartato no presentan diferentes componentes, y sus  $K_m$  son de 4 y 6mM respectivamente (Dennis SC 1977), diferentes de los valores descritos para el transporte mitocondrial de GSH. Estudios centrados en la purificación y reconstitución de la actividad del transportador de mGSH procedente de mitocondria de riñón de conejo, indican que tanto el butilmalonato y el fenilsuccinato, así como otros sustratos para los transportadores de los ácidos dicarboxílicos (DIC) y 2-oxoglutarato (OGC), inhiben el transporte de mGSH, mientras que los sustratos para los transportadores de ácidos mono y tricarboxílicos no tienen ningún efecto (Chen Z et al. 2000). Esto sugiere un papel funcional de los transportadores DIC/OGC en el transporte de GSH mitocondrial. En un estudio más reciente (Coll O et al. 2003), la expresión del transportador de 2-oxoglutarato en mitocondria de oocito de *Xenopus laevis*, relaciona directamente el papel de este transportador con el transporte de mGSH. De hecho, se muestra que el transporte mitocondrial de GSH por el OGC tiene unos valores cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) similares al componente de baja afinidad del transporte de GSH mitocondrial, indicando la participación de otros transportadores mitocondriales en el transporte de alta afinidad del mGSH.

Los trabajos de reconstitución en proteoliposomas y la sobreexpresión del transportador DIC en células NRK, muestran su participación en el transporte de mGSH (Lash LH et al. 2002), pero hasta el momento no se han realizado estudios para establecer los valores cinéticos de este transporte.

El reciente clonaje de dos isoformas de los transportadores mitocondriales de oxodicarboxilato Odcp1 y Odcp2 (Fiermonte G et al. 2001, Palmieri L et al. 2001), abren la puerta al estudio de su papel en el transporte mitocondrial de GSH.

### **3. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

El retículo endoplasmático juega un papel central en la biosíntesis celular. Su membrana es el lugar de producción de todas las proteínas transmembrana y de los lípidos de la mayoría de orgánulos celulares. Aproximadamente un tercio de todas las proteínas celulares translocan al lumen del RE donde se pliegan, oligomerizan y sufren modificaciones post-transcripcionales. El RE es extremadamente sensible a alteraciones en su homeostasis, y frente a diferentes estímulos es capaz de activar cascadas de señalización que convergen en el citoplasma o en el núcleo, resultando en una respuesta de adaptación para la supervivencia o la inducción de la muerte apoptótica.

#### **3.1. Estrés en el RE**

El lumen del RE proporciona un ambiente oxidante en donde residen las chaperonas, enzimas no sólo encargadas de catalizar el plegamiento de proteínas, sino que también evitan la agregación y estabilización de conformaciones polipeptídicas desfavorables energéticamente para el correcto plegamiento (Dill KA et al. 1997). Dado que este proceso, altamente regulado, es esencial en el procesamiento de las proteínas, la falta de glucosa o la inhibición de la glicosilación proteica (p.ej. con la tunicamicina), provoca un cúmulo de proteínas no plegadas que activa una vía de señalización intracelular hacia el núcleo, denominada la respuesta a proteínas no plegadas o UPR (Mori K 2000). Esta respuesta adaptativa se caracteriza por la expresión de diferentes genes, entre ellos, los que codifican diferentes chaperonas cuyo objetivo sería corregir esta deficiencia en el plegamiento proteico (Travers KJ et al. 2000). El factor nuclear GADD153 (C/EBP proteína homóloga, o bien CHOP) es uno de los marcadores clásicos del estrés en el RE (Wang XZ et al. 1996). Aunque su función en el UPR podría ser redundante, ya que ratones deficientes en GADD153 muestran una respuesta normal frente al estrés en el RE, su papel es clave para la muerte celular por apoptosis inducida por agentes como la tunicamicina que promueven estrés en el RE (Zinszner H et al. 1998). La asociación entre la activación del UPR y la biosíntesis de

lípidos fue observada inicialmente en levaduras (Cox JS et al. 1997). Posteriormente, Werstuck GH et al. 2001 mostraron en células humanas que la homocisteína (agente inductor de estrés en el RE) aumentaba los niveles de colesterol y triglicéridos a través del UPR, estimulando la expresión de factores transcripcionales como las proteínas reguladoras de la unión al esterol (SREBP-1 y 2) y GADD153. El factor nuclear SREBP-1 se encuentra unido a la membrana del RE y para su activación requiere de proteólisis para liberarse de la membrana (Brown M et al. 1999). Tras ello, el dominio amino terminal transloca al núcleo, donde activa la expresión de genes implicados en la síntesis de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos insaturados, así como aumentando la captación de lípidos por parte de la célula (Horton JD et al. 2002). Entre todos los genes inducidos tras la unión del factor SREBP-1 al DNA, cabe destacar la enzima HMG-CoA reductasa, que participa en la etapa limitante de la síntesis de colesterol.

#### **4. HIPOXIA**

Las células de mamíferos son capaces de detectar una disminución en la disponibilidad de O<sub>2</sub> y activar una respuesta adaptativa mediada por la regulación transcripcional de diferentes genes. La respuesta universal a niveles bajos de O<sub>2</sub>, es la expresión del factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF). Por tanto, HIF representa la unión entre el sensor del oxígeno y los efectores celulares, tanto a nivel local como sistémico. Este factor nuclear activa genes que codifican tanto para la eritropoyetina (EPO), que estimula la producción de glóbulos rojos, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que activa la angiogénesis, ambos con la función de aumentar el aporte de O<sub>2</sub>; así como para los transportadores de glucosa, Glut1 y Glut3, y enzimas glicolíticos que facilitan la producción de ATP en ausencia de O<sub>2</sub> (Semenza G. 1998). Esta capacidad de adaptación a cambios en la tensión de oxígeno, indica la presencia de un sensor celular acoplado a una vía de transducción de señal intracelular. Inicialmente se presentó como sensor la enzima NADPH oxidasa (Acker H 1994), pero posteriormente Wenger RH et al. 1996 observaron que células deficientes en la subunidad gp91<sup>phox</sup> de la NADH oxidasa, mostraban una respuesta normal frente a la



hipoxia. También se involucró la citocromo P450 reductasa ya que su regulación durante la hipoxia modulaba los niveles de la EPO (Harder DR et al. 1996). Pero esta hipótesis se descartó, al no intervenir en la regulación de HIF-1 $\alpha$  y VEGF (Agani F et al. 1998) y tras no confirmarse su participación por análisis espectrofotométrico (Ehleben W et al. 1998). Por último, diversos grupos independientes concluían que la mitocondria actuaba como sensor al generar radicales libres desde la cadena respiratoria mitocondrial. De hecho, células  $\rho^0$  (carecen de un ADN mitocondrial funcional) no responden a la hipoxia. Sin embargo, se desconoce la subunidad de la cadena respiratoria responsable de la generación de radicales libres. Se han propuesto el complejo I (Agani F et al 2000), el complejo II de la cadena respiratoria (Paddenberg R et al. 2003) o a una disminución de la Vmax de la citocromo oxidasa (Chandel NS et al 1997) como posibles responsables de la sobreproducción de ROS durante la hipoxia.

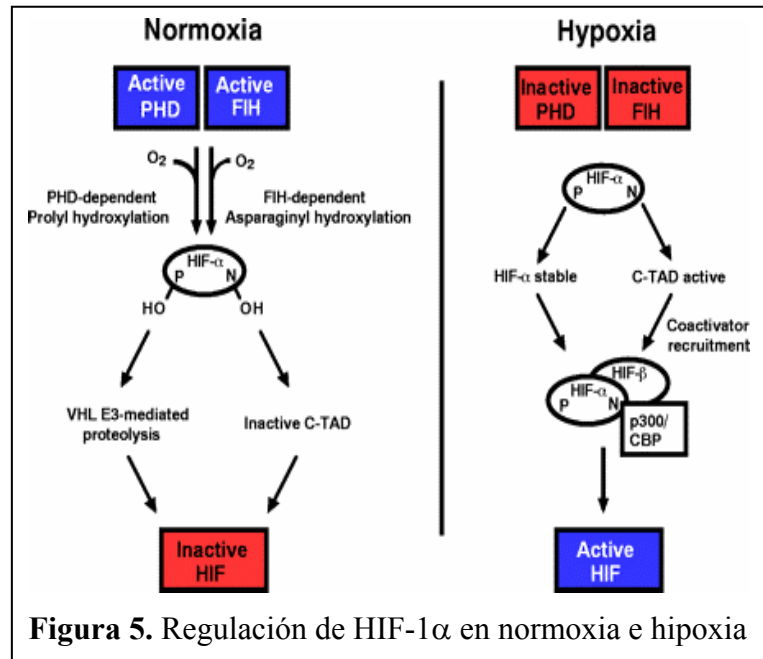
La generación mitocondrial de ROS en células hipóxicas activa la vía redox intracelular, que culmina en una amplia respuesta de adaptación mediada por la activación de factores de transcripción como HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, AP-1 y p53 (Chandel NS et al. 1998, 2000). Recientemente, se han implicado las HIF proilil/asparragin hidroxilasas, dado que su actividad está restringida por la presencia de oxígeno y actúan sobre el dominio de degradación dependiente de oxígeno del HIF, provocando su degradación por el proteosoma en condiciones de normoxia (Jaakkola P et al. 2001, Ivan M et al. 2001). Por tanto, la cuestión que permanece por aclarar en este campo es si existen múltiples sensores en una misma célula, si depende del tipo celular o si un único sensor universal media las diversas respuestas celulares frente la hipoxia. La evidencia de que los niveles de VEGF aumentan durante la hipoxia, pero no sólo debido a un aumento en la expresión génica, sino también a una mayor estabilidad de su mARN (Stein I et al. 1995) y una mayor exportación de la proteína (Osaka K et al. 2001) y el hecho de que los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y p53 son activados durante la hipoxia por una vía diferente a la del factor HIF, apuntan a la coexistencia de diferentes sensores celulares frente a la hipoxia (Schumacker PT 2003).

## 4.1. Hipoxia y transcripción génica: HIF y NF- $\kappa$ B

### 4.1.1. HIF

La respuesta a la hipoxia mediada por HIF juega un papel clave en el desarrollo de diferentes patologías como en la isquemia pulmonar y de miocardio, la hipertensión pulmonar y la tumorigénesis (Semenza G 2000). HIF es un factor de transcripción heterodimérico, compuesto por la subunidad constitutiva HIF- $\beta$  (o ARNT) y la subunidad inducible HIF- $\alpha$ , donde su expresión y actividad transcripcional está regulada por la concentración de O<sub>2</sub>. Se han identificado tres isoformas de la subunidad  $\alpha$  codificadas por diferentes loci genéticos : HIF-1 $\alpha$  (Wang GL et al. 1993), HIF-2 $\alpha$  (Ema M et al. 1997) y HIF-3 $\alpha$  (Gu YZ et al. 1998). A pesar de la similitud estructural y funcional de las isoformas, el HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  tienen un patrón de expresión mucho más restringido que el factor HIF-1 $\alpha$ . El ratón con un alelo mutado para el HIF-1 $\alpha$  tiene un desarrollo normal, pero muestra una respuesta alterada frente a la hipoxia crónica (Yu A et al. 1999). De hecho, al factor HIF-1 $\alpha$ , se le atribuye la mayor parte de la respuesta adaptativa de la célula frente a la hipoxia. En condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  tiene una vida media extremadamente corta (<5 min) y su nivel basal es indetectable, mientras que durante la hipoxia se almacena en el citosol en función del tiempo de exposición y del grado de hipoxia. El responsable de esta regulación proteolítica es la región del factor HIF-1 $\alpha$  llamado dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), que contiene el lugar de reconocimiento de la proteína supresora de tumores de von-Hippel-Lindau (pVHL). En presencia de O<sub>2</sub>, hay una hidroxilación de las prolinas 402 y 564 en el ODD, que permite la interacción con pVHL y la ubiquitinación de este complejo multiprotéico, provocando su degradación por el apoptosoma (Masson N et al. 2001). En este sentido, células deficientes en pVHL, expresan el factor nuclear HIF-1 $\alpha$  y sus genes diana de forma constitutiva (Maxwell PH et al 1999). Existe un segundo nivel de regulación mediado por la hidroxilación en la asparragina 803 del ODD, que no permite el reclutamiento del complejo activador de la transcripción p300/CBP por parte del factor HIF-1 $\alpha$ , y por

tanto dejándolo sin capacidad transactivadora (McNeill LA et al. 2002). Esta HIF proлил/asparragin hidroxilasa para su actividad requiere de los cofactores :  $O_2$  , 2-oxoglutarato y  $Fe^{2+}$  (Figura 5). Por tanto, en condiciones de baja concentración de  $O_2$ , el factor HIF-1 $\alpha$  se acumula en el citoplasma y dimeriza con



la subunidad HIF-1 $\beta$ ; hecho que facilita su traslocación al núcleo, y gracias a su interacción con el complejo p300/CBP, estimula la expresión de los genes diana. Se ha especulado sobre la posibilidad de que los radicales libres que se generan en la mitocondria durante la hipoxia, actúen como reguladores de estas hidroxilasas (Schumacker PT 2003) y sobre la oxidación de las cisteínas del dominio ODD del factor HIF-1 $\alpha$ .

#### 4.1.2. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional redox sensible identificado, inicialmente, como una proteína de origen linfoide, que reconoce a la región *consensus* GGGACTTCC presente en el promotor del gen de la cadena ligera  $\kappa$  (Sen R et al. 1986). La regulación de NF- $\kappa$ B es posttranscripcional, ya que se encuentra en el citoplasma de forma inactiva asociada a una proteína inhibidora de la familia I $\kappa$ B. Frente a diferentes estímulos, se produce la liberación de la proteína inhibidora, que permite a NF- $\kappa$ B migrar al núcleo celular y regular la expresión génica. NF- $\kappa$ B forma parte de una familia de factores transcripcionales diméricos que poseen dominio de homología Rel, y a través de ellos se unen al ADN, interaccionan unas subunidades con otras y con las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B.

La familia Rel de proteínas comprende dos grupos que se clasifican en base a su estructura, función y modo de síntesis (Muller CW et al. 1995).

- Grupo I : del que forman parte las proteínas p50 y p52. Sintetizadas a partir de sus proteínas precursoras p105 y p100, respectivamente. Las proteínas maduras se caracterizan por la presencia de un dominio de homología Rel de aproximadamente 300 aminoácidos y que incluye la región de unión al ADN.
- Grupo II: incluye las proteínas Rel A (p65), c-Rel, Rel B y la proteína dorsal de *Drosophila*, que además de poseer el dominio Rel, tienen dominios con capacidad activadora de la transcripción. La familia Rel/NF- $\kappa$ B puede formar homo o heterodímeros. El dímero p65/p50 es el más común y p65 es la subunidad con mayor capacidad transactivadora. La dimerización es importante funcionalmente, ya que es necesaria para la posterior unión al ADN del factor nuclear activado.

