



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LOS TIPOS DE RECEPTORES
ADRENERGICOS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCION DE
RADICALES LIBRES (OH*) AL SER ESTIMULADOS POR LA
EPINEFRINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

RUY GUERRA GARCIA

ASESORES: MVZ. ANTONIO DIAZ CRUZ
DRA. RAQUEL GUINZBERG PERRUSQUIA
MVZ. CUAUHEMOC NAVA CUELLAR
DR. ENRIQUE PIÑA GARZA



MEXICO, D. F.

2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

**DETERMINACIÓN DE LOS TIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS
INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES (OH[•]) AL SER
ESTIMULADOS POR LA EPINEFRINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

Por

Ruy Guerra García

ASESORES: MVZ. Antonio Díaz Cruz
Dra. Raquel Guinzberg Perrusquia
MVZ. Cuauhtémoc Nava Cuéllar
Dr. Enrique Piña Garza

México, D.F.

2002

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A mis padres: Roberto E. Guerra y Ketty García, a mi hermano: Roberto E. Guerra, a mi abuelo: Ramón Guerra y a Michaela Fiss (por su gran paciencia).

A mis asesores: Dra. Raquel Guinzberg, MVZ. Antonio Díaz, MVZ. Cuauhtémoc Nava y Dr. Enrique Piña.

Que sin ellos no se habría podido realizar este trabajo.

A los miembros del Jurado: MVZ. Maricela Ortega, MVZ. Francisco Castrejón, MVZ. Sergio Ángeles y MVZ. Alejandro Villa por sus comentarios al trabajo.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1.0 RESUMEN	1
2.0 INTRODUCCIÓN	2
2.1 Antecedentes	4
2.2 Receptores adrenérgicos	4
2.3 Clasificación de los receptores adrenérgicos	6
2.4 Catecolaminas	7
2.5 Funcionamiento bioquímico de los receptores adrenérgicos en células hepáticas	9
2.6 Respuesta celular hepática	11
3.0 MATERIAL Y MÉTODO	13
3.1 Material biológico	13
3.2 Reactivos	13
3.3 Aislamiento de hepatocitos	13
3.4 Incubación	14
3.5 Protocolo	15
4.0 RESULTADOS	18
5.0 DISCUSIÓN	20
6.0 CONCLUSIÓN	24
7.0 LITERATURA CITADA	25

RESUMEN

GUERRA GARCÍA, RUY. Determinación de los tipos de receptores adrenérgicos involucrados en la producción de radicales libres (OH^{\bullet}) al ser estimulados por la epinefrina en hepatocitos aislados de rata (bajo la dirección del MVZ. Antonio Díaz Cruz, Dra. Raquel Guinzberg Perrusquia, MVZ. Cuauhtémoc Nava Cuéllar y Dr. Enrique Piña Garza).

Está descrito en neuronas, hepatocitos y células del miocardio de rata que los receptores adrenérgicos, al ser estimulados por la epinefrina, incrementan la concentración de radicales libres, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar el tipo de receptores adrenérgicos presentes en hepatocitos de rata (α_{1B} , α_{2A} , α_{2B} , β_3) que, al ser estimulados por la epinefrina, incrementan la concentración de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) por medio de la utilización de antagonistas específicos, y bajo la técnica de Nash para la determinación de formaldehído producido a partir de la oxidación de dimetil sulfóxido (DMSO), por los radicales OH^{\bullet} . Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Producción basal $45.31 \pm 2.74 \mu\text{M}$ de formaldehído; Receptor α_{2A} , 51.56 ± 2.65 ; Receptor α_{2B} , 45.94 ± 3 ; Receptor α_{1B} , 77.81 ± 3.18 ; Receptor β_3 , 33.28 ± 1.07 . Los resultados estadísticos mostraron que el receptor α_{1B} es el responsable del aumento en la producción de radicales libres OH^{\bullet} al ser estimulado con epinefrina, por otro lado, el receptor β_3 produjo un efecto inhibitorio, lo que nos indica un posible mecanismo de regulación adrenérgica sobre la producción de radicales OH^{\bullet} , en hepatocitos aislados de rata.

INTRODUCCIÓN

No se puede negar que los procesos metabólicos establecidos por la célula para sostener la funcionalidad biológica de la fosforilación oxidativa constituyen una gran ventaja evolutiva que facilitó, incluso, la multiplicación y la diversificación de los eucariotes unicelulares y pluricelulares, pero a pesar de que el oxígeno es indispensable para la mayoría de estos organismos, también es capaz de producir daño celular debido a su alta capacidad óxido-reductiva, dando lugar a la formación de radicales libres, entidades potencialmente tóxicas para la célula, que pueden causar pérdida de su integridad, modificación en su función enzimática y alteración en su estructura genómica, por lo que la célula diseñó todo un sistema de protección contra estas especies reactivas (1).

Se llama radical libre a cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados, los cuales tienden a formar parejas para neutralizar su carga eléctrica, ya sea con otro radical libre, de tal manera que los dos se estabilizan, o sustrayendo un electrón a otro átomo o molécula, convirtiéndose cualesquiera de estos últimos en un nuevo radical, que a su vez, actuará de la misma forma, constituyendo así un conjunto de reacciones en cadena.

El oxígeno es el elemento químico que los organismos superiores consumen en mayor cantidad para lograr su funcionamiento normal, y el papel más importante que juega este elemento es intervenir en la oxidación de los combustibles celulares (carbohidratos, lípidos y proteínas) los cuales aportan equivalentes reductores a la cadena respiratoria mitocondrial, en donde el oxígeno es el último aceptor de estos. Este proceso enzimático se acopla a la actividad de la enzima ATP sintasa, a través de un flujo perfectamente regulado de protones, situación que culmina con la formación de ATP (adenosin trifosfato) a partir de ADP (adenosin difosfato), proceso conocido como fosforilación oxidativa (2).