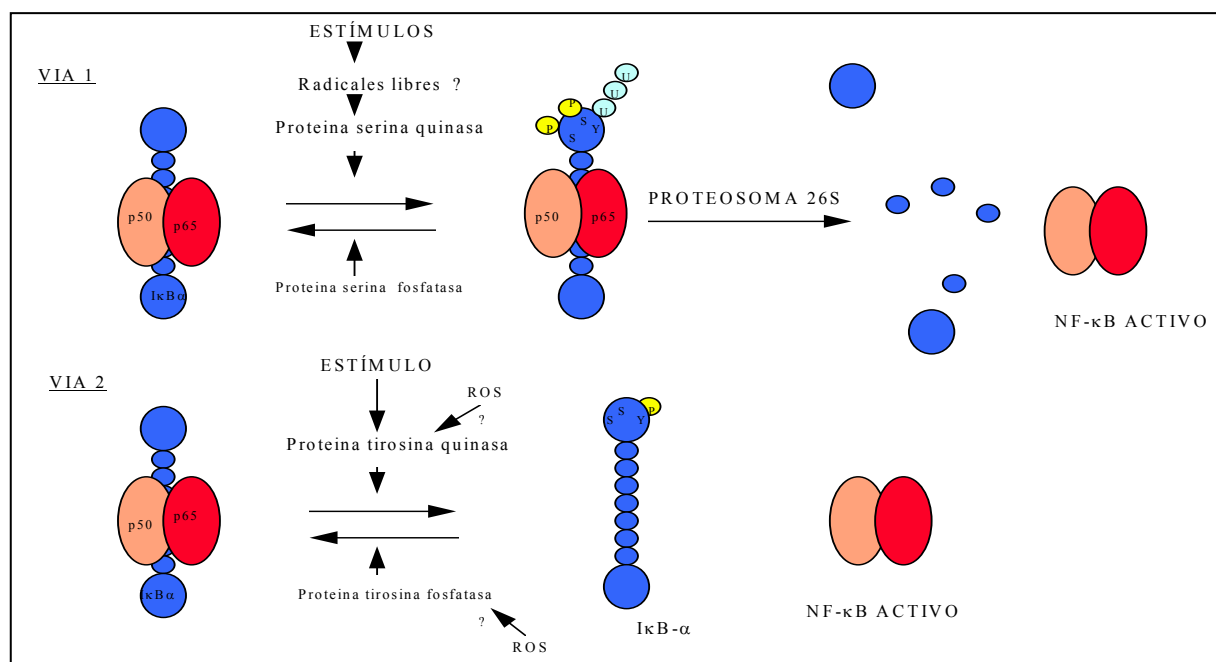
Las señales activadoras de NF- $\kappa$ B provocan la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , lo que resulta en la disociación del complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ghosh S et al. 1990). La fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  en los residuos serina 32 y 36 del extremo amino terminal, es mediada a través de la quinasa específica para I $\kappa$ B (IKK). Una vez I $\kappa$ B- $\alpha$  es fosforilada, ésta será ubiquitinada selectivamente en residuos lisina, y posteriormente, degradada por el proteosoma 26S (Mercurio F et al. 1999). La disociación de I $\kappa$ B- $\alpha$  permite que quede libre la región del extremo carboxi terminal que incluye la señal de localización nuclear de NF- $\kappa$ B, con lo que rápidamente translocará al núcleo donde regula la transcripción de sus genes diana. Por otro lado, en 1994 dos trabajos mostraron la fosforilación en tirosina de I $\kappa$ B- $\alpha$  frente a dos estímulos independientes: durante el proceso de activación de los neutrófilos (Druker BJ et al. 1994) y en respuesta a la hipoxia (Koong AC et al. 1994), pero el significado de estas modificaciones no estaba claro. Finalmente, Imbert V et al. 1996 mostraron que la fosforilación en el residuo tirosina 42 de I $\kappa$ B- $\alpha$  no resulta en su degradación, pero sí en su liberación del complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$ , permitiendo la activación de NF- $\kappa$ B (Figura 6). Trabajos recientes implican a la Lck (p56<sup>lck</sup>), una tirosin quinasa de la familia Src, como responsable de esta modificación (Mahabeleshwar GH et al. 2003, Fan C et al. 2003),

aunque faltan experimentos concluyentes que muestren la capacidad de esta quinasa de fosforilar *in vitro* a I $\kappa$ B- $\alpha$  en la Tyr42.

También se ha observado otra vía de regulación de NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación directa de sus diferentes subunidades, principalmente p65, aunque falta por determinar su relevancia fisiológica (Schmitz ML et al. 2001).

Los radicales libres generados en la mitocondria, regulan la activación del factor NF- $\kappa$ B (García-Ruiz et al. 1995). Estos ROS, como segundos mensajeros, actúan a diferentes niveles regulando la activación de tirosin quinazas como Lck (Hardwick JS et al. 1997), las quinazas IKKs (Deng L et al. 2001) y el grado de oxidación de las cisteínas del dominio Rel en las diferentes subunidades del factor NF- $\kappa$ B (Kumar S et al. 1992).

NF- $\kappa$ B regula la expresión de genes envueltos en la respuesta inmune, la inflamación, y la defensa celular. Entre ellos cabe destacar: citoquinas (TNF- $\alpha$ ), receptores de citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento hematopoyéticos y una gran cantidad de genes antiapoptóticos (Pahl HL 1999). El ratón deficiente en la subunidad p65/RelA muere durante las primeras etapas desarrollo embrionario por una apoptosis masiva en el hígado, implicando a NF- $\kappa$ B en la regulación de la muerte celular (Beg A. et al. 1995). NF- $\kappa$ B activa la expresión de los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl- $x_L$  y Bcl-2) y de la familia IAPs (c-IAP1, c-IAP2 y XIAP) (Kucharczak J et al. 2003).



**Figura 6.** Modelo de activación de NF- $\kappa$ B. *Vía 1:* activación de NF- $\kappa$ B a través de la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Una serin quinasa fosforila a I $\kappa$ B- $\alpha$  en los residuos serina 32 y 36, además, I $\kappa$ B- $\alpha$  también es señalizada con ubiquitinas, lo que la convierte en una diana para el proteosoma. *Vía 2:* activación de NF- $\kappa$ B mediada por la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  en tirosina 42.

## **5. HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA**

La hepatopatía alcohólica es un proceso multifactorial y los mecanismos implicados en su desarrollo no son del todo conocidos. Aunque la asociación entre el consumo crónico de alcohol y la aparición de enfermedades hepáticas es conocida desde la antigüedad, su relación directa con la enfermedad hepática alcohólica no fue establecida hasta mediados del siglo pasado (Jolliffe N et al. 1941). Estudios epidemiológicos muestran que sólo una proporción relativamente reducida de casos tienen lesiones hepáticas intensas (30-40%), a pesar de una duración y magnitud similar en la ingesta de alcohol, indicando la importancia de otros factores como los genéticos y nutricionales.

La enfermedad hepática inducida por el alcohol puede ser considerada como un desorden crónico, en el cual las células responden de forma inapropiada a estímulos que originalmente no eran nocivos. Una ingesta crónica de etanol, desencadena una complicada interrelación de sucesos que dan lugar a la progresión de la enfermedad, desde la esteatosis o hígado graso a la cirrosis.

### **5.1. Metabolismo del etanol**

El alcohol ingerido es rápidamente absorbido en el estómago y en el intestino delgado, de manera que la máxima concentración plasmática se registra a los 30 minutos. Únicamente alrededor de un 10% del etanol absorbido es eliminado a través de los riñones, pulmones y de la piel, mientras que el resto es metabolizado en el hígado. El

hepatocito dispone de tres sistemas enzimáticos capaces de oxidar el etanol a acetaldehído, que están localizados en diferentes compartimentos celulares:

### **5.1.1. Alcohol deshidrogenasa (ADH)**

La ADH, presente en el citosol, es una metaloenzima dependiente de zinc capaz de oxidar a diversos alcoholes alifáticos y a un número limitado de alcoholes cíclicos, dando lugar a los aldehídos correspondientes. En la oxidación del alcohol catalizada por ADH se transfiere el hidrógeno del sustrato al cofactor NAD, convirtiéndolo en NADH y produciendo acetaldehído. El hecho que aumente el cociente NADH/NAD<sup>+</sup> al metabolizarse el etanol, tiene repercusiones en el estado redox de la célula hepática, ya que aumenta el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial produciendo una generación de ROS, factor determinante del daño hepático producido por el alcohol (Bailey SM et al. 1998). Por otro lado el exceso de equivalentes reductores da lugar a toda una serie de desórdenes metabólicos; se produce incremento en la lipogénesis, que junto con una disminución de la actividad del ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de ácidos grasos favorecen la acumulación de triglicéridos. Esto explicaría la acumulación de vacuolas lipídicas observado en el citoplasma de los hepatocitos durante la esteatosis.

Hasta la fecha se han identificado siete isoenzimas de la ADH, codificados por 5 loci génicos que dan lugar a diferentes subunidades polipeptídicas, y cuya expresión depende del tejido y etapa de desarrollo (Brennan P et al. 2004). En el hígado, la oxidación del etanol es catalizada principalmente por la ADH1 clase I, con una Km en el rango milimolar (0.5-2mM) (Bosron WF et al. 1983, Lieber CS 1991).

Los diferentes isoenzimas de la ADH muestran diferencias en la eficacia en la eliminación del etanol y, por tanto, son uno de los factores que contribuyen a las variaciones individuales del efecto tóxico del etanol (Ferguson RA et al. 1997, Lindros KO et al. 1995).

### **5.1.2. Sistema microsomal de oxidación de etanol (MEOS)**

La proliferación del retículo endoplásmico tras la administración crónica de etanol, y la capacidad de metabolizar etanol que presentan algunas especies de ratones que carecen de la ADH, sugirieron la existencia en los microsomas de un sistema capaz de oxidar alcohol y adaptarse a la administración crónica de etanol (Knetch KT et al. 1993). La existencia del MEOS se confirmó con el descubrimiento de una fracción del citocromo P450 que tiene la capacidad de oxidar alcohol en ausencia de ADH y de catalasa (Lieber CS et al. 1970). La isoforma del citocromo P450 inducible por el etanol, es la P4502E1 con una Km relativamente alta para el etanol de 8-10 mM, lo que explica que sea la ADH el principal enzima en metabolizar el alcohol. Sin embargo, cuando los niveles de etanol son altos o tras una ingesta crónica de alcohol, el MEOS juega un papel importante en su oxidación, gracias a su capacidad de adaptación. El citocromo P4502E1 utiliza NADPH y oxígeno molecular para oxidar el etanol, generando radicales libres como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Cederbaum AI 1989), que están directamente implicados en los efectos hepatotóxicos del etanol.

### **5.1.3. Catalasa**

La catalasa, presente en los peroxisomas, es capaz de oxidar etanol en cooperación con un sistema generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Keilin D et al. 1948). Su actividad se encuentra limitada por la concentración de peróxido de hidrógeno, por tanto aquellas reacciones que en los peroxisomas producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favorecen la utilización de esta vía. Uno de estos procesos es la β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Handler JA et al 1990). De todas formas, asumiendo que todo el peróxido de hidrógeno se utilizase en la oxidación del etanol, la catalasa sólo podría contribuir al metabolismo del 2% del total de etanol metabolizado in vivo. Por tanto, en condiciones fisiológicas la catalasa no tiene un papel relevante en la eliminación del alcohol.



#### **5.1.4. Metabolismo del acetaldehído**

El primer producto de la oxidación del etanol, el acetaldehído, es metabolizado hasta ácido acético por una familia de enzimas llamadas acetaldehído deshidrogenasas. En el hígado existen dos tipos de ALDH, una mitocondrial de baja  $K_m$  y otra citoplasmática de alta  $K_m$  cuyo papel fisiológico en el metabolismo del acetaldehído es de poca relevancia (Henehan GT et al. 1985). Habitualmente, tras la ingestión de etanol los niveles en plasma de acetaldehído son indetectables. En cambio, en los alcohólicos crónicos los niveles plasmáticos de acetaldehído son más elevados (Korsten MA et al. 1975) debido a una menor actividad de la ALDH mitocondrial, efecto que se correlaciona con la gravedad del daño hepático (Panés J et al. 1989). Además, se ha descrito que los hepatocitos de la zona perivenosa tienen una menor actividad ALDH que los hepatocitos de la zona periportal, lo que genera un gradiente de acetaldehído en el acino hepático, siendo más concentrado en el área perivenosa, situación que se acentúa en la enfermedad hepática alcohólica (García-Ruiz C et al 1994).

Existen otras enzimas capaces de metabolizar el acetaldehído, como son la xantina oxidasa (XO) y la aldehído oxidasa (AO). Ambos generan anión superóxido durante la eliminación del acetaldehído. La  $K_m$  de la XO para el acetaldehído es  $>30\text{mM}$ , mientras que la  $K_m$  de la aldehído oxidasa es de  $1\text{mM}$ , por tanto es de prever que en concentraciones relativamente bajas de acetaldehído ( $200\ \mu\text{M}$ ), su metabolismo ocurra preferentemente vía  $\text{ALDH} > \text{AO} > \text{XO}$ .

#### **5.1.5. Efectos del acetaldehído**

El consumo prolongado de etanol provoca una reducción significativa en la capacidad de la mitocondria de rata para oxidar el acetaldehído (García-Ruiz C et al. 1994), que junto con una metabolización normal o incluso aumentada del etanol, provoca un cúmulo de acetaldehído que conlleva consecuencias negativas para la célula. Los efectos conocidos son:

- El grupo carboxilo del acetaldehído es muy reactivo, lo que favorece la formación

de complejos con el grupo amino de una gran variedad de proteínas (hemoglobina, citocromo P450E1, colágeno, tubulina, etc.), alterando la funcionalidad de estas proteínas (Lieber CS et al. 1991). Aunque la formación de estos complejos *in vivo* está bien documentada en pacientes alcohólicos (Niemelä O et al. 1991), el mecanismo por el cual estos complejos intervienen en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica no está claro. La liberación por parte de los hepatocitos de estos complejos acetaldehído-proteína, pueden provocar una reacción autoinmune, llegando a provocar inflamación y daño hepático (Israel Y et al. 1988).

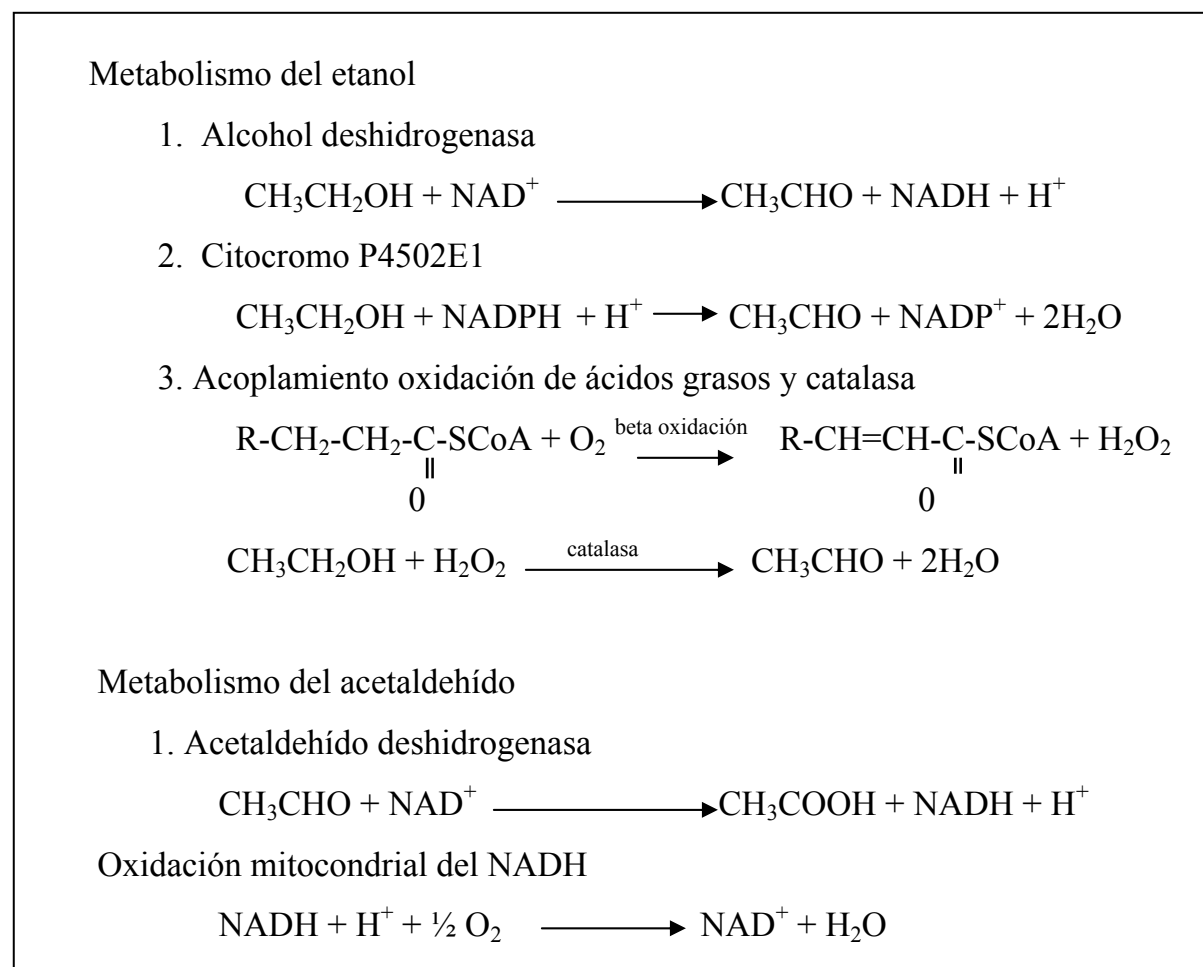
- Activación de diferentes factores de transcripción. Recientemente se ha descrito que el acetaldehído provoca la activación de los complejos NF- $\kappa$ B y AP-1 responsables de la expresión de citoquinas proinflamatorias (Roman J. et al. 2000). Por otro lado, el acetaldehído provoca un incremento en células hepáticas estrelladas de la transcripción del gen  $\alpha_2(I)$  colágeno, mediante la expresión de los factores nucleares NF-1 y SP-1 (Miao K et al. 1997).
- Aumento en la secreción de citoquinas en las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado), destacando el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, TGF- $\beta$ 1 (Tran-Thi TA et al. 1995).
- El acetaldehído provoca el aumento de la lipoperoxidación de las membranas celulares (Müller A et al. 1982). También se ha relacionado al acetaldehído con la disminución de agentes antioxidantes, gracias a su capacidad en la formación de complejos con el grupo tiol del glutatión (Lieber CS 1988).

### **5.1.6. Hipoxia**

En condiciones fisiológicas, en el hígado hay un gradiente de  $O_2$  entre la vena portal (~16%  $O_2$ ) y la zona perivenosa (~10%  $O_2$ ). Como consecuencia de la oxidación del etanol, la demanda de oxígeno por parte del hígado aumenta, debido al llamado estado hipermetabólico del hepatocito (Yuki T et al. 1980). El oxígeno es utilizado para la

oxidación del etanol por parte del citocromo P450 y por parte del sistema acoplado catalasa-oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas. Además, la oxidación del NADH, generado vía alcohol y acetaldehído deshidrogenasa, estimula un aumento del consumo de O<sub>2</sub> en la cadena respiratoria mitocondrial (Fig 7).

Este aumento en el consumo de O<sub>2</sub> debido al metabolismo del alcohol, provoca un aumento del 30% en el gradiente intralobular de O<sub>2</sub>, alcanzándose estados de hipoxia en la zona centrilobular del hígado (Ji S et al. 1982 , Adachi Y et al. 1994). Y este efecto es observado, a pesar de que el alcohol induce un efecto compensatorio al aumentar el flujo sanguíneo hepático, y por tanto, la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el hígado. La observación de que el area hipóxica pericentral sea la zona más dañada por el consumo crónico de etanol y que tratamiento con el agente propiltiouracil, que reduce el consumo hepático de O<sub>2</sub> debido al metabolismo del etanol, previene el daño hepático inducido por el alcohol (Carmichael FJ et al. 1993), sugiere que la hipoxia interviene de forma relevante en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.



**Fig 7.** Consumo de O<sub>2</sub> asociado al metabolismo del etanol.

## 5.2. Mitocondria y alcohol

Una de las características predominantes del daño hepático inducido por el alcohol en el hígado, son las alteraciones morfológicas y funcionales que se observan en las mitocondrias. El examen histológico de biopsias hepáticas de pacientes alcohólicos, revela la presencia de mitocondrias gigantes con alteraciones morfológicas en las crestas, claramente distinguibles de los cuerpos de Mallory, denominadas megamitocondrias (Bruguera M et al. 1977). Cambios estructurales similares se observan en modelos de experimentación animal tras una ingesta crónica de etanol (Porta EA et al 1965). Una de las consecuencias más dramáticas de la ingesta continuada de alcohol en la mitocondria, es la disfunción de la fosforilación oxidativa y consecuente producción de ATP (Thayer WS et al. 1979). Los diferentes componentes de la cadena respiratoria mitocondrial afectados por el consumo de alcohol son codificados por el ADN mitocondrial, mientras que aquellos cuya expresión es génica nuclear no presentan ninguna alteración. Estos resultados sugieren que el consumo crónico de etanol puede interferir en la expresión génica mitocondrial (Coleman WB, 1990). Sin embargo, ni el ADN, ni los niveles totales de ARN, ni la actividad de la ARN polimerasa se encuentran alterados en la mitocondria alcohólica, indicando que el defecto causado por el etanol se produce en la etapa de procesamiento del mARN. Una posible explicación sería el hecho de que el número de ribosomas se encuentra disminuido en un 50-60%, resultado de una menor síntesis en el retículo endoplasmático o de una disminución en el transporte hacia la matriz mitocondrial (Kobayashi M 1981). Esta disfunción de la fosforilación oxidativa, junto al aumento en los equivalentes reductores (NADH) debidos al metabolismo del etanol, desencadena la generación de radicales libres desde la mitocondria. Por lo tanto, la disminución del mGSH y de la actividad de la enzima GSH peroxidasa (Baliey SM et al 2001) durante la progresión de la enfermedad hepática alcohólica, es uno de los factores sensibilizadores más importantes en el desarrollo de la enfermedad, al comprometer la funcionalidad mitocondrial (Garcia-Ruiz C et al. 1994, Takeshi H et al. 1992, Tsukamoto H et al. 2001).

El alcohol es capaz también de modificar la composición lipídica de las membranas mitocondriales (Taraschi TF et al. 1985). Diferentes estudios muestran cambios en la

distribución de ácidos grasos en los fosfolípidos, los niveles de cardiolipina (Ellingson JS et al. 1988) y un aumento de colesterol (Cunningham CC et al 1983). Los principales parámetros que inciden sobre el grado de empaquetamiento de la membrana son: la relación colesterol/fosfolípidos, el grado de insaturación y longitud de las cadenas de los ácidos grasos, la composición de fosfolípidos y el cociente lípidos/proteínas. Estos cambios en la fluidez de membrana tienen importantes repercusiones sobre la funcionalidad de las proteínas asociadas a la membrana mitocondrial :

- Los fosfolípidos, se encuentran íntimamente asociados a los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria de forma que cambios en su proporción o en la composición de sus ácidos grasos, afectan directamente el funcionamiento mitocondrial. En concreto, se ha descrito que el alcohol provoca una disminución en las actividades de elongación y reacidación de los ácidos grasos, disminuyendo los niveles de ácido palmítico (C16:0) y araquidónico (C20:4) y aumentando los niveles de ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e eicosatrienoico (C20:3) tanto en la fosfatidilcolina como en la fosfatidiletanolamina provocando una disminución en la actividad del enzima citocromo oxidasa (Cunningham CC et al.1983).
- La actividad del transportador mitocondrial de GSH se ve modulada por cambios en la fluidez de membrana. En el modelo experimental en rata de intoxicación crónica con etanol, se ha observado una disminución en el transporte de mGSH debido a un aumento en la rigidez de la membrana mitocondrial (Colell A et al. 1997).
- Se ha observado que las mitocondrias hepáticas de animales tratados crónicamente con alcohol son más propensas a la acción de agentes que inducen el MPT (Pastorino JG et al. 1999).

### **5.3. Citoquinas y alcohol**

Las citoquinas son polipéptidos de bajo peso molecular (<30kDa) sintetizadas y secretadas principalmente por células no parenquimales como monocitos, macrófagos y células de Kupffer. Se unen a sus correspondientes receptores celulares, activando diferentes cascadas de señalización intracelular que pueden procoavar, en función de su concentración y el tipo celular sobre el que actúen, desde la proliferación, migración y adhesión, hasta la muerte celular por apoptosis (McClain C et al. 1999).

Citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1, 6 (IL-1, IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), antiinflamatorias como la IL-10, el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), quimioquinas como la IL-8, y finalmente, la citoquina fibrogénica, el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), se ha demostrado que tienen un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica (Song Z et al. 2004).

El consumo crónico de etanol incrementa la permeabilidad del intestino, permitiendo que ciertas toxinas bacterianas (lipopolisacáridos, LPS) atraviesen la pared intestinal y a través del torrente sanguíneo alcancen el hígado, donde estimulan la secreción de citoquinas inflamatorias (p.ej. TNF- $\alpha$ ) a través de la activación de las células de Kupffer. Los altos niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  en pacientes alcohólicos ha sido descrito por diferentes grupos, y recientemente se ha observado una correlación entre los valores de TNF- $\alpha$ , el grado de severidad de la enfermedad y su mortalidad (McClain C et al.1999). De hecho, la administración de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  atenúa el daño hepático inducido por el alcohol (Iimuro Y et al. 1997) y su importancia se pone de relevancia en ratones deficientes en el receptor I de TNF- $\alpha$ , que no desarrollan el daño hepático producido por el alcohol (Yin M et al. 1999).

La unión del TNF- $\alpha$  a su receptor activa una cascada señalización que aumenta los niveles del gangliósido GD3, induciendo la generación endógena de radicales libres por parte de la mitocondria (García-Ruiz C et al. 2000, 2002). La acción y repercusiones del gangliósido GD3 sobre la mitocondria están reguladas por el nivel de mGSH, cuya disminución incrementa la susceptibilidad del hepatocito a la acción citotóxica del TNF- $\alpha$  (Colell A et al. 1998, Pastorino JG et al. 1999, García-Ruiz C et al. 2003).



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1 CULTIVOS CELULARES

### 1.1. Aislamiento de hepatocitos.

Esta técnica está basada en la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  por perfusión de un agente quelante y posterior perfusión con colagenasa. Se obtiene un alto rendimiento en los hepatocitos aislados, con una viabilidad de un 90-95 % y sin contaminación de células no parenquimales.

#### Soluciones y tampones

Todas las soluciones se gasean con 95 %  $\text{O}_2$  y 5 %  $\text{CO}_2$  y se mantienen a 37 °C.

Solución A (Solución de Hanks modificada):

8.0 g NaCl

0.4 g KCl

0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.06 g  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.06 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.19 g  $\text{NaHCO}_3$

pH: 7.4, volumen final: 1 litro.

Solución B:

Solución A con un 0.12 % de colagenasa IV y 4 mM  $\text{CaCl}_2$

Solución C ( Solución Krebs-Henseleit):

6.9 g NaCl

0.36 g KCl

0.13 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.295 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0.374 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2 g  $\text{NaHCO}_3$

pH 7.4, volumen final: 1 litro

#### Procedimiento quirúrgico



Las ratas Sprague-Dawley (180-250g) se anestesian con pentobarbital sódico al 5% ( 0.1 ml por cada 100 g de peso corporal) y la cavidad peritoneal se abre con una incisión en la mitad del vientre. Se inyecta heparina (500 U en 0.1 ml) en la vena cava. Se coloca una ligadura (sin atar) alrededor de la vena cava superior muy cerca del hígado y se inserta la cánula o catéter en la porta. Se asegura la cánula con la ligadura.

La perfusión se inicio con flujo de 10-15 ml/min *in situ* con la solución A al mismo tiempo que se corta la vena cava inferior. Para evitar la introducción de burbujas en el hígado se deja gotear la cánula antes de introducirla en el hígado.

Tras aproximadamente 2 minutos de perfusión con la solución de lavado A, se liga la vena cava inferior, se corta la cava superior y se procede a separar el hígado de la cavidad abdominal; una vez liberado, se sumerge el hígado en solución de digestión B y se perfunde con ésta.

Se recircula la solución B durante aproximadamente 6 minutos o hasta que el hígado aparece hinchado y pálido. Entonces se pasa a la solución C donde con una varilla, se masajea suavemente el hígado (desde el centro hacia los extremos) hasta conseguir una completa liberación de los hepatocitos.

Las células se filtran a través de una gasa de algodón y se dejan precipitar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Para seleccionar las células viables, se lavan con solución C (Krebs) y se centrifugan a 700 g durante 20 segundos.

La viabilidad y el contaje celular se determina por exclusión al Tripán Blue al 0.2 % en tampón fosfato (PBS) en una cámara de Neubauer.

## **1.2. Cultivo primario de hepatocitos de rata.**

Los hepatocitos se siembran en placas que contienen una base de colágeno (extraído a partir de cola de rata). El medio utilizado es DMEM/F12 (1:1) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina.

Tras cuatro horas en cultivo se lavan las células con medio sin suero fetal para eliminar las células no viables. Se añade medio nuevo y se procede a los tratamientos adecuados.

### 1.3. Cultivo celular HepG2.

Todos los estudios se han realizado con la línea de hepatoblastoma humano, HepG2. Son células que conservan la mayoría de las funciones específicas de los hepatocitos humanos (Javitt NB 1990) y al carecer de la actividad del enzima alcohol deshidrogenasa, se han utilizado como modelo para evaluar los efectos del etanol *per se* (Chen J et al. 2001).

Las células se obtuvieron del European Collection of Animal Cultures (Salisbury, Wilts, UK) y se mantuvieron en el incubador a 37 °C con el 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) que contiene una alta concentración de glucosa. Además el medio es suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivo (FBS) , 2mM de L-glutamina, penicilina (100 unidades/ml), y estreptomicina (100 µg/ml).

## 2. TRATAMIENTOS CELULARES

### 2.1. Acetaldehído

Se preparó una solución madre de 174 mM de acetaldehído en PBS. Se añadió a una concentración teórica de 125 µM de acetaldehído a un medio al 2% FBS (que se renueva cada 24 horas) en los flascos de tapón sin filtro, que se cerraban y se sellaban con parafilm para evitar la evaporación del acetaldehído. Por cromatografía de gases se estimó que un 20% del acetaldehído se evapora durante la manipulación de las soluciones, por tanto la concentración real en los flascos era de 100 µM.

### 2.2. Hipoxia

Las células se mantuvieron en un incubador de la casa comercial Forma Scientific, con el cual se pueden regular los niveles de O<sub>2</sub> (2%-21%) y manteniendo un 5%CO<sub>2</sub> y 37°C. Las células HepG2 se mantuvieron al 5% O<sub>2</sub> hasta 72 horas en condiciones de hipoxia, mientras que sus correspondientes controles se mantenían en normoxia al 21% O<sub>2</sub>. Se realizaron experimentos de controles para verificar que la apertura puntual de los flascos durante la hipoxia no estimulaba la generación de ROS o la depleción de GSH.

### **2.3. Disminución selectiva del glutation reducido (GSH).**

Los hepatocitos de rata se incubaron con el compuesto 3-hidroxil-4-pentanoato (HP) a una concentración de 1mM durante 5 minutos a 37°C (Shan X et al. 1993).

Pasado este tiempo, se lavan las células para retirar el exceso de HP. De esta manera se consigue disminuir de forma selectiva el nivel de glutation reducido mitocondrial sin prácticamente afectar al GSH citosólico. Paradójicamente, este compuesto no se mostró tan efectivo para las células HepG2. Por eso, para disminuir los niveles de GSH en las células HepG2 durante la hipoxia, preincubamos durante 15 minutos con 0.8 mM dietilmaleato (DEM), agente quelante de GSH y posteriormente durante 8 horas con 1mM butilsulfóxido (BSO), para inhibir la síntesis *de novo* de GSH. Lo que resultó en una disminución del GSH total, más acentuada en el *pool* mitocondrial que en el citosólico.

## 3.DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MITOCONDRIALES

### **3.1. Aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial.**

#### 3.1.1. HepG2 (Cui L et al. 1995)

Tras tripsinizar tres flascos de 150 cm<sup>2</sup> (80% confluencia), se lavan las células con PBS y se incuban 10 minutos con 2 ml del tampón hipotónico (10mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH 7.5). Para lisar las células se utilizó un homogeneizador manual de teflón de 2 ml, 10 veces. Rápidamente se diluyó 1:5 con el tampón de transporte (descrito en el apartado 3.8.), para evitar la lisis osmótica de las mitocondrias. Posteriormente se centrifuga a 1500g, 5 minutos a 4°C y el precipitado se volvió a homogeneizar (tras 3 veces, el 95% de las células están lisadas). El sobrenadante total se centrifuga a 10.000 g, 20 minutos a 4°C para precipitar las mitocondrias. A partir de alrededor 120x10<sup>6</sup> células HepG2 se obtiene 1 mg de proteína mitocondrial. Para contrastar los diferentes parámetros mitocondriales, se realizó puntualmente el aislamiento mitocondrial por gradiente. La suspensión mitocondrial (1mg/ml) se carga en un gradiente

discontinuo de Percoll (15%-23%-40%). Tras centrifugar a 30.700g durante 35 minutos, se recupera la banda inferior correspondiente a las mitocondrias.

### 3.1.2. Hígado de rata

Las mitocondrias se obtienen a partir homogenado de hígado de rata que se perfunde previamente con solución salina para eliminar la sangre.