Durante la respiración mitocondrial, tanto la NADH óxido-reductasa como el sitio ubiquinona-citocromo b reducen moléculas de oxígeno dando lugar al radical libre *anión*

superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (véase la figura 1). Este tipo de radical también es producido por los fagocitos durante el estallido respiratorio (1). Un segundo producto de la reacción es el *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2) formado a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual estabiliza al anión superóxido por medio de la siguiente reacción: $2 O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Existen dos vías por las cuales el peróxido de hidrógeno, considerado como no radical libre, puede generar al radical *hidroxilo* (OH^{\cdot}), que es el más reactivo de los producidos por el oxígeno. Una es por medio de la reacción de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$ y la otra es mediante el anión superóxido: $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O + OH^{\cdot}$ (3,4,2).

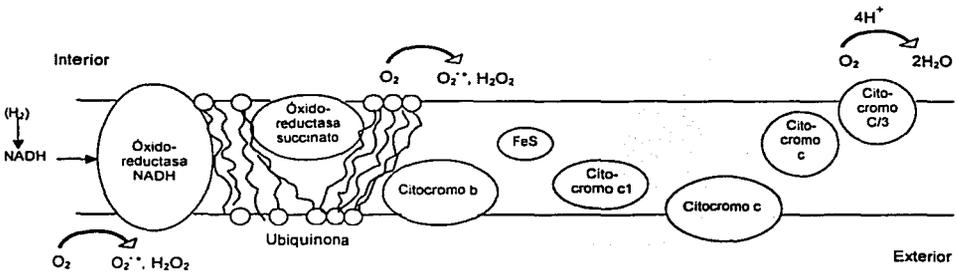


Fig. 1 Representación esquemática de la cadena respiratoria. La afinidad que presenta el complejo I (óxido reductasa NADH-ubiquinona) como también el complejo II (óxido reductasa succinato-ubiquinona) a los equivalentes reductores es mínima, por lo que algunos llegan a escapar en estos niveles, situación que no sucede con los siguientes complejos, ya que el grupo hem de los citocromos provoca que la afinidad por éstos sea mayor (2).

La vida ha coexistido con los radicales libres desde sus orígenes (alrededor de 3 500 millones de años), ya que la atmósfera en la cual se inició era de tipo reductivo. La evolución también contempló la utilización de estas especies reactivas para la realización de algunos procesos fisiológicos celulares, ejemplo de ello: Concentraciones mínimas de radicales libres

estimulan la producción de prostaglandinas por medio de la activación de la enzima fosfolipasa A₂ (véase la figura 4) (5). Los receptores de insulina son capaces de estimular la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al ser activados, además se sabe que el H₂O₂ mimetiza algunos efectos de la insulina en diferentes tejidos (5;6). También se ha visto que los radicales libres producen la apertura de canales de potasio y calcio intermembranales (5;6) y son capaces tanto de activar la *proteín cinasa C* (6) (véase más adelante Receptores α₁) como también de regular la oxidación de las catecolaminas (5) e incluso está comprobado que estimulan la expresión de genes, como es el caso de OxyR presente en la bacteria *Escherichia coli*, el cual expresa resistencia contra estrés oxidativo (7,1).

Antecedentes

En 1993 Obata y colaboradores demostraron que en células del miocardio de rata la norepinefrina y la dopamina son capaces de producir radicales libres oxhidrilo mediante la reacción de Fenton (8). Posteriormente Burke y su equipo en 1997 reportaron que en neuronas y hepatocitos de rata, la norepinefrina y la epinefrina inducen la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (9). En 1999 Castrejón y col. demostraron en hepatocitos aislados de rata, que la epinefrina incrementa la producción de radicales hidroxilo (OH[•]) por medio de la estimulación de sus receptores (10).

Receptores adrenérgicos

Los receptores de superficie externa de la membrana plasmática son proteínas especializadas capaces de acoplarse a las hormonas con gran afinidad y especificidad. Se clasifican con base en la topología que presentan en la membrana plasmática y los mecanismos moleculares que emplean en la transducción de las señales hormonales; en consecuencia, existen tres categorías (2;11):

- 1) **Proteína receptora como efector:** El efector puede ser un canal iónico o una enzima.

- 2) Proteína receptora acoplada al efector mediante una proteína G: En donde el efector puede ser un canal iónico, una enzima, o una *fosfolipasa C* específica de fosfoinosítidos.
- 3) Proteína receptora activa a un efector citosólico sin proteínas acopladoras: En donde el efector es la enzima *tirosina cinasa*.

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la segunda categoría, el efector de los receptores *alfa* (α) es la *fosfolipasa C*, y el de los receptores *beta* (β) es la enzima *adenilil ciclasa*.

Un *agonista* hormonal es aquel compuesto que se acopla al sitio activo del receptor con una mayor o menor afinidad que la molécula endógena, el cual promueve una respuesta celular, y cuya magnitud es dependiente del grado de afinidad y concentración del mismo, mientras que un antagonista es aquel compuesto sintético que bloquea la acción del agonista, o la sustancia endógena, sin producir ninguna respuesta celular por sí mismo y, de igual modo, puede tener mayor o menor afinidad por el receptor que la sustancia con la cual compete (12).

Los receptores adrenérgicos se acoplan a un grupo de proteínas específicas conocidas genéricamente como proteínas G o familia de las proteínas G, al igual que los receptores muscarínicos, colinérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos, así como aquellos para glucagon, somatostatina, adenosina, vasopresina, rodopsina, entre otros. La proteína G es activada por el receptor mediante el acoplamiento del agonista y es la responsable de la respuesta fisiológica por disociación de sus fracciones. (13).