#### Tampón de homogeneización

19.13 mg Manitol

10.26 mg Sacarosa

372.8 mg KCl

135 g succinato

19.2 mg DTT

19.02 mg EGTA

1.09 mg HEPES.

pH: 7.4

- Se homogenizan 2x5 g de hígado en el homogeneizador de teflón con 45 ml del tampón anterior, 4 veces a 1200 rpm.
- centrifugación a 700 g 10 minutos a 4 °C
- se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 10.000 g, 15 minutos a 4°C
- resuspender el precipitado en 22 ml de tampón de homogeneización
- centrifugación a 10.000 g 15 minutos a 4°C
- resuspender el precipitado en 11 ml de tampón de homogeneización
- centrifugación a 10.000 g 15 minutos a 4°C
- se resuspende el precipitado en 2 ml de tampón de homogeneización.

La pureza de la suspensión mitocondrial procedente de HepG2 o de hígado de rata, se verificó por microscopia electrónica y por ensayos enzimáticos para descartar la presencia de otros orgánulos. Mientras que la integridad de la mitocondria fue evaluada por la funcionalidad de la cadena respiratoria.

## 3.2. Mitoplastos

A 20mg/ml de proteína mitocondrial resuspendida en un tampón con 220mM Manitol, 70 mM sacarosa, 2mM Hepes y 0.05% albúmina (BSA) a pH 7.4, se le añade un volumen del mismo tampón con 1.2 mg/ml de digitonina y sin la presencia de BSA. Tras 15 minutos de incubación a 25°C, la muestra se diluye tres veces, se homogeniza manualmente y posteriormente se centrifuga 10 minutos a 9.500g. El sobrenadante resultante se centrifuga a 144.000g durante una hora para obtener la membrana mitocondrial externa. La eficiencia del procedimiento se verificó por la actividad del enzima amino oxidasa en el precipitado obtenido a baja velocidad de centrifugación (mitoplastos) frente al de alta velocidad (membrana mitocondrial externa). La actividad amino oxidasa se determinó al incubar 1mg de proteína de cada fracción en 10 mM PBS, 2% Lubrol , pH 7.6 en un volumen final de 2 ml a 37°C. Tras 5 minutos de incubación la reacción se empieza al añadir 3.3 mM de benzilamina y su oxidación se monitorizó a 250 nm en el espectrofotómetro.

### **3.3. Valoración de la permeabilidad mitocondrial transitoria**

Como consecuencia de la apertura del poro mitocondrial se produce un hinchamiento mitocondrial que se traduce en una disminución en la densidad óptica de las mitocondrias.

#### Tampón de incubación

200 mM sacarosa  
10 mM Tris-MOPS  
5 mM de succinato  
1 mM de fosfato de potasio  
2  $\mu$ M de rotenona  
1  $\mu$ g/ml oligomicina  
10 mM de EGTA  
pH: 7.4

Las mitocondrias de hígado de rata (1 mg/ml) se incuban con el tampón de incubación a 25°C y se determina la absorbancia a 540 nm espectrofotométricamente.

### 3.4 Composición lipídica de la membrana mitocondrial.

#### 3.4.1. Extracción de lípidos

Se partió de 1 mg de proteína mitocondrial para realizar la extracción lipídica. A un 1ml de mitocondrias se le añaden 19 ml de cloroformo/metanol (2:1) y se mantiene en agitación durante 30 minutos, todo ello trabajando con tubos de vidrio. Centrifugación a 1500 g, 5 minutos a 4°C. Se descarta el precipitado y se recupera el extracto lipídico (~20ml) y se le añade 4 ml de NaCl al 0.58%. Se mezcla bien y se centrifuga (1500g, 5min, 4°C) se recupera la fase inferior (orgánica) y se le vuelve a añadir cloruro de sodio y se repite el proceso hasta 3 veces para optimizar la extracción de la fase orgánica. Finalmente se adiciona  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se seca con  $\text{N}_2$  (Folch J et al. 1957).

#### 3.4.2. Separación e identificación de los fosfolípidos

La separación se realizó por cromatografía de capa fina. Para ello, se utilizaron placas de silicagel previamente activadas (100°C, 1h) y mantenidas un mínimo de cuatro horas en una cámara para saturar la atmósfera con la fase móvil cloroformo/metanol/acetona/ácidoacético/agua (6:2:8:2:1). Se pinchan 100µl de las muestras resuspendidas en cloroformo con los correspondientes estándares para identificar los diferentes fosfolípidos (Pernes JF 1980) con un tiempo de resolución de dos horas. La tinción con yodo permitió visualizar las diferentes bandas correspondientes a la fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y la cardiolipina (Card) que fueron cuantificadas por densitometría.

#### 3.4.3. Composición de ácidos grasos en los fosfolípidos

Los diferentes fosfolípidos fueron recuperados de la placa y resuspendidos de nuevo en 5 ml de cloroformo. Posteriormente, se centrifugaron a 1000g, 5min, 4°C. Se recuperó el sobrenadante que se secó con  $\text{N}_2$ . Para la metilación de los ácidos grasos, se siguió el método de Metcalfe LD et al. 1961. El residuo seco se resuspendió en 2 ml de la solución de trifloro boron en etanol ( $\text{BF}_3$ ) y se mantuvo durante 30 minutos a 100°C. Tras dejar enfriar, se añade 2 ml de agua y

2ml de hexano. Se recupera la fase orgánica, a la que se le añade 2ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se seca al  $\text{N}_2$ . Tras la esterificación de los ácidos grasos, se separaron y cuantificaron por cromatografía de gases. Los estándares también fueron esterificados. Para la identificación de los diferentes ácidos grasos, utilizamos el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N con una columna Supelco<sup>TM</sup> (100mm x 0.25 mm ID).

#### 3.4.4 Extracción y determinación de colesterol

Alrededor de 0.25 mg de proteína mitocondrial en 500  $\mu\text{l}$  de PBS se saponificó con 0.3ml de una solución al 33% KOH y con 3ml de etanol al 95%. Tras agitar vigorosamente se mantuvo a 60°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se añadió 10ml de hexano y tras un minuto de agitación se adicionó 3ml de agua. Se recupera la fase orgánica y se seca con  $\text{N}_2$ . La determinación se llevó a cabo por el método de Rudel LL et al. 1973, donde se incuban 2 ml de la solución de oftalaldehído (0.5 mg/ml en ácido acético) con el residuo seco durante 10 minutos y posteriormente se añade 1 ml de ácido sulfúrico. El cambio de color se monitoriza con la medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. También en algunos casos se midieron los niveles de colesterol con un HPLC modelo Gilson 322 y utilizando una columna de Waters Bondapak C18 (30cm x 4mm) siendo la fase móvil 2-propanol/acetonitrilo (1:1 v/v) a un caudal de 1ml/min. Los valores de colesterol obtenidos por ambos métodos fueron similares.

### 3.5. Enriquecimiento en colesterol

El complejo colesterol-albúmina se preparó disolviendo 50 mg de colesterol en 50 ml de etanol, a la que se le añadió 5 ml de agua desionizada provocando que la solución tome un aspecto lechoso, debido a la formación de cristales de colesterol. En este punto se añadieron 2g de BSA, se ajustó el pH a 7.3 y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000g y 4°C. De 10 a 50  $\mu\text{l}$  de colesterol-BSA se incubó con un 1mg de proteína mitocondrial durante un minuto a 4°C. Pasado este tiempo, se diluyó 20 veces la solución mitocondrial con el tampón 0.25M

sacarosa, 1mM EDTA pH 7.3, y se precipitaron las mitocondrias que fueron lavadas tres veces para eliminar el exceso de colesterol no incorporado en la membrana mitocondrial. Se llevaron en paralelo controles donde sólo se incubaba con BSA. Con este procedimiento obtuvimos un aumento de un 25% a un 135% en los niveles de colesterol en la membrana mitocondrial.

### 3.6. Determinación de la fluidez de membrana

La fluidez de la membrana mitocondrial se midió por anisotropía de fluorescencia con las sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), el derivado del ácido esteárico (9-AS) y trimetilamonio 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH). La sonda DPH se incorpora cerca de la región polar de la bicapa, el TMA-DPH se une a la superficie de la membrana, mientras que el 9-AS penetra a mayor profundidad en la membrana, por tanto, el uso de estas sondas permite monitorizar la fluidez a lo largo de la bicapa lipídica.

La sonda DPH 20mM en tetrahidrofurano fue diluida 100 veces en el tampón 10mM Tris-HCl, 150mM KCl, 1mM EDTA pH 7.4 y se mantuvo en agitación en la oscuridad hasta que se obtuvo una solución homogénea (1 hora). Un volumen de esta mezcla se adicionó a 3 volúmenes de la suspensión mitocondrial (0.5 mg/ml) y se incubó en ausencia de luz durante 1 hora a 37°C. Mientras que las sondas TMA-DPH y 9-AS, se incubaron a una concentración final de 3µM con 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial durante 30 minutos a 37°C. La polarización de la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro de la casa Hitachi con una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión de 425 nm para el DPH y TMA-DPH, mientras que para la sonda 9-AS fue de 366 nm la excitación y 440 la emisión. Los resultados están expresados como unidades de anisotropía  $r = (I_0/I_{90})/(I_0+2I_{90})$ . Donde  $I_{90}$  y  $I_0$  son los valores de la intensidad de la luz cuando las lentes polarizadoras están orientadas en perpendicular o paralelo. Las correcciones debidas a la fluorescencia intrínseca de la muestra se realizaron en todos los experimentos al tener como controles la muestra sin sonda y el tampón con la sonda sin la suspensión mitocondrial.



### 3.7. Fluidificación de la membrana mitocondrial

El agente A<sub>2</sub>C es un derivado del ácido graso caprílico que se intercala en la bicapa lipídica provocando su fluidificación (Kosower ER et al. 1977)

La correspondiente suspensión mitocondrial de 2mg/ml de concentración final, se incubó con el tampón 10 mM Tris-HCL, 150 mM KCl, 1mM EDTA, pH 7.4 con el agente A<sub>2</sub>C (125 nmol/mg proteína) durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se recuperaron las mitocondrias por centrifugación (10.000g, 10 minutos, 4°C) y se lavaron dos veces para eliminar el exceso de A<sub>2</sub>C.

### 3.8. Transporte de GSH mitocondrial y ADP/ATP

El tampón que se utilizó para el transporte mitocondrial de glutation fue: 5mM Hepes, 220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 0.1mM EDTA, 0.1% BSA (sin ácidos grasos), 5mM succinato, 1mM fosfato de potasio, pH 7.2, con diferentes concentraciones de GSH (0-30 mM) y con 1μCi de <sup>3</sup>H-GSH en un volumen final de 250μl. El transporte se inicia al añadir las mitocondrias (0.5 mg/ml) y tras 30 segundos se para al adicionar 1 ml del tampón de transporte frío , seguido de una filtración en vacío para separar el medio de las mitocondrias. Las mitocondrias retenidas en los filtros (Millipore, 0.45μm) se lavaron dos veces con 2.5 ml de tampón de transporte, para eliminar la unión inespecífica de GSH al filtro. Los filtros se dejaron secar y se pusieron en 10 ml de liquido de centelleo, listo para evaluar la cantidad de GSH marcado transportado al interior de la mitocondria. Los blancos se realizaron al añadir primero 1 ml de tampón de transporte frío a las mitocondrias y posteriormente añadir el GSH marcado, de esta manera, determinábamos la unión inespecífica a la mitocondria y a los filtros. Para estudiar la dependencia del transportador de mGSH con el ATP, se repitieron los mismos experimentos pero con la presencia de 3mM ATP. Para el transporte <sup>14</sup>C-ADP hacia el interior de la mitocondria de células tratadas con acetaldehído y controles se utilizaron diferentes concentraciones de ADP (2.5-20μM). El tampón de transporte constaba de 120mM KCl, 20 mM Tris-HCL, 1.1mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM sacarosa y pH 7.4. El ensayo se inició con la adición de 66μl de la suspensión mitocondrial (30mg/ml) en un volumen final de 766μl y se termina

al añadir 60 nmol de atractilósido , un exceso de tampón de transporte frío y finalmente ser filtrado (como descrito anteriormente).

#### 4. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS, GLUTATION Y ROS.

##### 4.1. Cuantificación de proteínas.

Para la valoración de proteínas de las muestras se ha utilizado el método colorimétrico de Bradford . El reactivo de Bradford reacciona con los residuos aromáticos de las proteínas, formando un complejo que se puede cuantificar en el espectrofotómetro. Se determina la absorbancia a 595 nm de diferentes muestras y se calcula la concentración respecto a un estándar de concentración conocida.

BSA 1 mg/ml.

Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, 500-0006): diluir el comercial a 1:4 y filtrar con papel de filtro.

1. estándares:            500 ml BSA 1 mg/ml+ 500 ml H<sub>2</sub>O = 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

160 ml 500 + 40 ml H<sub>2</sub>O = 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

120 ml 500 + 80 ml H<sub>2</sub>O = 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

80 ml 500 + 120 ml H<sub>2</sub>O = 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

80 ml 500 + 320 ml H<sub>2</sub>O = 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

0 ml 500 + 500 ml H<sub>2</sub>O = 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

2. a 50  $\mu\text{l}$  de estándar, añadir 2.5 ml Bio-Rad. Hacer un blanco con 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
3. poner de 5 a 25  $\mu\text{l}$  de cada muestra y añadir 2.5 ml de Bio-Rad
4. incubar a temperatura ambiente de 20-60'
5. leer a 595 nm, leyendo previamente el blanco
6. obtenemos la recta estándar y de ella extrapolamos la concentración de las muestras.

## 4.2. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Este método permite la detección de especies reactivas del oxígeno mediante la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Ésta se convierte en un producto fluorescente debido a la oxidación por peróxidos.

Fluorímetro (HITACHI, F-4500)

2',7'-diclorofluoresceína diacetato: 1 mg /ml

### Procedimiento:

1. añadir a una cubeta
  - 2.5 ml de PBS 1X
  - 250 µl (2 X10<sup>6</sup> células /ml)
  - 2.5 µl DCFDA 1 mg /ml
  - incubar a 37 °C durante 30'

o bien la sonda se puede incubar directamente en el medio de cultivo 30' antes de procesar las células.

2. condiciones de lectura
  - Excitación: 503 nm
  - Emisión: 529 nm

## 4.3. Determinación de GSH .

Se realizó por el método espectrofotométrico de Tietze F et al. 1969. Se basa en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB) por el grupo tiol del GSH, dando lugar a un compuesto de color amarillo. A 0.1 ml de muestra, se le añaden 0.1 ml del enzima glutation reductasa y 2.3 ml de la solución que contiene 0.9mM EDTA, 0.1mM DTNB, 0.15mM NADPH y 50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 37°C y a una longitud de onda 412 nm. Al comparar con los valores de absorbancia de las soluciones estándar de GSH (0-60µM), obtenemos la concentración de GSH en las diferentes muestras.

## 5. VALORACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

### 5.1.Viabilidad celular por LDH

La muerte celular se determinó midiendo la liberación del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo celular. Este enzima se encuentra retenido en el citoplasma celular, pero durante la muerte celular, la permeabilización de la membrana plasmática permite la liberación de productos citosólicos.

La determinación de la actividad LDH esta basado en la reducción de piruvato a lactato:



Durante la reducción del piruvato, una cantidad equimolar de NADH es oxidado a NAD. La oxidación de NADH resulta en un descenso de la absorbancia a 340 nm, que es directamente proporcional a la actividad lactato deshidrogenasa en la muestra.

#### Soluciones y tampones:

Solución A: NADH 0.19 mM en tampón fosfato 54 mM pH 7.5

Solución B: Piruvato 16.2 mM en H<sub>2</sub>O desionizada.

#### Procedimiento:

- Se siembran las células a una densidad de un 80 % en medio completo en placas de petri de 60 cm. de diámetro, se esperan varias horas antes de aplicar los tratamientos.
- Se recoge el medio en el que han crecido las células y se guarda inmediatamente en hielo, para evitar la degradación del enzima.
- Por otro lado, se tripsinizan las células y se lisan con 5 % del detergente Tritón X-100, se centrifuga 5 min. a 14000 g para eliminar membranas y restos celulares y se resuspenden con PBS.
- Se procede a medir la actividad LDH del medio y de las células:  
se incuban las muestras con la solución A durante 1 min. a 25 ° C, se añade la solución B a la mezcla 30 sec. y se lee la absorbancia a 340 nm.

Para calcular la muerte celular por LDH :

$$\text{Muerte celular(\%)} = \text{Abs medio}/(\text{Abs medio} + \text{Abs celular}) \times 100$$

### 5.2. Viabilidad celular por MTT

Este método se basa en la capacidad de las de deshidrogenasas mitocondriales de las células viables de hidrolizar el compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium dando lugar a los cristales de formazan de color púrpura que son insolubles en agua. Estos cristales se redisuelven con el compuesto orgánico isopropanol. Un mínimo de  $1 \times 10^4$  células HepG2 o  $2.5 \times 10^4$  hepatocitos de rata en de 0.2 a 1ml de medio por pocillo, se incuban con 100 $\mu$ l de MTT (5mg/ml) durante 4 horas. Se retira el medio y se adiciona 1 ml de 1-propanol. Se mantiene en agitación a 37°C hasta que en los pocillos se observa un color púrpura homogéneo y todas las células has sido lisadas (alrededor de una hora). Y se lee al espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, a la que se le resta la lectura a 630nm debida a la absorbancia inespecífica. Como blanco se utiliza una muestra procesada igual pero sin la adición de MTT. Por tanto la viabilidad celular se calcula:

$$\text{Viabilidad celular(\%)} = \text{Abs muestra (570-630nm)} * 100 / \text{Abs control(570-630nm)}$$

### 5.3. Determinación del tipo de muerte por citometría de flujo

Se utilizó el kit anexina V-FITC para la detección de la muerte por apoptosis de la casa comercial Oncogen. Este sistema aprovecha la redistribución en la membrana celular del fosfolípido fosfatidilserina (PS), que pasa de estar orientado hacia el citosol a el exterior celular, en las etapas iniciales de la muerte apoptótica. La detección *in vitro* de la externalización de la PS se realiza a través de su interacción con la anexina V, que a su vez, está marcada con la molécula fluorescente fluoresceína isotiocianato (FITC). El yoduro de propidio (PI), marca el núcleo al interaccionar con el ADN y únicamente en células permeabilizadas como ocurre durante la necrosis o en las etapas finales de la apoptosis.

Por tanto, las células marcadas con anexina V serán la población en etapas tempranas de la apoptosis, mientras que el doble marcaje de anexina V y PI indicarán la población necrótica o apoptótica en fase final.

Un total de  $0.5 \times 10^5$  células HepG2 se resuspenden en 0.5 ml del tampón de unión (10mM Hepes, 150mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 4% albúmina, pH 7.4) y se incuba en la oscuridad durante 15 minutos a 20°C con 1.25µl anexina V-FITC (200µg/ml). Se centrifuga a 1000g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspende de nuevo en 0.5 ml de tampón de unión al que se le añaden 10µl PI (30µg/ml). Se incuba en hielo protegido de la luz durante 5 minutos, e inmediatamente se lleva a leer al citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), con una luz de onda de excitación de 488nm donde FITC se detecta por FL1 a 518nm y el PI por FL2 a 620nm.

También se utilizó, para determinar si el tipo de muerte producido por los tratamientos tenía un fenotipo apoptótico, el compuesto Hoechst 33258 (Molecular Probes). Se trata de un colorante que se une al ADN en secuencias ricas en AT, penetra en las células sin necesidad de detergente y emite luz fluorescente azul cuando es excitado con luz ultravioleta.

## 6. ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

La utilización de este método permite valorar la actividad de ciertos factores de transcripción, como NF-κB mediante su unión específica al ADN. Para ello es necesario la obtención de extractos nucleares de las células y la incubación de las proteínas nucleares a una sonda de oligonucleótido específico (región *consensus*) marcado radiactivamente para el factor de transcripción en cuestión.

### **6.1. Obtención de extractos nucleares.**

Los extractos nucleares se obtuvieron al lisar las células con una solución que contiene:

Tampón A:	10 mM HEPES	2.38 g	pH 7.9
	10 mM KCl	0.74 g	

	0.1 mM EDTA	37 mg	
	0.1 mM EGTA	38 mg	
	H <sub>2</sub> O	1000 ml	
Tampón C:	20 mM HEPES	4.77 g	pH 7.9
	0.4 mM NaCl	23.4 g	
	1 mM EDTA	372 mg	
	1 mM EGTA	380 mg	
	H <sub>2</sub> O	1000 ml	

ditiotreitól (DTT) 1 M: 15.4 mg / 100 µl H<sub>2</sub>O preparar al momento  
 fenometil sulfonil fluoride (PMSF) 50mM: 17.4 mg / ml isopropanol

Nonidet NP-40 10% en tampón A

Tampón A / 1mM DTT / 0.5 mM PMSF: 10 µl stock DTT  
 50 µl stock PMSF  
 10 ml tampón A

Tampón C / 1mM DTT / 1 mM PMSF: 10 µl stock DTT  
 100 µl stock PMSF  
 10 ml tampón C

-  $2 \times 10^6$  células se resuspenden en 400 µl de tampón A y se mantienen en hielo las células 15 min.

- se añade 25 µl 10% Nonidet NP-40. Se agita vigorosamente durante 30 sec.

- centrifugación de 13000 g 30'', el pellet resultante se resuspende en 60 µl de tampón C y se agita fuertemente durante 15' a 4 °C

- centrifugar 5' a 13000g a 4 °C

-se recupera el sobrenadante que contiene las proteínas nucleares

-se guarda lo más rápido posible a -80 °C. Utilizar una alícuota de 50 µl para

medir las proteínas nucleares.

### 6.2. Marcaje de la sonda.

La sonda de NF- $\kappa$ B utilizada fue 5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3'

La sonda se marca en 5' con la enzima T4 quinasa y  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol).

El ATP en exceso se separa de la sonda marcada mediante precipitación con etanol.

### 6.3. EMSA.

La reacción de unión entre la sonda y los extractos nucleares se realiza en una solución que contiene:

1  $\mu$ g Poly dI-dC (Pharmacia, 27-7880-03)

Tampón de incubación: 10 mM Tris                      pH 7.5  
 40 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 1 mM BME  
 4 % glicerol

Azul de bromofenol 0.1 % en H<sub>2</sub>O

1. En un eppendorf, se añade: 10  $\mu$ g de proteína  
 5  $\mu$ l tampón de incubación  
 1  $\mu$ g Poly dI-dC  
 hasta 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
2. Se incuba 15' a 4°C. Se añade el oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P
3. se incuba 20' a T. A. y se añade 2  $\mu$ l azul de bromofenol a cada muestra.

Las proteínas se separaran en un gel de poliacrilamida al 6% y se visualiza mediante autoradiografía.

La especificidad de la unión se examina por competición con la sonda no marcada.



#### **6.4. Ensayo de superretraso (Supershift).**

Este ensayo permite la identificación de las subunidades del complejo Rel/ NF- $\kappa$ B. Se incubaron los extractos nucleares con los anticuerpos (2 $\mu$ g) frente a las proteínas de la familia Rel/ NF- $\kappa$ B (p50, p52, p65, c-Rel, Rel B) durante 30 minutos y a 4 °C. Esto permite que el anticuerpo desplace la banda específica y se pueda identificar.

De igual manera, para demostrar la especificidad de la banda que se obtiene en el EMSA, se realizaron ensayos de competición en los que los extractos nucleares se incubaron con un exceso del oligonucleótido con la secuencia *consensus* para NF- $\kappa$ B sin marcar, acto seguido se añadió la sonda marcada y se realiza el EMSA de acuerdo con lo descrito anteriormente

### 7. IMMUNOBLOTS E INMUNOPRECIPITACIÓN

#### **7.1. Obtención de extractos citosólicos**

Las células se permeabilizan con el detergente digitonina (40 $\mu$ g/ml) en 0.5 de buffer compuesto por:

120 mM KCl

10mM NaCl

1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

20mM Hepes-Tris, pH 7.2

suplementado 20 $\mu$ g/ml leupeptina, 5  $\mu$ g/ml pepstatina, 5  $\mu$ g/ml aprotinina

#### **7.2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS PAGE).**

La utilización de este método nos permite separar proteínas en base a su movilidad electroforética. La presencia de un agente reductor como ditionitrito (DTT) o 2- $\beta$ -mercaptoetanol y el calentamiento de las muestras provocan la desnaturalización de las proteínas. El SDS (dodecil sulfato de sodio), un detergente aniónico, envuelve a las proteínas confiriéndoles una carga negativa proporcional a su tamaño. La longitud de la molécula, que es proporcional a la masa, determina la separación de las proteínas durante la electroforesis en los

geles de poliacrilamida, las cuales migran en el gel a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Dentro de un campo eléctrico, las proteínas migran hacia el polo positivo a través de una matriz porosa constituida básicamente de polímeros de acrilamida.

### Soluciones y tampones

#### Solución 1

0.75M Tris-HCl pH 8.8

0.2 % SDS

#### Solución 2

30% acrilamida

0.8% Bis-acrilamida

#### Solución 3

0.25M Tris-HCL, pH 6.8

0.2 SDS

#### Tampón de electroforesis

28.82 g Glicina

6.6 g Tris

2 g SDS

Agua mQ hasta 2 l.

#### Tampón de muestras 4x

30 mM tampón fosfato, pH 7

30% glicerol

7.5 % SDS

0.15 % 2-β-mercaptoetanol

0.5% azul de bromofenol

#### 1.El gel resolutivo

El gel resolutivo se compone de :

solución 1

solución 2

H<sub>2</sub>O

TEMED

Persulfato amónico (PSA) 13%

Es el primero que se prepara, el TEMED y el PSA se añaden en este orden y al final ya que son los que inician la polimerización. La cantidad de cada uno de los componentes dependerá del tamaño de las proteínas que queramos analizar. Un porcentaje bajo de acrilamida favorecerá la separación de proteínas de alto peso molecular, mientras un porcentaje bajo favorecerá la separación de proteínas de bajo peso molecular.

## 2. Gel empaquetador o Staking

Con los mismos componentes del gel resolutive, se añade encima y sirve para empaquetar las proteínas. El porcentaje de acrilamida de este gel es siempre bajo para permitir el paso de las proteínas de todos los tamaños.

3. Las proteínas se diluyen con el tampón de muestra (4x) en una proporción 3:1 respectivamente y se hierven 2 minutos.
4. Se cargan la muestras y se conecta el aparato a la fuente de voltaje inicialmente a 50 V en el gel empaquetador y a 125 V en el gel resolutive.

### 7.3. *Western-blot*

Esta técnica consiste en la detección indirecta de proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa obtenido por transferencia de un gel de poliacrilamida y utilizando anticuerpos contra las proteínas. El complejo antígeno-anticuerpo formado puede ser detectado gracias a un segundo anticuerpo unido al enzima peroxidasa que reacciona con su substrato produciendo una reacción quimioluminiscente.

#### Soluciones y tampones

##### Tampón de transferencia

25 mM Tris-HCL pH 8.3  
128 mM Glicina  
0.1 % SDS  
20 % metanol

##### Tampón TBS

20 mM Tris-HCL pH 7.4  
150 mM NaCl

Tampón TBST

Tampón TBS + 0.05 % de Tween 20

Solución de bloqueo

8% en leche desnatada con TBST

Solución de ECL

Reactivo de ECL ( Amersham, England)

Procedimiento:

Una vez las proteínas se han separado en el gel de poliacrilamida

- se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Hibond ECL, Amersham).
- se monta el sistema de transferencia (Bio-Rad) y se transfiere a 4 °C y 100 V durante 1 hora.
- se bloquea de 1-3 horas con leche en polvo o BSA
- incubar el anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
- Se hacen tres lavados de diez minutos con TBST
- Incubación del anticuerpo secundario durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se hacen tres lavados de diez minutos con TBST
- Revelado con quimioluminiscencia con anticuerpos secundarios peroxidasa: se incubaba la membrana durante 1 minuto con el reactivo ECL y se pone en contacto con un film de autoradiografía el tiempo necesario. Un vez expuesto, el film se revela. Lista de anticuerpos utilizados para western-*blot*.

<b>Antígeno</b>	<b>huesped</b>	<b>dilución</b>	<b>fuentes comercial</b>
GADD153	ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
SREBP-1	ratón	1:2000	Pharmingen
Citocromo C	ratón	1:2000	Pharmingen
Smac/Diablo	conejo	1:1000	Calbiochem
HIF-1 $\alpha$	ratón	1:500	Novus Biologicals
I $\kappa$ B- $\alpha$	ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Fosfotirosina	ratón	1:5000	Zymed

#### **7.4. Inmunoprecipitación**

20x10<sup>6</sup> células HepG2 fueron lisadas con el tampón 0.5% Igepal CA-630, 50mM Tris, 120mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NaF, 1mM NaP, pH 7.8 e incubadas durante 30 minutos a 4°C. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con 2µg del anticuerpo IκB-α y 40 µl de las bolas de proteína G-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C. El precipitado se lava tres veces con tampón de lisis y se realiza el inmunoblot como se describe en el apartado anterior. La membrana se bloqueó (5%BSA) durante 18 horas a temperatura ambiente e incubada con el anticuerpo anti-fosfotirosina (1:5000, Zymed) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

### 8.DETERMINACIÓN DEL ARN MENSAJERO DE c-IAP2 Y VEGF

#### **8.1 Extracción de ARN de células HepG2**

El ARN total de las células HepG2 se extrajo mediante TRIzol Reagent (Life Technologies Ltd) que es una modificación del descrito por Chomczynski P et al. 1987.

6x10<sup>6</sup> células se lisaron con 1ml de TRIzol durante 5 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos, tras lo que se le añadió 200µl de cloroformo y se agitaron durante 15 segundos para garantizar una buena mezcla de las diferentes soluciones. Después de dejarlos 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12.000 g y a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con 0.5 ml de isopropanol (idéntico volumen que la fase acuosa) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron los tubos a 12.000g a 4°C durante 10 minutos y se lavó el precipitado obtenido con etanol 75%. Finalmente, se resuspendió el ARN en el volumen correspondiente de H<sub>2</sub>O-DEPC.

La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (DU 640 Spectrophotometer, Beckman, USA). Una solución de ARN que tenga DO<sub>260</sub>=1 contiene aproximadamente 40 µg de ARN por ml. El cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm nos da una

medida de la pureza del ARN, una pureza óptima corresponde a un cociente  $DO_{260}/DO_{280}=1.7-2.0$ .

## 8.2. RT-PCR

Los niveles de ARNm para c-IAP2 y VEGF fueron analizados por RT-PCR. Para ello, 5  $\mu$ g de ARN total fue transcrito a su correspondiente cADN añadiendo 0.5  $\mu$ g de random primers, 1mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 U RNAsin, 10mM DTT, 10mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.5 mM espermidina y 20 U de transcriptasa reversa AMV (Life Technology Ltd) en un volumen total de 20 $\mu$ l. Las muestras se incubaron durante una hora a 42°C y 5 minutos a 90°C. Las reacciones de PCR se hicieron con 1.5  $\mu$ l de cada muestra en 1.5 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0., 0.2 mM de cada nucleotido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 0.6 mM de cada primer específico en un volumen total de 50 $\mu$ l. Las secuencias de los primers para c-IAP2 (GI 1184315, nucleótidos 571-590 y 1427-1446) y para VEGF (GI 19923239, nucleótidos 609-709 y 1430-1449). Mientras que la secuencia de los primers del gen control  $\beta$ -Actina (GI 5016088, nucleótidos 737-756 y 1132-1151). Los genes se amplificaron en el termociclador con el siguiente programa : 94°C 1.5 minutos, 55°C 2 minutos, 72°C 1 minuto, repitiendo el proceso durante 40 ciclos seguida de 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR y los marcadores se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 $\mu$ g/ml).



## RESULTADOS

### **Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress.**

Josep M. Lluís, Anna Colell, Carmen García-Ruiz, Neil Kaplowitz and José C. Fernández-Checa.

Gastroenterology 124: 708-724. 2003.