Clasificación de los receptores adrenérgicos

Estos receptores se clasifican en dos grupos: Receptores *alfa* (α) y receptores *beta* (β), los cuales también han sido divididos en diferentes subgrupos y subtipos (14).

Receptores alfa (α):

$$\alpha \left\{ \begin{array}{l} \alpha_1 \left\{ \begin{array}{l} \alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D} \\ \alpha_{2A}, \alpha_{2B}, \alpha_{2C} \end{array} \right. \begin{array}{l} - G_{q/11} - \text{Incremento de } Ca^{2+} \\ - G_i - \text{Inhibición de adenilil ciclasa} \end{array} \end{array} \right.$$

Los receptores α_1 al ser estimulados por su agonista producen un incremento en la concentración de calcio (Ca^{2+}) citosólico, efecto mediado por la proteína $G_{q/11}$, mientras que los receptores α_2 inhiben la actividad de la enzima adenilil ciclasa a través de la activación de la proteína G_i (14). Los tipos de receptores que han sido identificados en hepatocitos de rata son: α_{1B} , α_{2A} y α_{2B} (13).

$$\beta \left\{ \begin{array}{l} \beta_1, \beta_2, \beta_3 \\ \beta_3 \end{array} \right. - G_s - \text{Estimulación de adenilil ciclasa}$$

A diferencia de los receptores α y en especial del subtipo α_2 , los receptores β producen un estímulo de la actividad de la enzima adenilil ciclasa mediante la activación de la proteína G_s (14). De esta subfamilia, sólo los receptores β_3 están presentes en hepatocitos de rata (13).

Esta clasificación está basada en la afinidad que tiene cada uno de estos receptores a un determinado antagonista, por lo tanto pueden ser bloqueados indistintamente (13).

Los antagonistas que se utilizan con el fin de bloquear los receptores adrenérgicos presentes en hepatocitos de rata se muestran en el siguiente cuadro:

Receptor	Antagonista	K _i nM
α _{1B}	Prazosina	0.56
α _{2A}	Yohimbina	0.42
α _{2B}	Rauwolscina	0.66
β ₃	Propranolol	0.38

Cuadro 1 En donde la K_i o constante de inhibición, es la concentración nanomolar del antagonista que se requiere para bloquear todos los receptores de ese tipo. A menor concentración, mayor afinidad. Se utilizaron a una concentración de 1X10⁻⁷M (13, 27, 28, 29, 30).

Catecolaminas

Los agonistas naturales de los receptores adrenérgicos son las catecolaminas: dopamina, norepinefrina (noradrenalina) y epinefrina (adrenalina). Hormonas amínicas derivadas de la tirosina y la fenilalanina. Su síntesis comienza en el axoplasma de las terminaciones nerviosas de las fibras adrenérgicas (nervios simpáticos posganglionares) por la hidroxilación de la tirosina a dopa, posteriormente ésta es descarboxilada a dopamina, la cual es transportada al interior de vesículas en donde es hidroxilada a norepinefrina, que, por último, 80% de ella es metilada a epinefrina en la médula suprarrenal (15).

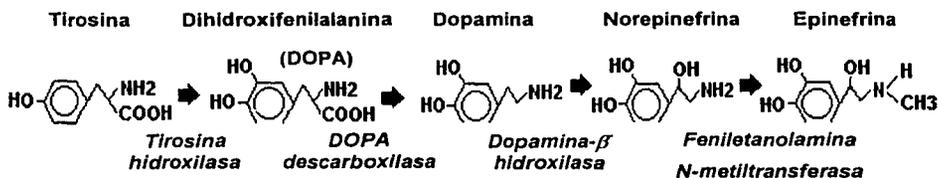


Fig. 2 Síntesis de epinefrina. La enzima tirosina hidroxilasa transfiere un grupo hidroxilo a DOPA, posteriormente la enzima DOPA descarboxilasa elimina un grupo carboxilo dando lugar a la dopamina, que es hidroxilada a norepinefrina por la enzima dopamina-β hidroxilasa y esta por último es metilada por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa a epinefrina.

La médula adrenal es considerada como un ganglio simpático, ya que el origen embrionario de las células que la conforman, llamadas cromafines, proviene de las crestas neurales, y son las encargadas de la síntesis de catecolaminas y algunos neuropéptidos (16).

Las catecolaminas son almacenadas en gránulos electrodensos situados en el interior de las vesículas secretoras de las células cromafines, estas vesículas contienen una relación de catecolaminas y ATP (relación 4:1) además de neuropéptidos, calcio y magnesio (17).

La liberación de epinefrina por la médula adrenal, se lleva a cabo en forma sináptica por la terminación de las fibras preganglionares sobre las células cromafines, las cuales, producen la liberación de las catecolaminas a la sangre por medio del neurotransmisor acetilcolina. El 80% de las catecolaminas liberadas lo conforma la epinefrina (16,17).

La epinefrina es una hormona hidrosoluble que se disuelve en el plasma y es transportada desde su origen hasta los órganos blanco, pasando a través de los capilares al líquido intersticial y, por último, a las células diana (15).

La norepinefrina y epinefrina secretadas a la sangre conservan una gran actividad durante 10 a 30 segundos, y después ésta declina hasta extinguirse en 1 a 3 minutos ya que son destruidas en el hígado principalmente por la enzima catecol-O-metiltransferasa. Su vida media es menor a un minuto (16). La norepinefrina secretada por las terminaciones nerviosas desaparece del lugar de secreción de tres maneras: 1) recaptura dentro de las propias terminaciones nerviosas adrenérgicas, con lo que se elimina entre 50 y 80% de la noradrenalina secretada; 2) difusión fuera de las terminaciones nerviosas al líquido intersticial y después a la sangre, lo que elimina la mayor parte restante, y 3) destrucción por la enzima monoamino oxidasa que se encuentra en las propias terminaciones nerviosas y por la catecol-O-metiltransferasa, presente de forma difusa en todos los tejidos (15).