El consumo crónico de etanol produce una disminución selectiva de los niveles de GSH mitocondrial, debido a un defecto en el transporte de GSH desde el citosol a la matriz mitocondrial. El principal objetivo de este trabajo, fue evaluar el papel del acetaldehído sobre el transporte de mGSH en las células HepG2. El tratamiento con 100 $\mu$ M de acetaldehído durante 72 horas, produjo tanto una acumulación de lípidos en el citoplasma, como la presencia de megamitocondrias en las células HepG2 (Fig.1-2). Además, el acetaldehído disminuyó los niveles de mGSH de manera dosis y tiempo dependiente, sin afectar al glutathion citosólico (Fig.3). Los parámetros cinéticos del transporte de GSH en mitocondria, mostraron la presencia de dos componentes saturables, uno de alta y otro de baja afinidad, estimulados por ATP. El tratamiento con acetaldehído, aumentó la constante de Michaelis (Km) de manera más pronunciada para el componente de alta afinidad que para el de baja afinidad (Fig. 4). Todo indica que estos cambios se deben al aumento en la rigidez de la membrana mitocondrial, debido a la acumulación de colesterol, ya que la incubación de estas mitocondrias con el agente fluidificante A<sub>2</sub>C, normaliza el transporte de mGSH (Fig. 7). El enriquecimiento de colesterol en mitocondria aislada de hígado de rata, reprodujo la disfunción producida por el acetaldehído sobre el transporte de GSH mitocondrial (Fig. 9). El aumento en el contenido de colesterol en mitocondrias de células HepG2, fue precedido por un aumento en la expresión de GADD153, marcador del estrés en el retículo endoplasmático, y SREBP-1, un factor nuclear que induce la expresión de enzimas encargados de la síntesis de colesterol (Fig 12). Por último, la disminución de mGSH inducida por el acetaldehído, sensibilizó a las células HepG2 al efecto citotóxico del TNF- $\alpha$ , toxicidad que se previno con la ciclosporina, ester de GSH y lovastatina (Fig. 13).



## RESULTADOS

### **Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity.**

Anna Colell, Carmen García-Ruiz, Josep Maria Lluís, Olga Coll, Montse Mari, José C. Fernández-Checa.

J. Biol. Chem. 278(36): 33928-35. 2003.

La permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT) juega un papel clave en la muerte celular. Tras la apertura del poro, se inicia una vía de señalización intracelular favoreciendo la liberación de factores proapoptóticos, y el ensamblaje del complejo multiprotéico llamado apoptosoma, capaz de inducir la cascada de activación de las caspasas. En este trabajo se estudia la regulación del MPT por la fluidez de la membrana mitocondrial, en función de los niveles de colesterol. Las mitocondrias enriquecidas en colesterol, mostraron una disminución en la fluidez de la membrana, que altera la respuesta a la permeabilidad mitocondrial transitoria inducida por el atractilósido (ligando del ANT que lo estabiliza en su conformación c) (Fig.2). Este efecto depende de la cantidad de colesterol incorporado en la membrana mitocondrial, y se normalizó al fluidificar estas mitocondrias con el agente A<sub>2</sub>C (Fig.3-6). La respuesta de los mitoplastos, provenientes de las mitocondrias enriquecidas en colesterol, al atractilósido fue semejante a la de la mitocondria intacta. Esto fue acompañado por la observación de que el aumento en colesterol se produjo por igual, tanto en la membrana externa como interna de la mitocondria (Fig.5). Los efectos del colesterol sobre la inducción del MPT por el atractilósido, se refleja en una disminución de la liberación de las proteínas proapoptóticas: citocromo c, Smac/Diablo y el factor inductor de la apoptosis (AIF) (Fig.4). Sin embargo, el enriquecimiento en colesterol no afectó al transporte mitocondrial de ADP, disociando el papel del ANT en el MPT y como transportador antiporte de ADP/ATP (Fig.8).

## RESULTADOS

### **Mitochondrial glutathione depletion sensitizes hepatocytes to hypoxia.**

Josep M. Lluís, Albert Morales, Carmen Blasco, Anna Colell, Montserrat Mari, Carmen García-Ruiz, José C. Fernández-Checa.

Hepatology (en revisión)

La generación de radicales libres (ROS) por parte de la mitocondria, forma parte de la respuesta celular frente a la hipoxia. En este trabajo analizamos el papel del mGSH en la supervivencia de las células HepG2 durante la hipoxia. Aunque las células HepG2 en hipoxia (5%O<sub>2</sub>), mostraron un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno dentro de las 48-72 horas, esto no afectó a la viabilidad celular. La incubación con los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, rotenona (complejo I) y TTFA (complejo II), previnieron esta producción endógena de ROS (Fig.1). La hipoxia activó de forma tiempo dependiente a los factores de transcripción NF-κB y HIF-1α (Fig.2), induciendo la expresión génica de c-IAP2, VEGF (Fig.4), y aumentando la secreción de TNF-α (Fig.3).

La activación de NF-κB por la hipoxia, se produjo a través de la fosforilación en tirosina de IκB-α, en ausencia de degradación por el proteosoma (Fig.5). La depleción del GSH intracelular en células HepG2 por el dietilmaleato (DEM) y la butionina sulfoximina (BSO), aumentó la generación de ROS respecto a las células hipóxicas sin tratamiento, dando lugar a una muerte predominantemente necrótica (Fig. 7-8). Esta sensibilización debida a la depleción de GSH, fue precedida por la disminución en la expresión de c-IAP2 y VEGF. Aunque la sensibilización a la hipoxia por el DEM/BSO, fue acompañada por una disminución del GSH citosólico y mitocondrial, la adición de los inhibidores de los complejos I y II, rescataron a las células con GSH disminuido, de la muerte inducida por la hipoxia. Además, la disminución selectiva de los niveles de mGSH en hepatocitos de rata con el agente HP, produjo una sensibilización a la muerte celular por la hipoxia, debido a una sobreproducción de ROS. Por lo tanto, todo parece indicar que el mGSH controla la supervivencia celular durante la hipoxia, al regular la generación mitocondrial de radicales libres.

## DISCUSIÓN

El primer trabajo aporta información sobre el mecanismo implicado en la disminución selectiva de mGSH, resultante de la disfunción en el transportador de mGSH, debido al consumo crónico de etanol. El acetaldehído, el primer metabolito del metabolismo oxidativo del etanol, reproduce en las células HepG2, el descenso en el contenido mGSH observado en el modelo experimental en ratas de intoxicación crónica con etanol (García-Ruiz C et al. 1994). Nuestros resultados describen por primera vez los parámetros cinéticos del transporte de GSH en mitocondria de las células HepG2, similares a los descritos previamente para mitocondria de hígado de rata.

El acetaldehído redujo la afinidad (aumentó la  $K_m$ ) de ambos transportadores, en especial del componente de alta afinidad. Estos datos implican al acetaldehído como principal responsable de la disfunción en el transporte de mGSH, reproduciendo algunos de los efectos observados tras la ingesta crónica de etanol. Sin embargo, no se puede descartar la intervención de otros factores que contribuyan a la disminución de la  $V_{max}$  de ambos componentes, observada en mitocondrias de ratas alcohólicas. Los efectos del etanol frente a los del acetaldehído, y/o las diferencias en la composición de la membrana mitocondrial entre las mitocondrias de hígado de rata y de las células HepG2, podrían influir en estos cambios.

A pesar de que la concentración de acetaldehído utilizada para este estudio podría parecer no fisiológica, valores similares o incluso superiores se han descrito recientemente en células de hepatoblastoma con la capacidad de metabolizar el etanol (Clemens DL et al. 2002).

Una de las características del transportador de GSH mitocondrial en hígado de rata, es su sensibilidad a un aumento en la viscosidad de la membrana mitocondrial (Colell A et al. 2001). El acetaldehído incrementó el parámetro de ordenamiento ( $r$ ) de las mitocondrias de las células HepG2, en particular en el dominio adyacente al extremo polar de los fosfolípidos. Además, la fluidificación *in vitro* de la mitocondria con  $A_2C$ , restauró los valores de fluidez de la

membrana mitocondrial y normalizó el transporte inicial de GSH, tanto a concentraciones bajas como altas. Como la composición lipídica afecta la microviscosidad de la membrana, examinamos en detalle la composición de la mitocondrias de las células HepG2 tratadas con acetaldehído. Cabe destacar dos aspectos, el acetaldehído no cambió la distribución de los ácidos grasos en los fosfolípidos, pero si que aumentó el cociente molar colesterol /fosfolípidos en la mitocondria. Además, nuestros datos en mitoplastos de células tratadas con acetaldehído, así como los provenientes de mitocondria enriquecida en colesterol, mostraron un incremento de colesterol en la membrana interna mitocondrial. Por lo tanto, el paralelismo entre el incremento de colesterol y la viscosidad de la membrana en mitoplastos y mitocondria intacta, indican que los cambios relevantes en la modulación de transporte de mGSH ocurren en la membrana interna mitocondrial, donde está localizado el transportador. Estudios recientes han mostrado que el MPT altera la fluidez de la membrana mitocondrial. Sin embargo, no parece probable que la disfunción en el transporte de mGSH inducido por el acetaldehído sea mediado por el MPT, porque el acetaldehído no provocó el hinchamiento mitocondrial. Del mismo modo, la apertura del poro deriva en la fluidificación de la membrana mitocondrial, lo que provocaría un aumento y no una disminución en el transporte de mGSH (Ricchelli F et al. 1999).

Aunque el mecanismo por el cual el acetaldehído induce la movilización y acumulación de colesterol en la membrana mitocondrial no es conocido, su relevancia en la perturbación del transporte mGSH se confirma con nuestros resultados en mitocondria de hígado de rata enriquecida con colesterol libre. Una incorporación de colesterol *in vitro* semejante a la obtenida por el tratamiento con acetaldehído, reproduce los efectos observados sobre el transportador de mGSH. Estos resultados sugieren que la modulación de los niveles de colesterol y/o su tráfico hasta la mitocondria, podría constituir una nueva estrategia para prevenir el defecto en el transporte de mGSH causado por el consumo crónico de etanol.

En la búsqueda de los mecanismos que provocan el aumento de colesterol por el acetaldehído evaluamos la participación del UPR mediante la expresión de genes que se inducen durante el estrés en el retículo endoplasmático. El acetaldehído estimuló un aumento tiempo dependiente tanto de GADD153 como SREBP-1. Cabe destacar que el aumento en los factores SREBP-1 y GADD153 ha sido observado previamente en modelos de ratas alcohólicas (You M et al. 2002, Cheng J et al. 2003). En consonancia con estos resultados, Werstuck GH et al. 2001 mostraron que la inducción del estrés en el RE por la homocisteína y la tunicamicina, va acompañada de un aumento de colesterol en la células HepG2. Sin embargo, en este trabajo no estudiaron la regulación de colesterol a nivel mitocondrial. Aunque nosotros no hemos estudiado la regulación de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) por el acetaldehído, sí que demostramos que la inducción de SREBP-1 precede a la acumulación de colesterol en la mitocondria. Además, se ha observado que la inhibición de HMG-CoA reductasa por lovastatina (Scharnagl H et al. 2001) previno el incremento de colesterol y la disminución de mGSH, inducido por el acetaldehído.

El disulfiram, que inhibe la enzima aldehído deshidrogenasa, fue incapaz de bloquear el aumento de colesterol y la consiguiente perturbación de la membrana mitocondrial, apuntando a que el acetaldehído *per se*, y no su metabolismo, es el principal responsable del aumento en los niveles de colesterol.

Los mecanismos por los que el acetaldehído provoca el UPR no han sido descritos, pero dado que en el RE se producen las modificaciones postranscripcionales, el plegamiento y la oligomerización de las proteínas, es factible que la reactividad del grupo carboxilo del acetaldehído interfiera con cualquiera de estos procesos, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas e induciendo el UPR, y el consiguiente cúmulo de colesterol en la mitocondria. Esta hipótesis explicaría porque el acetaldehído provoca un aumento en GADD153, una chaperona específica del RE, cuya inducción durante el UPR refleja el estrés en el RE.

Asimismo, este trabajo analiza las consecuencias de la disminución de mGSH en las células HepG2 durante el tratamiento con acetaldehído. Nuestros resultados muestran que las células HepG2, que son resistentes a TNF- $\alpha$  (Hill DB et al. 1995), al ser preincubadas con acetaldehído, son sensibilizadas al efecto citotóxico del TNF- $\alpha$ . Esta sensibilización ocurre a pesar de la activación del factor NF- $\kappa$ B (Roman J et al. 1999).

La ciclosporina (inhibidor del MPT) protegió a las células HepG2, expuestas a acetaldehído, contra el TNF- $\alpha$ . Esto sugiere que la sensibilización frente al TNF- $\alpha$ , implica una muerte celular dependiente de la mitocondria. Existen evidencias de que el etanol induce el MPT (Pastorino JG et al. 1999), indicando la relevancia del mGSH en la supervivencia de los hepatocitos frente al TNF- $\alpha$  (Colell A et al. 1998, Pastorino JG et al. 2000, Nakagami M et al. 2001), al controlar la generación de ROS en la mitocondria y regular la oxidación de residuos cisteínas de las proteínas que forman el MPT (Constantini P et al. 2000). Sin embargo, no se puede descartar la participación del RE en la muerte celular, a través de la activación de la caspasa 12 como consecuencia del estrés en el RE (Rao RV et al. 2002).

Estos datos coinciden con otro trabajo que presenta al acetaldehído como responsable de la inducción de la síntesis de ácidos grasos y colesterol, debido a la activación del factor nuclear SREBP-1 (You M et al. 2002). Además, el pretratamiento con lovastatina, protege a las células tratadas con acetaldehído, de su sensibilización al TNF- $\alpha$ . Por lo tanto, esto sugeriría un papel protector de las estatinas frente a la enfermedad hepática alcohólica. Son necesarios más estudios para determinar la regulación del aumento de colesterol en la membrana mitocondrial, la depleción de mGSH, y la sensibilización frente al TNF- $\alpha$  en ratas alcohólicas tratadas con estatinas. El uso terapéutico de las estatinas en el tratamiento de la hepatopatía alcohólica, es particularmente atractivo debido a su relativa baja hepatotoxicidad (Chitturi S et al. 2002).

En resumen, este estudio describe un nuevo esquema en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica, en donde el acetaldehído disminuye el transporte de mGSH a través del estrés en el RE. Nosotros proponemos, que el

acetaldehído activa SREBP-1, dando lugar a la síntesis *de novo* de colesterol y el consiguiente transporte e incorporación en la mitocondria, resultando en un transporte de mGSH defectuoso y sensibilización frente al TNF- $\alpha$ .

Puesto que existen estudios mostrando que la inducción del MPT por el Ca<sup>2+</sup>, histidina o diamida, va acompañada de un incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial (Richelli F et al. 1999), decidimos estudiar la influencia de la microviscosidad de la membrana sobre el MPT. Las mitocondrias controles expuestas al atractilósido (ATR), muestran hinchamiento mitocondrial y la liberación de proteínas intermembrana como el citocromo *c*, Smac/DIABLO y AIF. Por el contrario, la subunidad II de la proteína citocromo oxidasa no se libera, mostrando la especificidad de este proceso. Además, la preincubación con ciclosporina (CsA) previene esta cadena de sucesos. Estos datos coinciden con estudios anteriores (Marzo I et al. 1998, Belzacq AS et al. 2002), indicando que el hinchamiento mitocondrial inducido por el ATR, es un proceso determinante para el desarrollo del MPT.

Para aumentar los niveles de colesterol en la mitocondrias, las incubamos con el complejo colesterol-BSA. Se verificó que la proteína mitocondrial no aumentaba tras la incubación con el complejo colesterol-BSA, y que el BSA por si sólo no afectaba los parámetros analizados en este trabajo, actuando únicamente como vehículo del colesterol. Las mitocondrias de hígado de rata se enriquecieron en colesterol con un cociente molar de colesterol/fosfolípidos, que previamente se había demostrado que afectaban la fluidez de la membrana mitocondrial (Kojro E. et al. 2001). Para evaluar las propiedades dinámicas de la membrana mitocondrial, utilizamos la sonda DPH que se incorpora cerca de la región polar de la bicapa, TMA-DPH que se une a la superficie de la membrana y el derivado del ácido esteárico, 9-AS, que monitoriza la fluidez de zonas más internas en la bicapa. Nuestros resultados muestran que los cambios de fluidez en la membrana mitocondrial provocados por el colesterol se producen principalmente en la región externa de la bicapa lipídica. Resultados similares a los nuestros, entre los niveles de colesterol y los valores obtenidos con la sonda DPH, se han descrito en mitocondria de corazón de cerdo (Rouslin W et al. 1982), en células

epiteliales de riñón (Gimpl G et al. 1997) y en mitocondria de células HepG2. El enriquecimiento en colesterol tanto de la membrana mitocondrial externa como de la interna, se acompañó de una disminución en la inducción del MPT por el ATR, al prevenir el hinchamiento mitocondrial y disminuir la liberación de los factores proapoptóticos. Para evaluar si estos efectos eran debidos al colesterol *per se*, o a los cambios inducidos por éste en las propiedades dinámicas de la bicapa, utilizamos el agente fluidificante A<sub>2</sub>C. La preincubación de este agente con mitocondrias enriquecidas en colesterol, restauró la sensibilidad del ANT al ATR. La afinidad del ATR por ANT es del rango nanomolar (Belzacq AS et al. 2002), por tanto, la concentración de 100µM de ATR utilizada en nuestros experimentos minimiza la posibilidad de que la disminución en la respuesta al ATR sea debida a que el colesterol altere la capacidad del ligando a unirse al ANT. Todo esto apunta a que la modulación del colesterol sobre el MPT, inducido por la interacción entre el ATR y el ANT, se produce a través de los cambios en la fluidez de la membrana mitocondrial.

Por otro lado, se observó como la incorporación de colesterol en la membrana mitocondrial no influyó en la funcionalidad del ANT como transportador de ADP/ATP. Estos resultados van en concordancia con los descritos en mitocondrias de hígado de ratas alcohólicas, donde cambios en la composición lipídica de la mitocondria , provocan cambios en la fluidez de la membrana que no alteran el transporte de ATP/ADP (Colell A et al. 1997).

Se podría especular que la disfunción del MPT en respuesta al ATR, se debe al efecto del colesterol sobre otro componente del poro mitocondrial, al interaccionar con el ANT. Hay muchas evidencias que apuntan al ANT como componente del MPT, aunque la composición completa y la regulación de este complejo multiproteico no está muy clara (He L et al. 2002). Los modelos actuales, proponen la interacción y asociación del ANT con proteínas de la membrana externa, incluyendo a VDAC y Bax (Beutner G et al. 1998, Crompton M et al. 1998). En este sentido, la liberación desde la mitocondria del citocromo *c*, AIF, y Smac/DIABLO inducida por la xantina/xantina oxidasa al generar el anión superóxido, es independiente de los niveles de colesterol y se previene con



el anticuerpo anti-VDAC (Colell A et al. 2004). Aunque es tentador involucrar al receptor de benzodiazepinas (transportador de colesterol) en esta disfunción del MPT, su interacción con el poro a través de VDAC y la normalización de la respuesta al atractilosido, en las mitocondrias enriquecidas en colesterol tras ser fluidificadas con A<sub>2</sub>C, descarta su participación.

El colesterol tiene un papel dual, por un lado es capaz de regular la respuesta del ANT al ATR, sin afectar su funcionalidad como transportador de ADP/ATP. En esta línea, se han descrito dos mecanismos diferentes en la regulación del ANT por Bax. La inhibición que provoca Bax en el intercambio de ADP/ATP, es independiente de su capacidad de crear canales al interaccionar con ANT.

Al jugar el MPT un papel principal en la muerte tanto apoptótica como necrótica, estas observaciones podrían tener unas consecuencias importantes en el control de la muerte celular. Nuestros resultados apuntan a que el colesterol afecta la función proapoptótica del ANT, sin comprometer su funcionalidad como transportador. Como la estimulación en el intercambio de ADP/ATP contribuye a la supervivencia celular (Vander Heiden MG et al. 1999), la regulación independiente de las dos funciones del ANT a través de las alteraciones en la fluidez de la membrana inducida por el colesterol, proporcionarían una ventaja para la supervivencia celular. Situación que se observa en ciertos tipos de células tumorales, cuyos niveles de colesterol en la mitocondria son mayores que en el tejido normal (Feo F et al. 1975 , Campbell AW et al. 2002), lo que podría provocar una resistencia a los estímulos apoptóticos que actúen vía ANT.

Por último, hemos examinado la respuesta de las células HepG2 frente a la hipoxia moderada. Mientras que la generación de ROS por parte de la mitocondria confirma lo observado en otros estudios, por primera vez se evalúa el papel del mGSH en la supervivencia celular durante la hipoxia. Varios tipos celulares responden a una reducción en la tensión de oxígeno (1.5 %-5% O<sub>2</sub>) con una generación de radicales libres, efecto que es prevenido con inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (Chandel NS et al. 1998, Paddenberg R et al. 2003). Coincidiendo con estas observaciones, la exposición de las células HepG2 y de los hepatocitos de rata al 5% O<sub>2</sub>, estimularon la producción de ROS por

parte de la mitocondria. El bloqueo en la generación de ROS, al incubar con los inhibidores de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial durante la hipoxia, indican que la generación de peróxido podría proceder del grupo flavin mononucleotido del complejo I, al revertirse la transferencia electrónica, como se ha descrito recientemente (Schumacker PT et al. 2002). Pero también hay grupos que implican al complejo III de la cadena respiratoria como fuente generadora de ROS en la hipoxia (Chen Q et al. 2003). Por lo tanto, no se puede descartar que la capacidad de los inhibidores del complejo I y II en prevenir esta producción de radicales libres, se deba a la inhibición del flujo electrónico hacia el complejo III.

La generación de ROS en las células HepG2 y en los hepatocitos de rata durante la hipoxia (5%O<sub>2</sub>), no afectó a la viabilidad celular, indicando que estos radicales libres procedentes de la mitocondria, actúan más como señalizadores intracelulares, que como especies tóxicas para la célula. De hecho, se ha descrito que la regulación de la Na,K-ATPasa por la hipoxia es a través de los ROS mitocondriales, al intervenir en la vía de la PKC $\zeta$  (Dada LA et al. 2003).

Esta estimulación en la producción endógena de ROS en las células HepG2, va acompañada de la activación de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y HIF- $\alpha$ , y la consiguiente inducción de sus genes diana como TNF- $\alpha$ , cIAP-2 y VEGF. Y como se había observado anteriormente (Chandel NS et al. 2000), la inhibición de la generación de ROS durante la hipoxia impide, tanto la activación de los factores nucleares como de sus genes diana, apuntando a que los radicales libres podrían actuar como segundos mensajeros. Un aspecto muy interesante de nuestro estudio, es que la activación de NF- $\kappa$ B por la hipoxia, no va acompañada de la degradación de su subunidad inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$ . A diferencia de la mayoría de estímulos que activan NF- $\kappa$ B, esta vía alternativa, permite la liberación de NF- $\kappa$ B de su subunidad inhibidora, sin la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  por el proteosoma. (Imbert V et al. 1996). La capacidad de la genisteina (inhibidor de las tirosin quinasas) de bloquear la activación de NF- $\kappa$ B y el aumento tiempo dependiente en la fosforilación en tirosina de I $\kappa$ B- $\alpha$ , muestran el papel clave de

las tirosin quinasas en la activación de NF- $\kappa$ B debida a la hipoxia. Como el peróxido de hidrógeno puede modular la fosforilación en los residuos serina, treonina y tirosina (Rhee SG et al. 2000), es posible que la producción de peróxido de hidrógeno durante la hipoxia, regule la actividad de las tirosin quinasas.

A parte de la implicación del factor VEGF en la angiogénesis (Semeza GL 2001), también se ha descrito que tiene un papel antiapoptótico en la hipoxia, al activar la vía de las MAPK quinasas (Baek JH et al. 2000). Por tanto, la inducción de los genes dependientes de HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, como son VEGF y cIAP-2 respectivamente, podrían formar parte de la respuesta adaptativa a la supervivencia celular frente a la hipoxia. Sin embargo, cuando en condiciones de hipoxia se disminuye el GSH, la generación masiva de ROS disminuye los niveles de VEGF y cIAP-2. Estos resultados indican que en función de los niveles de radicales libres, se regularán los factores nucleares sensibles al estado redox, HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, provocando la inducción o inhibición de factores implicados en la supervivencia celular.

En la evaluación de la supervivencia de las células HepG2 frente a la hipoxia, nos centramos en el papel del GSH celular, con principal interés en el *pool* mitocondrial. Debido a que hay evidencias de que la depleción selectiva de mGSH, sensibiliza a los hepatocitos frente a la acción del TNF- $\alpha$  y de los esfingolípidos (Garcia-Ruiz C et al. 2003 , Mari M et al. 2004). Una estrategia para disminuir selectivamente los niveles de mGSH en hepatocitos primarios de rata, es el uso del agente HP (aceptor de Michael en la mitocondria) que se conjuga con el mGSH (Shan X et al. 1993). Como el HP no modificó los niveles de mGSH en las células HepG2, utilizamos la combinación de los agentes DEM/BSO, que provocó una reducción tanto en el *pool* citosólico como mitocondrial de GSH. La coincubación de rotenona y TTFA, que previenen la generación de ROS desde la mitocondria, protegieron a las células tratadas con DEM/BSO durante la hipoxia. De la misma forma que lo hizo el ester de GSH, al normalizar los niveles de glutatión celular total. Además, la disminución selectiva de mGSH con el agente HP en hepatocitos de rata, provocó su

sensibilización frente a la hipoxia. Indicando que el *pool* crítico de GSH para la supervivencia celular durante la hipoxia, es el mitocondrial.

Nuestros datos podrían tener consecuencias en el daño hepatocelular inducido por el alcohol, en particular en el área del hígado más sensible a los efectos tóxicos del etanol. En condiciones fisiológicas, la tensión de oxígeno en el hígado es alrededor de 65 mmHg (~16% O<sub>2</sub>) en el área periportal y desciende hasta 35 mmHg (~10% O<sub>2</sub>) en la zona perivenosa (Israel Y et al. 1975, Ji S et al. 1982). El metabolismo oxidativo del etanol incrementa el consumo de oxígeno, aumentando el gradiente de O<sub>2</sub> existente entre la vena portal y la zona perivenosa. Por lo tanto, el uso de la hipoxia moderada (5%O<sub>2</sub>) utilizada para este estudio, podría reproducir los niveles de O<sub>2</sub> alcanzados en la zona del hígado más dañada en los pacientes alcohólicos.

El sinergismo entre el bajo contenido de mGSH y la hipoxia en los hepatocitos perivenosos durante el consumo crónico de alcohol, podría contribuir a su susceptibilidad frente a la toxicidad del etanol.



## CONCLUSIONES

1. Los estudios cinéticos del transporte de mGSH en células HepG2, revelan la existencia de dos componentes, de alta y baja afinidad para el glutatión. El tratamiento con acetaldehído no varió significativamente la  $V_{\max}$  de ambos, pero sí que aumentó la  $K_m$  de manera más pronunciada para el componente de alta afinidad que para el de baja afinidad.
2. El cúmulo de colesterol en la mitocondria inducido por el acetaldehído, provoca un aumento de la rigidez de la membrana mitocondrial, lo que se traduce en una disminución en la velocidad de transporte de glutatión.
3. La disminución del mGSH inducida por el acetaldehído sensibiliza a las células HepG2 frente a los efectos citotóxicos del TNF- $\alpha$ .
4. La pérdida de fluidez de la membrana mitocondrial como consecuencia del aumento en su contenido de colesterol, provoca una resistencia a la apertura del poro mitocondrial (MPT) inducida por el atractilósido, mostrando la dependencia del ANT como componente del MPT a las propiedades fisicoquímicas de la membrana.
5. Sin embargo, la función del ANT como translocador de ADP/ATP es insensible a los cambios de fluidez de membrana.
6. El glutatión mitocondrial es un factor crítico en el control de la viabilidad celular en respuesta a la hipoxia. La disminución del glutatión mitocondrial sensibiliza a las células frente a la hipoxia, al amplificar la producción de radicales libres mitocondriales inducida por la hipoxia.

## BIBLIOGRAFÍA

Acker H. Cellular oxygen sensors. *Ann N Y Acad Sci.* 718:3-10. 1994.

Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20:453-60. 1994.

Agani F, Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol. Chem.* 275(46):35863-7. 2000.

Agani F, Semenza G. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol. Pharmacol.* 54:749-754.1998.

Andreyev A, Fiskum G. Calcium induced release of mitochondrial cytochrome Cc by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death Differ.* 6:825-32. 1999.

Armstrong JS, Jones DP. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J.* 16(10):1263-5. 2002.

Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 19:4621-31. 2000.

Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 28(5):1318-1326. 1998.

Bailey SM, Patel VB, Young TA, Asayama K, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res.* 25(5):726-33. 2001.

Beg A, Sha W, Bronson R, Ghosoh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the Rel A component of NF- $\kappa$ B. *Nature* 376:167-170. 1995.

Belzacq AS, Vieira LA, Kroemer G, Brenner C. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* 84:167-176. 2002.

Belzacq AS, Vieira LA, Verrier F, Vandecasteele G, Cohen I, Brenner C, Kroemer G. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Research* 63:541-546. 2003.

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomemb.* 26:509-17. 1994.

Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka .Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1368:7-18. 1998.

Bosron WF, Magnes LJ, and Li TK. Human liver alcohol dehydrogenase: ADH Indianapolis results from genetic polymorphism at ADH2 gene locus. *Biochem Genet.* 21:735-744. 1983.

Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, Caporaso N, Chen C, Coutelle C, Diehl SR, Hayes RB, Olshan AF, Schwartz SM, Sturgis EM, Wei Q, Zavras AI, Benhamou S. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 159(1):1-16. 2004.

Brown M, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *PNAS* 96:11041-48. 1999.

Bruguera M, Beltrán A, Bombí JA ,Rodes J. Giant mitochondria in hepatocytes. A diagnostic hint for alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 73:383-387. 1977.

Campbell AW, Capuano A, Chan SMP. A cholesterol-binding and transporting protein from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys.* 1567:123-132. 2002.

Carmichael FJ, Orrego H, Saldivia V, Israel Y. Effect of propylthiouracil on the ethanol-induced increase in liver oxygen consumption in awake rats. *Hepatology* 18:415-21. 1993.

Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondria function. *Neurochem. Int.* 40:475-486. 2002.

Castedo M, Perfettini JL, Kroemer G. Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor. A novel target for viral and pharmacological manipulation. *J. Exp. Med.* 196:1121-1126. 2002.

Cederbaum AI. Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 7:559-567. 1989.

Chai J, Du C, Wu JW, Kyng S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862. 2000.



Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J Biol. Chem.* 272(30):18808-16. 1997.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Matheiu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *PNAS* 95:11715-20.1998.

Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J. Immunol.* 165:1013-21. 2000.

Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumacker PT. Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene* 19:3840-48. 2000.

Chandra D, Liu JW, Tang DG. Early mitochondrial activation and cytochrome c upregulation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:50842-54. 2002.

Chautan M, Chazal G, Geconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.* 9:967-970. 1999.

Chen J, Clemens DL, Cederbaum AI, Gao B. Ethanol inhibits the JAK-STAT signalling pathway in freshly isolated rat hepatocytes but not in cultured hepatocytes or HepG2 cells: evidence for a lack of involvement of ethanol metabolism. *Clin. Biochem.* 34(3):203-9. 2001.

Chen J, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 124:1488-1499. 2003.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278(38):36027-36031. 2003.

Chen Z, Lash LH. Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285:608-18. 1998.

Chen Z, Putt DA, Lash LH. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:193-202. 2000.

Chernyak BV, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem* 238:623-630. 1996.

Chitturi S, George J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, anti-diabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. *Semin. Liver Dis.* 22:169-183. 2002.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9. 1987.

Clemens DL, Forman A, Jerrells TR, Sorrell MF, Tuma DJ. Relationship between acetaldehyde levels and cell survival in ethanol-metabolizing hepatoma cells. *Hepatology* 35:1196-1204. 2002.

Colell A, Coll O, García-Ruiz C, París R, Tiribelli C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. *Hepatology* 31:1141-52. 2001.

Colell A, García-Ruiz C, Mari M, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett.* 560:63-68. 2004.

Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 115:1541-51. 1998.

Colell A, García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-Adenosyl-L-Methionine. *Hepatology* 26: 699-708. 1997.

Coleman WB, Cunningham CC. Effects of ethanol consumption on the synthesis of polipeptides encoded by the hepatic mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Acta* 1019:142-150. 1990.

Coll O, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 38(3): 692-702. 2003.

Constantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Larochetter N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 13:307-314. 2000.

Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. biochem.* 52:187-222. 1983.

- Cox JS, Chapman RE, and Walter P. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell.* 8:1805-1814. 1997.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 84: 143-152. 2002.
- Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* 258:729-735. 1998.
- Cui L, Yoon S, Schinazi RF, Sommadossi JP. Cellular and molecular events leading to mitochondrial toxicity of 1-(2-Deoxy-2-Fluoro-1- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl)-5-Iodouracil in human. *J. Clin. Invest.* 95:555-63. 1995.
- Cunningham CC, Bottenus RE, Spach PI and Rudel LL. Ethanol-related changes in liver microsomes and mitochondria from the monkey, *Macaca fascicularis*. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 7(4): 424-430. 1983.
- Cunningham CC, Filus S, Bottenus RE, Spach PI. Effect of ethanol consumption on the phospholipid composition of rat liver microsomes and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 712:225-233. 1982.
- Cunningham CC, Spach PI. The effect of chronic ethanol consumption on the lipids in liver mitochondria. *Alcohol and the cell. Ann. NY. Acad. Sci.* 492:181-192. 1987.
- Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JJ. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J. Clin. Invest.* 111:1057-64. 2003.
- Deng L, Lin-Lee YC, Claret FX, Kuo MT. 2-acetylaminofluorene up-regulates rat *mdr1b* expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway. *J. Biol. Chem.* 276(1):413-20. 2001.
- Dennis SC, Lai JCK, Clark JB. Comparative studies on glutamate metabolism in synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Biochem J.* 164: 727-736. 1977.
- Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as a central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10:369-377. 2000.
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252. 1999.