Funcionamiento bioquímico de los receptores adrenérgicos en células hepáticas

Receptores α_1 : Al acoplarse la epinefrina se produce la disociación de las fracciones de la proteína *G*, lo cual activa a la fosfolipasa *c* (FLPc- β) que produce la hidrólisis del fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂), y da como resultado el inositol trifosfato (IP₃) y el diacil glicerol (DAG); el IP₃ causa un aumento en la concentración citosólica de Ca²⁺ por medio de la apertura de canales intermembranales y por la estimulación del retículo endoplásmico, y el DAG activa a la protein cinasa C (PKC), la cual contribuye a producir la respuesta celular por medio de la fosforilación de compuestos proteicos (14).

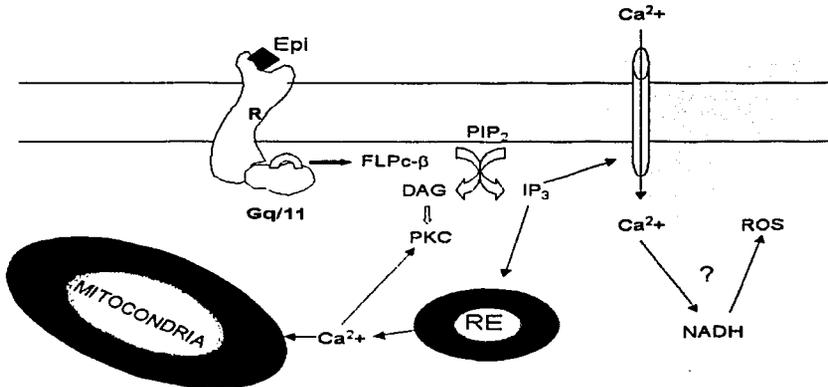


Fig. 3 Receptores α_1 adrenérgicos.
ROS (especies reactivas de oxígeno)

Receptores α_2 : Su estimulación produce la hidrólisis de fosfatidil inositol (FDLI), el cual da lugar a la fosfolipasa A_2 (FLP A_2) que causa un intercambio de H^+ y Na^+ transmembranal, como también la liberación de ácido araquidónico (13).

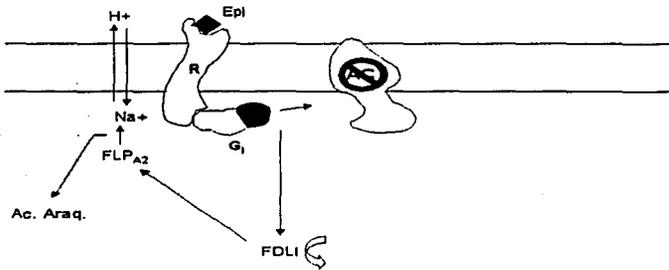


Fig. 4 Receptores α_2 adrenérgicos.

Receptores β : Al ser activados por su agonista estimulan la actividad de la enzima adenilil ciclasa (AC), enzima membranal, responsable de la formación de AMPc, el cual estimula a la protein cinasa A (PKA) que es la encargada de producir la respuesta fisiológica mediante fosforilación de proteínas específicas (13).

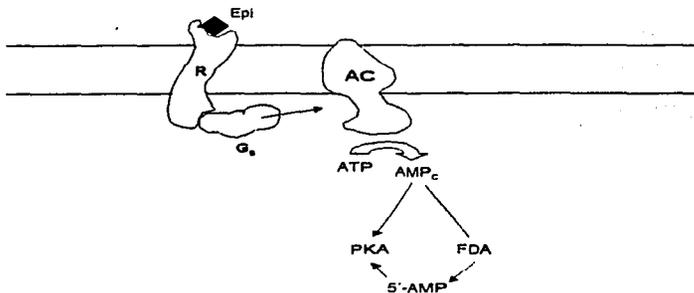


Fig. 5 Acción de la epinefrina sobre el receptor β_3 adrenérgico.

Respuesta celular hepática

El calcio intracelular, liberado a raíz de la activación de los receptores α_1 , funciona como mediador de la glucogenólisis mediante la activación de la protein cinasa C; además inhibe la secreción de insulina de las células β pancreáticas y estimula a las células α a liberar glucagon (16,17). Por otra parte, la estimulación de adenilil ciclasa producida por los receptores β , encargados de realizar el proceso en sí por medio de la activación de fosforilasas vía proteincinasa A, utilizando como mediador el AMPc, da como resultado la ruptura del glucógeno y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo, la inhibición de la enzima glucógeno sintasa y la fosforilación de la piruvato cinasa que conlleva a una estimulación de la gluconeogénesis (18). Por otra parte, la epinefrina también produce un aumento en la utilización de oxígeno al incrementar la producción de ATP (16).

Objetivo

Identificar el tipo de receptores adrenérgicos presentes en los hepatocitos de rata que al ser estimulados por la epinefrina producen radicales hidroxilo.

Hipótesis

El aumento en la concentración basal de radicales hidroxilo en los hepatocitos de rata al ser estimulados por la epinefrina, es una respuesta específica de un tipo de receptores.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar, de 150g (alrededor de 2 meses de edad), ya que la edad conlleva a la disminución de receptores adrenérgicos en el organismo (13). La alimentación fue *ad libitum*, dieta comercial "nutricubos". Al llegar al laboratorio, se mantuvieron a 21°C y con 40 a 60% de humedad relativa (mismas condiciones que las del bioterio de procedencia). Se tuvo especial cuidado atendiendo las recomendaciones de Olfert *et al.*, para el manejo de los animales utilizados (19).

Reactivos

La epinefrina y los antagonistas de los receptores adrenérgicos que se utilizaron (rauwolscina, prazosin, propranolol, yohimbina) (véase el cuadro 1) así como el dimetilsulfóxido (DMSO), ácido tricloroacético, acetil acetona, sulfato de amonio y colagenasa, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). El cloruro férrico y el ácido acético de J.T.Baker (Xalostoc, Mex.) y el E.D.T.A por Productos Químicos Monterrey S.A. (Monterrey, NL., Mex.). Todos de grado reactivo.

Aislamiento de hepatocitos

Se realizaron a las 11:00 a.m. Con el fin de que el procedimiento fuera indoloro, los animales fueron anestesiados con éter, el cual inhalaban durante toda la intervención, que no duró más de 6 minutos, ya que el éter produce paro respiratorio. Se utilizó el método de Berry y Friend (20) con modificación de Guinzberg (21) para obtener los hepatocitos aislados, que consiste en canular la vena porta lo más cercano al hilio hepático para perfundir el hígado con una solución de Ringer-Krebs-bicarbonato (NaCl 120mM, KCl 5.7mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 12mM) (21) con colagenasa relación 1:1 p/v (20mg en 20ml) a pH de 7.4 y a 37°C, lo cual separa

todas las células de la cápsula de Glisson y demás tejidos conjuntivos, lo que permite utilizar todo el órgano. El experimento sólo se realizó con una viabilidad celular mayor o igual a 90%, la cual se evaluó por medio de la prueba de exclusión de azul de tripan.

Incubación

Se bloquearon todos los receptores agregando sus antagonistas específicos excepto en uno de ellos, el cual fue el receptor por estudiar utilizando epinefrina a una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ (10); esto se realizó con cada uno de los receptores presentes en hepatocitos de rata.

Mediante pruebas apareadas: tiempo 0 y 5 minutos de incubación. Se utilizaron $500 \mu\text{l}$ de hepatocitos (5×10^5 células) mantenidos en solución Ringer-Krebs-bicarbonato, en presencia de calcio (1.2mM) a 37°C en agitación continua, más 0.1mM de cloruro férrico para obtener los radicales OH^{\bullet} por medio de la reacción de Fenton (22), más 0.2mM de EDTA como catalizador de la reacción y 33mM de DMSO (Dimetil sulfóxido) el cual es oxidado a formaldehído por los radicales hidroxilo generados (23). Para detener la reacción se agregó $500 \mu\text{l}$ de ácido tricloroacético al 20% y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se mezcló con el medio de reacción de Hantzsch (acetato de amonio 2M, ácido acético 0.05M, acetil acetona 0.02M) que colorea al formaldehído; se incubó a 60°C por 10 minutos, y se realizó la lectura mediante espectrofotometría a 415nm; esto debido a que la concentración de formaldehído es directamente proporcional a la cantidad de hidroxilos producidos, con lo cual se calcula el coeficiente de extinción para el reactivo de color ($\text{absorbancia} / 8 \times 3000 = \text{formaldehído} [1 \times 10^{-6} \text{M} / 5 \times 10^5 \text{ células}]$), técnica de Nash (24,25).

Protocolo

Se realizaron diez experimentos con diferentes ratas. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el modelo estadístico *t* de *student* con un número de observaciones de cuatro.

En la figura 2 se muestra el antagonista específico para cada receptor estudiado. Los controles C, D y E son los testigos, los cuales nos sirvieron para evaluar el comportamiento de cada receptor en cuanto a la producción de radicales hidroxilo.

Una vez agregados los hepatocitos a los tratamientos que se enlistan a continuación y en el cuadro 2, se inició el tiempo de incubación; a los tratamientos tiempo cero minutos se les agregó el ácido tricloroacético en el medio de incubación antes de poner los hepatocitos, y a los tratamientos tiempo cinco minutos se les agregó el ácido tricloroacético para detener la reacción a los cinco minutos de haber puesto los hepatocitos. Es necesario agitar los tratamientos después de agrega el ácido tricloroacético para detener la reacción, en el caso del tiempo cero se agitaron enseguida de haber puesto los hepatocitos.

Control A: Epinefrina sin hepatocitos.

Con el cual se restó la absorbancia de la epinefrina a 415 nm a nuestros tubos experimentales.

Control B: Epinefrina sin hepatocitos más todos los antagonistas (véase la figura 2).

Con el cual se restó la absorbancia de los antagonistas de igual modo que en el control A.

Control C: Hepatocitos sin epinefrina.

Producción basal de radicales OH^{\bullet} en hepatocitos no estimulados exógenamente.

Control D: Hepatocitos más epinefrina.

Aumento de la producción basal de radicales OH^{\bullet} (Control positivo), estimulación de cada tipo de receptores adrenérgicos existentes en los hepatocitos.

Control E: Hepatocitos más epinefrina más todos los antagonistas (véase la figura 2).

Inhibición de la respuesta en todos los receptores (Control negativo).

Experimental α_{1B} : Hepatocitos, Rauwolscina, propranolol, yohimbina más epinefrina.

En este tratamiento no se utilizó prazosina (véase la figura 2), de modo que el receptor α_{1B} fue el único activo.

Experimental α_{2A} : Hepatocitos, Rauwolscina, prazosin, propranolol más epinefrina.

En este otro no se utilizó yohimbina, de modo que el receptor α_{2A} fue el único activo.

Experimental α_{2B} : Hepatocitos, Prazosin, propranolol, yohimbina más epinefrina.