- Dill KA, Chan HS. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* 4:10-9. 1997.
- Druker BJ, Neumann M, Okuda K, Franza BR, Griffin JD. Rel is rapidly tyrosine-phosphorylated following granulocyte-colony stimulating factor treatment of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 269(7): 5387-90. 1994.
- Ehleben W, Porwol T, Fandrey J, Acker H. The influence of Phenobarbital on cytochromes and reactive oxygen species in erythropoietin producing HepG2 cells. *FEBS Lett.* 440:343-347. 1998.
- Ellingson JS, Taraschi TF, Wu A, Zimmerman R, Rubin E. Cardiolipin from ethanol-fed rats confers tolerance to ethanol in liver mitochondrial membranes. *PNAS* 85: 3353-3357. 1988.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogowa K, Poellinger L, Kuriyama YF. Molecular mechanism of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia : their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18(7):1905-14. 1999.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogowaka K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyana Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *PNAS* 94:4273-78. 1997.
- Epanand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epanand RM. Transbilayer lipid diffusion promoted by Bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* 42:14576-82. 2003.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou J. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J. Cell. Biol.* 143:217-224. 1998.
- Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF. Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  activates NF $\kappa$ B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 278(17): 2072-2080. 2003.
- Feo F, Canuto RA, Garcea R, Gabriel L. Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol-enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123. *Biochim. Biophys. Acta* 413:116-134. 1975.
- Ferguson RA, Goldberg DM. Genetic markers of alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta.* 257:199-250. 1997.

Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1):G7-17. 1997.

Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis.* 18(4):389-401. 1998.

Fernandez-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration. *J. Clin. Invest.* 83(4):1247-52. 1989.

Fiermonte G, Dolce V, Palmieri L, Ventura M, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE. Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 276: 8225-30. 2001.

Folch J, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1):497-509. 1957.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J. Clin. Invest.* 111:197-208. 2003.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 272(17):11369-77. 1997.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol. Chem.* 277(39): 36443-82002. 2002.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J.* 14:847-858. 2000.

Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 94:193-201. 1994.

Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A, Rodés J, Yi Y, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. *J. Biol. Chem.* 270: 15946-49. 1995.

- Ghosh S, Baltimore D. characterization of IkappaB kinases. IkappaB-alpha is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate. *Nature* 344(6267):687-82. 1990.
- Gimpl G, Burger K, Farenholz F. Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36:10959-74. 1997.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 1:19-30. 2002.
- Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine. *J. Biol. Chem.* 254: 7558-60. 1979.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third  $\alpha$ -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 $\alpha$ . *Gene Expr.* 7:205-213. 1998.
- Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 268:153-60. 1990.
- Handler JA and Thurman RG. Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 265:1510-1515. 1990.
- Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ. Res.* 79: 54-61. 1996.
- Hardwick JS, Sefton BM. The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505. *J. Biol. Chem.* 272(41): 25429-25432. 1997.
- He L, Lemasters JJ. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?. *FEBS Lett.* 512:1-7. 2002.
- Henehan GT, Ward K, Kennedy NP. Subcellular distribution of aldehyde dehydrogenases activities in human liver. *Alcohol* 2:107-110. 1985.
- Hill DB, Schmidt J, Shedelofsky SI, Cohen DA, McClain CJ. In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in HepG2 liver cells. *Hepatology* 21:1114-19. 1995.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109(9):1125-31. 2002.

- Hunter DR, Haworth JH, Southard JH. Relationship between configuration function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251: 5069-77. 1976.
- Imuro Y, Gallucci R, Luster RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26: 1530-1537. 1997.
- Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Heike PL, Britta-Mareen E, et al. Peyron JF. Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Cell* 86:787-98. 1996.
- Israel Y, Kalant H, Orrego H, Khanna JM, Videla L, Phillips JM. Experimental alcohol-induced hepatic necrosis; supresion by propylthiouracil. *PNAS* 72:1137-41. 1975.
- Israel Y, Orrego H, Niemelä O. Immune responses to alcohol metabolites: pathogenic and diagnostic implications. *Semin. Liver Dis.* 8:81-90. 1988.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. HIF-1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464-8. 2001.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim, Hebestreit HF et al. Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72. 2001.
- Javitt NB. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol and bile acids. *FASEB J.* 4:161-168. 1990.
- Ji S, Lemasters JJ, Christenson V, Thurman RG. Periportal and pericentral pyridine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver: evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia. *PNAS* 79:5415-5419. 1982.
- Jolliffe N, Jellinek EM. Vitamin deficiencies and liver cirrhosis in alcoholism. *Q.J. Stud. Alcohol.* 2:544-583. 1941.
- Keilin D, Harstree EF. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem. J.* 39:293-301. 1948.
- Keilin D. The history of cell respiration and cytochrome. *Proc. R. Soc. London Ser.* 100 :129-151. 1925.
- Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 304: 463-70. 2003.

Knecht KT, Thurman RG, Mason RP. Role of superoxide and trace transition metals in the production of  $\alpha$ -hydroxyethyl radical from ethanol by microsomes from alcohol dehydrogenase-deficient deer mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 303:339-348. 1993.

Kobayashi M, Seki T, Yaginuma K, Koike K. Nucleotide sequences of small ribosomal RNA and adjacent transfer RNA genes in rat mitochondrial DNA. *Gene* 16: 297-307. 1981.

Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Maz W, Fahrenholz. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *PNAS* 98:5815-20. 2001.

Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res.* 54(6):1425-30. 1994.

Korsten MA, Matsuzaki S, Feinman L, Lieber CS. High blood acetaldehyde levels following ethanol administration: Differences between alcoholic and non-alcoholic subjects. *N. Engl. J. Med.* 292:386-389. 1975.

Kosower ER, Kosower NS, Wegman P. Membrane mobility agents IV. The mechanism of particle-cell and cell-cell fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 471:311-319. 1977.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:619-642. 1998.

Kruman I, Guo Q, Mattson MP. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 51:293-308. 1998.

Kucharczak J, Simmons JM, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer –role of Rel/NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22:8961-82. 2003.

Kumar S, Rabson AB, Gélinas C. The RxxRxRxxC motif conserved in all Rel/kappa B proteins is essential for the DNA-binding activity and redox regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 12(7):3094-3106. 1992.

Lash LH, Putt DA, Matherly LH. Protection of NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, from chemical-induced apoptosis by overexpression of mitochondrial glutathione transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(2):476-486. 2002.



Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N. Engl J. Med.* 319:1630-1639. 1988.

Lieber CS, De Carli LM. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245:2505-2512. 1970.

Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15:573-592. 1991.

Lin DT, Lechleiter JD. Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* 277: 31134-31141. 2002.

Lindros KO. Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. *J. Hepatol.* 23(Suppl): 7-15. 1995.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts. Requiriments for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157. 1996.

Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Luo X, Nishijima M, Xie XS, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2:754-756. 2000.

Macho A, Hirsch T, Marzo I. Gluthatione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 158: 4612-19. 1997.

Madesh M, Hajnóczy G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* 155(6): 1003-1015. 2001.

Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> regulates cell motility and nuclear factor  $\kappa$ B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  following hypoxia/reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 278(52):52598-612. 2003.

Mari M, Colell A, Morales A, Pañeda C, Varela-Nieto I, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1 A, contributing to tumor necrosis factor-induced letal hepatitis. *J. Clin. Invest.* 113:895-904. 2004.

Martensson J, Lai CK, Meiestera. High-affinity transport of gluthatione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *PNAS* 87:7185-89.1990.

Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2(1):63-7. 2001.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Viera HLA, Prevost M et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281:2027-31. 1998.

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20:5197-5206. 2001.

Matouschek A, Rospert S, Schmid K, Glick BS, Schatz G. Cyclophilin catalyses protein folding in yeast mitochondria. *PNAS* 92:6319-23. 1995.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271-275. 1999.

McClain C, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease* 19(2):205-215. 1999.

McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the  $\beta$ -carbon of asparagine 803. *J. Biochem.* 367:571-575. 2002.

Meiester A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263(33): 17205-8. 1988.

Meister A, Yaniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y. Glutathione centennial. San Diego Academic Press :3-21. 1989.

Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A, Bennet BL, Young DB, Li JW, Pascual G, Motiwala A, Zhu H, Mann M, Manning AM. I $\kappa$ B kinase (IKK)-Associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol. Cell. Biol.* 19(2):1526-38. 1999.

Metcalfe LD, Schmitz AA. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* 33:363-64. 1961.

Miao K, Potter JJ, Anania FA, Rennie-Tankersley L, Mezey E. Effect of acetaldehyde on Sp1 binding and activation of the mouse  $\alpha_2(I)$  collagen promoter. *Arch. Biochem. Biophys.* 341:140-152. 1997.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 191:144-48. 1961.

Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:214-220. 2002.

Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 451-4. 2000.

Müller A, Sies H. Role of alcohol dehydrogenase activity and the acetaldehyde in ethanol-induced ethane and pentane production by isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* 206:153-156. 1982.

Muller CW, Harrison SC. The structure of the NF-kappa B p50: DNA-complex: a starting point for analysing the Rel family. *FEBS Lett.* 369(1):113-7. 1995.

Murphy RC, Schneider E, Kinnally KW. Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett.* 497:73-76. 2001.

Nakagami M, Wheeler MD, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M, Thurman RG. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced injury in the rat. *J. Biol. Chem.* 276: 36664-72. 2001.

Niemelä O, Juvonen T, Parkkila S. Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J. Clin. Invest.* 87:1367-1374. 1991.

Osaka K, Kondo T, Hori O, Kiato Y, Stern DM, Eisenmenger W, Ogawa S, Ohshima T. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating VEGF transport. *J. Clin. Invest.* 108:41-50. 2001.

Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus RC, Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284:L710-L719. 2003.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-66.1999.

Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Kramer R. Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J. Bioenerg. Biomemb.* 25:525-535. 1993.

Palmieri F. Mitochondria carrier proteins *FEBS Lett.* 346:48-54. 1994.

Palmieri L, Agrimi G, Runswick MJ, Fearnley IA, Palmieri F, Walker JE. Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxodipate and 2-oxoglutarate. *J. Biol. Chem.* 276:1916-22. 2001.

- Panés J, Soler X, Parés A, Caballeria J, Farres J, Rodes J, Pares X. Influence of liver disease on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Gastroenterology* 97:708-714. 1989.
- Pastorino JG, Hoek JW. Ethanol potentiates tumor necrosis factor cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 31:1141-52. 2000.
- Pastorino JG, Marcivenciciute A, Cahill A, Hoek JB. Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:405-09. 1999.
- Pernes JF. Lipids: Thin-layer chromatographic separation in twelve fractions by three successive unidirectional developments on the same plate. *J. Chromatog.* 181:254-258. 1980.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J.* 17:2202-08. 2003.
- Porta EA, Hartroft WS, Iglesia FA. Hepatic changes associated with chronic alcoholism in rats. *Lab. Invest.* 14:1437-1455. 1965.
- Puthalakath H, Huang DCS, O'Really LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3:287-296. 1999.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G., Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: an apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 277:21836-42. 2002.
- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE.* 2000:PE1. 2000.
- Ricchelli F, Gobbo S, Moreno G, Salet C. Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition. *Biochemistry* 38:9295-9300. 1999.
- Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem. Soc. Trans.* 31(6):1095-1105. 2003.
- Rippo MR, Malisan F, Ravagnan L, Tomassini B, Condo I, Constantini P, Susin SA, et al Testi R. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J.* 14:2047-54. 2000.

Robinson JB, Inman L, Sumegi B, Srere PA. Further characterization of the Krebs tricarboxylic cycle metabolon. *J. Biol. Chem.* 262:1786-90. 1987.

Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13:3179-3184. 1999.

Roman J, Colell A, Blasco C, Caballeria J, Pares A, Rodés J, Fernández-Checa JC. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HepG2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. *Hepatology* 30:1473-80. 1999.

Roman J, Giménez A, Lluís JM, Gassó M, Rubio M, Caballeria J, Pares A, Rodés J, Fernández-Checa JC. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 by acetaldehyde in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 272:14684-14690. 2000.

Rouslin W, MacGee J, Gupte S, Wesselman A, Epps DE. Mitochondrial cholesterol content and membrane properties in porcine myocardial ischemia. *Am. J. Physiol* 242:H254-H259. 1982.

Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using O-phthalaldehyde. *J. Lip. Res.* 14:364-366. 1973.

Scharnagl H, Schinker R, Gierens H, Nauck M, Wieland H, Marz W. Effect of atorvastatin, simvastatin and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 62:1545-55. 2001.

Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. I $\kappa$ B-independent control of NF- $\kappa$ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci.* 26(3):186-90. 2001.

Schumacker PT. Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol.* 543:57-71. 2003.

Schumacker PT. Hypoxia, anoxia, and O<sub>2</sub> sensing: the search continues. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:L918-L921. 2002.

Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 274:22581-22585. 1999.

Semenza G. HIF-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes & Dev.* 14:1983-91. 2000.

Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis *Curr Opin Genet Dev.* 8(5):588-94. 1998.

Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis : a chaperone escorts VEGF to the dance. *J. Clin. Invest.* 108:39-40. 2001.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-Kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47(6): 921-8. 1986.

Shan X, Jones DP, Hashmi M, Anders MW. Selective depletion of mitochondrial glutathione concentrations by (R,S)-3-hydroxy-4-pentenoate potentiates oxidative cell death. *Chem Res Toxicol* 6(1):75-81.1993.

Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G. Gluthatione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *PNAS* 97(10): 5101-6. 2000.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-7. 1999.

Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 6(1):71-6. 2004.

Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cel. Biol.* 15:5363-68. 1995.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189: 381-394. 1999.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzani N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-6. 1999.

Szalai G, Krischnamurthy R, Hajnoczky G. Apoptosis driven by IP-3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18:6349-6361. 1999.

Takeshi H, Kaplowitz N, Kamimura T, Tsukamoto H, Fernández-Checa JC. Hepatic mitochondrial GSH depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 16: 1423-28. 1992.

Taraschi TF, Rubin E. Biology of disease. Effect of ethanol on the chemical and structural properties of biologic membranes. *Lab. Invest.* 52(2): 120-131. 1985.

Thayer WS , Rubin E. Effects of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 254: 7717-7723. 1979.

- Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502-22. 1969.
- Tran-Thi TA, Decker K, Bauerle PA. Differential activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in rat liver macrophages. *Hepatology* 22:613-19. 1995.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS and Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101:249-258. 2000.
- Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J.* 15(8):1335-49. 2001.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191:421-427. 1980.
- Tyler D. *The mitochondrion in health and disease* VCH. Publishers Inc., New York. 557. 1992.
- Van der Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x<sub>L</sub> prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell.* 3:159-167. 1999
- Wahllander A, Soboll A, Sies H. Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett.* 97:138-140. 1975.
- Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268: 21513-18. 1993.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339-343. 1999.
- Wang XZ, Lawson J, Brewer HZ, Zinszer A, Sanjay L, Ron D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell. Biol.* 16:4273-80. 1996.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten V, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thomson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-30. 2001.
- Wenger RH, Marti HH, Schuerer-Maly CC, Kvietikova I, Bauer C, Gassmann M, Maly FE. Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease derived B-cell lines: oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-

containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Blood* 87:756-61. 1996.

Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 107:1263-73. 2001.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134(3):489-92. 2004.

Yang Q-H, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & Dev.* 17:1487-96. 2003.

Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117:942-952. 1999.

You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 277:29342-47. 2002.

Yu A, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J. Clin. Invest.* 103: 691-96. 1999.

Yuki T, Thurman RG. The swift increase in alcohol metabolism. Time course for the increase in hepatic oxygen uptake and the involvement of glycolysis. *Biochem. J.* 186: 119-126. 1980.

Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Dev.* 12: 982-995. 1998.