Éste no tuvo rauwolscina, por lo que sólo funcionó el receptor α_{2B} .

Experimental β_3 : Hepatocitos, Rauwolscina, prazosin, yohimbina más epinefrina. Y por último éste no tuvo propranolol, receptor β_3 activo únicamente.

Cuadro 2 Diseño experimental

Tubos	Krebs	FeCl ₂	DMSO	Hepatocitos	Epinefrina	Antagonistas
Blanco	970 µl	10 µl	20 µl			
Control A	960 µl	10 µl	20 µl		10 µl	
Control B	920 µl	10 µl	20 µl		10 µl	Raw. 10 µl Pra. 10 µl Prop. 10 µl Yoh. 10 µl
Control C	470 µl	10 µl	20 µl	500 µl		
Control D	460 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	
Control E	420 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	Raw. 10 µl Pra. 10 µl Prop. 10 µl Yoh. 10 µl
Exp. α _{1B}	430 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	Raw. 10 µl Prop. 10 µl Yoh. 10 µl
Exp. α _{2A}	430 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	Raw. 10 µl Pra. 10 µl Prop. 10 µl
Exp. α _{2B}	430 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	Pra. 10 µl Prop. 10 µl Yoh. 10 µl
Exp. β ₃	430 µl	10 µl	20 µl	500 µl	10 µl	Raw. 10 µl Pra. 10 µl Yoh. 10 µl

Concentración utilizada de epinefrina: $1 \times 10^{-6} \text{ M}$

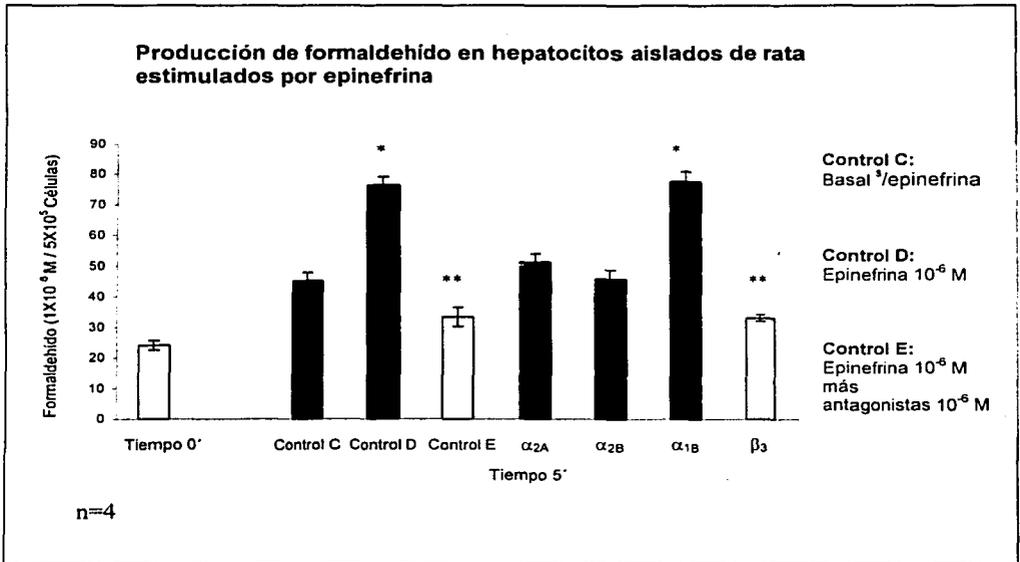
Concentración utilizada de cada antagonista: $1 \times 10^{-7} \text{ M}$

Raw. (rauwolscina), Pra. (prazosin), Prop. (propranolol), Yoh. (yohimbina)

RESULTADOS

En la gráfica 1 se muestran los datos obtenidos sobre la producción de formaldehído en hepatocitos aislados de rata estimulados con epinefrina en el tiempo cero y a los cinco minutos de incubación. La concentración de formaldehído registrada al momento en que se inició la incubación (tiempo cero) fue de 22.57 ± 1.59 μ molas de formaldehído, y la producción registrada para las diferentes condiciones experimentales a los cinco minutos fue: Control C, 45.31 ± 2.74 ; Control D, 76.50 ± 2.67 ; Control E, 33.45 ± 3.11 ; Receptor α_{2A} , 51.56 ± 2.65 ; Receptor α_{2B} , 45.94 ± 3 ; Receptor α_{1B} , 77.81 ± 3.18 ; Receptor β_3 , 33.28 ± 1.07 . Se observó una estimulación estadísticamente significativa ($P < 0.01$) de la epinefrina (control D) y el receptor α_{1B} con respecto al control C (Basal). Asimismo, se encontró un efecto inhibitorio estadísticamente significativo ($P < 0.05$) para el receptor β_3 con respecto al control C. Por otro lado, los tratamientos α_{2A} y α_{2B} no mostraron diferencia estadística significativa con respecto al control C.

Gráfica 1



* Significancia estadística con respecto al control C ($P < 0.01$).

** Significancia estadística con respecto al control C ($P < 0.05$).

Las columnas que siguen del control E indican el receptor adrenérgico que no fue bloqueado.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN

Los valores de formaldehído obtenidos con el tratamiento designado como tiempo cero indican que los animales iniciaron el experimento con una cierta cantidad de radicales libres. Durante el periodo de incubación (5 minutos) se registró, de manera general, un aumento basal en la producción de radicales OH^\cdot , con respecto al tiempo cero; esta situación nos muestra una condición metabólicamente activa de la célula durante los cinco minutos de incubación, cabe mencionar que esta misma situación también fue reportada por Obata y col. (8) en células del miocardio de rata; así como por Castrejón y col. (10), en hepatocitos de rata.

Los resultados estadísticos obtenidos al comparar la concentración de μmol de formaldehído producido a los cinco minutos de incubación, tanto por el receptor α_{2A} (51.56 ± 2.65) como por el receptor α_{2B} (45.94 ± 3), muestran que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre estos tratamientos, con respecto al control C; este dato nos indica que los receptores adrenérgicos α_{2A} y α_{2B} no están involucrados en el aumento de la concentración de radicales libres hidroxilo en hepatocitos de rata como respuesta a la epinefrina.

La respuesta registrada en el control D a los cinco minutos es similar a lo reportado por Obata y col. (8), Burke y col. (9), y por Castrejón y col. (10), en donde se menciona que la epinefrina es capaz de producir un aumento en la producción basal de radicales libres en miocardio, neuronas y hepatocitos de rata respectivamente. El único receptor adrenérgico localizado en hepatocitos de rata que no presentó diferencia estadística significativa con respecto a este control a los cinco minutos de incubación fue el receptor α_{1B} , efecto que en la actualidad, no ha sido reportado en la literatura.

En cuanto a la respuesta del receptor adrenérgico β_3 y del control E se observó un efecto inhibitorio sobre la producción de radicales hidroxilo en hepatocitos aislados de rata; en experimentos realizados por Heidemarie y col. (26) en adipocitos de humano, se muestra que las fracciones " β " y " γ " de la proteína G de los receptores β inhiben a la enzima NADPH oxidasa,

la cual utiliza NADPH como sustrato para producir H_2O_2 , condición que podría estar presentándose también en hepatocitos y que esa sería la posible explicación para el efecto observado en este trabajo.

Los receptores adrenérgicos de hígado de rata presentan gran porcentaje de homología farmacológica y secuencial con respecto a sus correspondientes en hígado humano (31). Los receptores: α_{2A} y α_{2B} de las dos especies son 90% homólogos, para los receptores β_3 se reporta un 79% de homología, en relación a los receptores α_{1B} de ambas especies, existe un 79% de homología (13). En los siguientes cuadros, obtenidos de la base de datos SWISS-PROT se muestra la similitud genómica entre los receptores α_{1B} de rata y de humano (32;33):

Cuadro 3 Receptor α_{1B} de Rata**Sequence information**

Length: 515 AA

Molecular weight: 56585 Da

CRC64: AF0C3759F80C3135 [This is a checksum on the sequence]

10	20	30	40	50	60
MNPDLDTGHN	TSAPAHWGEL	KDDNFTGPNQ	TSSNSTLPQL	DVTRAISVGL	VLGAFILFAI
70	80	90	100	110	120
VGNILVILSV	ACNRHLRTP	NYFIVNLAIA	DLLLSFTVLP	FSATLEVLGY	WVLGRIFCDI
130	140	150	160	170	180
WAADVLCCT	ASILSLCAIS	IDRYIGVRY	LQYPTLVTRR	KAILALLSVW	VLSTVISIGP
190	200	210	220	230	240
LLGWKEPAPN	DDKECGVTEE	PFYALFSSLG	SFYIPLAVIL	VMYCRVYIVA	KRTTKNLEAG
250	260	270	280	290	300
VMKEMSNSKE	LTLRIHSKNF	HEDTLSSTKA	KGHNPRSSIA	VKLFKFSREK	KAAKTLGIIV
310	320	330	340	350	360
GMFILCWLFF	FIALPLGSLF	STLKPPDAVF	KVFWLGYFN	SCLNPIIYPC	SSKEFKRAFM
370	380	390	400	410	420
RILGCQCRGG	RRRRRRRLG	ACAYTYREW	RGGSLERSQS	RKDSLDDSGS	CMSGTQRTLP
430	440	450	460	470	480
SASPSPGYLG	RGTQPPVELC	AFPEWKPGAL	LSLPEPPGRR	GRLDSGFLFT	FKLLGDPESE
490	500	510			
GTEGDTSNNG	CDTTDLANG	QPGFKSNMPL	APGHF		

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4 Receptor α_{1B} de HumanoSequence information

Length: 519 AA

Molecular weight: 56778 Da

CRC64: C4727A147D0A1780 [This is a checksum on the sequence]

10	20	30	40	50	60
MNPDLDTGHN	TSAPAHWGEL	KNANFTGPNQ	TSSNSTLPQL	DITRAISVGL	VLGAFILFAI
70	80	90	100	110	120
VGNILVILSV	ACNRHLRTP	NYFIVNLAMA	DLLSFTVLP	FSAALEVLGY	WVLGRIFCDI
130	140	150	160	170	180
WAAVDVLCCT	ASILSLCAIS	IDRYIGVRYS	LQYPTLVTRR	KAILALLSW	VLSTVISIGP
190	200	210	220	230	240
LLGWKEPAPN	DDKECGVTEE	PFYALFSSLG	SFYIPLAVIL	VMYCRVYIVA	KRTTKNLEAG
250	260	270	280	290	300
VMKEMSNSKE	LTLRIHSKNF	HEDTLSSTKA	KGHNPRSSIA	VKLFKFSREK	KAAKTLGIVV
310	320	330	340	350	360
GMFILCWLFP	FIALPLGSLF	STLKPPDAVF	KVVFWLGYFN	SCLNPIIYPC	SSKEFKRAFV
370	380	390	400	410	420
RILGCQCRGR	RRRRRRRRL	GGCAYTYRPW	TRGGSLERSQ	SRKDSLDDSG	SCLSGSQRTL
430	440	450	460	470	480
PSASPSPGYL	GRGAPPVEL	CAFPEWKAPG	ALLSLPAPEP	PGRRRGRHDSG	PLFTFKLLTE
490	500	510			
PESPGTDGGA	SNGGCEAAAD	VANGQPGFKS	NMPLAPGQF		

CONCLUSIÓN

Por los datos obtenidos en este trabajo se concluye que:

1. El receptor adrenérgico causante del incremento en la concentración basal de radicales libres hidroxilo en hepatocitos aislados de rata, al ser estimulado con epinefrina, es el receptor α_{1B} .
2. El receptor β_3 mostró un efecto opuesto al del receptor α_{1B} , por lo que es probable que exista un mecanismo regulatorio, cuyo objetivo es el de proteger a la célula del daño ocasionado por la presencia de radicales libres generados por la estimulación del receptor α_{1B} .
3. Se ratifica el efecto de la epinefrina con respecto a la estimulación en la producción de radicales OH^\cdot , observado en otros tejidos.

Literatura citada

1. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free rad. Biol. & Med.* 2000;28(10):1456-1462.
2. Laguna J, Piña E. *Bioquímica de Laguna*. 5a. ed. México: Manual moderno, 2002.
3. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell signal.* 1999;11(2):77-85.
4. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?. *Free Rad. Biol. & Med.* 2000;29(5):416-424.
5. Scandalios JG editor. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York: Cold spring harbor laboratory press., 1997.
6. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 2002;82(1):47-95.
7. Tao K. In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* 1999;457:90-92.
8. Obata T, Hosokawa H, Yamanaka Y. *In vivo* monitoring of norepinephrine and hydroxyl free radical generation by ferrous iron in the myocardium with a microdialysis technique. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993;106(3):635-638.
9. Burke WJ, Kristal BS, Yu BP, Li SW, Lin TS. : Norepinephrine transmitter metabolite generates free radicals and activates mitochondrial permeability transition: a mechanism for DOPEGAL-induced apoptosis. *Brain research* 1998;787:328-332.
10. Castrejón SM, Guinzberg PR, Villalobos-Molina R, Piña GE. Ethanol and epinephrine stimulate hydroxyl radical production in isolated hepatocytes: evidence of independent mechanisms. *Life science*. En prensa.
11. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 2nd ed. New York: Garland Publishing Inc.,1994.

12. Johnson RD, Minneman KP. Characterization of α_1 adrenoceptors which increase cyclic AMP accumulation in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharm.* 1986;129:293-304.
13. Stephen JP editor. *Handbook of receptors and channels*. Boca Raton: CRC Press. Inc., 1994.
14. Zhong H, Minneman KP. α_1 Adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 1999;375:261-276.
15. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. 10nd ed. México: Mc Graw-Hill, 2001.
16. Ganong WF. *Review of medical physiology*. 17th. ed. San Francisco: Appleton and lange, 1995.
17. Greenspan FS, Baxter JD. *Endocrinología básica y clínica*. 3nd ed. México: Manual moderno, 1995.
18. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, Steiner R. *Textbook of physiology*. 21nd. ed. V.II Philadelphia: Saunders, 1989.
19. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA editores. *Manual sobre el cuidado y uso de los animals de experimentación*. Vol. 1. 2da. ed. Canada: Consejo canadiense de protección de los animales, 1998.
20. Berry MN, Friend DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. cell Biol.* 1969;43:506-512.
21. Guinzberg PR, Laguna I, Zentella A, Guzman R, Piña E. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J.* 1987;245:371-374.
22. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxyegen in the Fenton reaction. *Free Rad. Biol. & Med.* 1997; 22(5):885-888.

23. Klein SM, Cohen G, Cederbaum AI. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry* 1981;20:6006-6012.
24. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction. *Biochem.* 1953;55:416-421.
25. Hallinan T, Gor J, Rice-Evans CA, Stanley R, O'reilly R, Brown D. Lipid peroxidation in electroporated hepatocytes occurs much more readily than does hydroxyl-radical formation. *Biochem J.* 1991;277:767-771.
26. Heidmarie I, Krieger-Brauer, Medda PK, Sattel B, Kather H. Inhibitory effect of isoproterenol on NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by $\beta\gamma$ -subunits derived from G_s. *The journal of biological chemistry.* 2000;275(4) jan.28:2486-2490.
27. Goodman A, Rall T, Nies A, Taylor P. *The pharmacological basis of therapeutics.* 18th ed. New York: Pergamon Press, 1990.
28. Keibian JW editor. *The RBI Handbook of receptor classification.* Natick: Research Biochemicals International, 1994.
29. Uhlén S, Dambrova M, Näsman J, Schiöth HB, Gu Y, Wikber-Matsson A, Wikber JES. [³H]RS79948-197 binding to human, rat, guinea pig and pig α_{2A} -, α_{2B} -, γ α_{2C} - adrenoceptors. Comparison with MD912, RX821002, rauwolscine and yohimbine. *European Journal of Pharmacology* 1998;343:93-101.
30. Zheng W, Lei L, Lalchandani S, Sun G, Feller DR, Miller DD. Yohimbine dimers exhibiting binding selectivities for human α_{2A} - versus α_{2B} - adrenergic receptors. *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 2000;10:627-630.
31. Schwinn DA, Johnston GI, Page SO, Mosley MJ, Wilson KH, Worman NP, Campbell S, Fidock MD, Furness LM, Parry-Smith DJ. Cloning and pharmacological characterization

of human alpha-1 adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparison with other species homologues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995;272(1):134-142.

32. NiceProt View fo SWISS-PROT. P15823 [serial online] 1998 Jul-Apr [cited 2002 Jun 1] ; 1 (1): [1 screens] . Available from: URL:

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?P15823>.

33. NiceProt View fo SWISS-PROT. P35368 [serial online] 2001 Oct-Jun [cited 2002 June 1] ; 1 (1): [1 screens] . Available from: URL:

<http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P35368>.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN