

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Identificación de un sistema de membrana plasmática de células hepáticas regulado por receptores adrenérgicos que generan especies reactivas de oxígeno

T E S I S

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

RUY GUERRA GARCÍA

TUTOR: Dr. Enrique Piña Tavera

**Comité tutorial: Dr. Francisco J. Trigo Tavera
Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía**

MÉXICO, D.F.

2005

m347772



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Identificación de un sistema de membrana plasmática de células hepáticas regulado por receptores adrenérgicos que genera especies reactivas de oxígeno

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de
Maestro en Ciencias
por
Ruy Guerra García

TUTOR: Dr. Enrique Piña Garza

COMITÉ TUTORAL: Dr. Francisco J. Trigo Tavera
Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía

México, D.F.

2005

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A mis padres, a mi hermano y a mi abuelo Ramón Guerra.

A mi tutor y a mi comité tutorial.

Sin ellos no se habría podido realizar este trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y Dr.

Alejandro Villa Godoy por sus comentarios al trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1.0 RESUMEN / SUMMARY	1
<hr/>	
2.0 INTRODUCCIÓN	
<hr/>	
2.1 Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO)	2
2.2 Principales enzimas y sitios donde se generan ERO en células hepáticas de mamíferos	12
2.3 Señalización celular por medio de ERO	19
2.4 Receptores adrenérgicos y su acción en el hígado	22
3.0 MATERIAL Y MÉTODO	
<hr/>	
3.1 Material biológico	26
3.3 Obtención de membranas de células hepáticas	27
3.4 Procedimientos experimentales	28
4.0 RESULTADOS	30
<hr/>	
5.0 DISCUSIÓN	40
<hr/>	
7.0 LITERATURA CITADA	45
<hr/>	

RESUMEN

GUERRA GARCÍA, RUY. Identificación de un sistema de membrana plasmática de células hepáticas regulado por receptores adrenérgicos que genera especies reactivas de oxígeno.

Estudios previos muestran que el receptor adrenérgico α_{1B} al ser estimulado por su agonista, la epinefrina, desencadena un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células hepáticas, efecto que se ve inhibido por la activación del receptor β_3 . El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia en células del hígado de una enzima, NADPH oxidasa, regulada por receptores adrenérgicos. En consecuencia, se efectuó el aislamiento de membranas plasmáticas de estas células y se logró la caracterización de un sistema membranal generador de H_2O_2 , el cual utiliza como sustrato al NADPH (K_m de $44\mu M$) y no al NADH, no requiere de ATP, uno de los principales productos de la reacción es el $O_2^{\bullet-}$ y se ve inhibido por DPI $1\mu M$ (1025 nmolas de H_2O_2 sin DPI y 475 nmolas de H_2O_2/mg de proteína con DPI). Mediante la utilización de antagonistas específicos para cada receptor adrenérgico presente en células aisladas se demostró que el aumento en la concentración de ERO por el receptor adrenérgico α_{1B} se debe a la activación de una enzima NADPH oxidasa (394.7 ± 40.95 nmolas de H_2O_2/mg de proteína) mientras que la activación del receptor β_3 la inhibe ($\alpha_{1B} + \beta_3$ 176.25 ± 16.91 nmolas de H_2O_2/mg de proteína). Es posible que el H_2O_2 juegue un papel importante en la respuesta adrenérgica en células hepáticas.

SUMMARY

GUERRA GARCÍA, RUY. Identification of a hepatic cell plasmatic membrane system regulated by adrenergic receptors generating reactive oxygen species (under the guidance of Professors Enrique Piña Garza, Francisco J. Trigo Tavera, and Raquel Guinzberg Perrusquía.)

Previous studies had shown that the α_{1B} adrenergic receptor, when stimulated by its agonist, epinephrine, unchains an increase of Reactive Oxygen Species (ROS) concentration in hepatic cells, effect that is inhibited by the activation of the β_3 receptor. The purpose of this study was to demonstrate the presence in liver cells of an enzyme, NADPH-oxidase, regulated by adrenergic receptors. Consequently, plasmatic membrane of these cells was isolated, and characterization of a membrane system generating H_2O_2 , which as substrate utilizes NADPH (K_m of 44 μM) instead of NADH, was achieved. This membrane system does not require ATP, and one of the main byproducts of this reaction is $O_2^{\bullet-}$, which is inhibited by DPI 1 μM (1025 nmolas de H_2O_2 without DPI, and 475 nmolas of H_2O_2 /mg of protein with DPI). Through the utilization of specific antagonists for each adrenergic receptor present in the isolated cells, it was demonstrated that the ROS increase in concentration produced by the α_{1B} adrenergic receptor, is due to the activation of an enzyme, NADPH-oxidase (394.7 ± 40.95 nmolas of H_2O_2 /mg protein), enzyme that is inhibited by the activation of the β_3 receptor ($\alpha_{1B} + \beta_3$ 176.25 \pm 16.91 nmolas of H_2O_2 /mg protein.)

INTRODUCCIÓN

QUÍMICA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Los radicales libres son cualquier entidad química capaz de existir por sí misma y que presenta uno o más electrones impares. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son entidades químicas en las que el oxígeno se encuentra en un estado energético mayor que la de su estado basal. La mayoría de las ERO son moléculas de oxígeno que tienen uno o más electrones impares (1). Para mayor comprensión de estos términos es necesario mencionar que es la masa y número atómico de un átomo, los cuatro números cuánticos provenientes de la aplicación de la teoría cuántica de Planck por el físico danés Niels Bohr en 1914, como también el principio de aufbau, la regla de exclusión de Pauli y la regla de Hund.

La unidad estructural de la materia son los átomos, los cuales están constituidos por un núcleo cargado positivamente que contiene protones y neutrones rodeado de una o más cargas negativas llamadas electrones. El número atómico de cualquier elemento es la cantidad de protones que tiene en su núcleo y la masa atómica es el número de protones más neutrones. En un átomo la carga total se anula o neutraliza porque el número de electrones es igual al de protones (2, 3).

En 1924, el físico francés Louis de Broglie propuso que toda partícula en movimiento lleva asociada una onda de naturaleza semejante a la de la luz. Para

describir el movimiento de las partículas de masas grandes el carácter ondulatorio es de poca importancia práctica puesto que la longitud de onda asociada es muy pequeña en comparación con las dimensiones de la partícula. Sin embargo, para describir el movimiento de las partículas de masa muy pequeña, como los electrones, la longitud de onda es comparable con las dimensiones del átomo en el cual se encuentra el electrón, por lo tanto no pueden ser localizadas con precisión estas cargas negativas, pero sí puede calcularse la probabilidad de encontrar al electrón en una posición (orbital) determinada dentro del átomo por medio de la ecuación de Schrödinger (ver más adelante número cuántico de momento angular (2)).

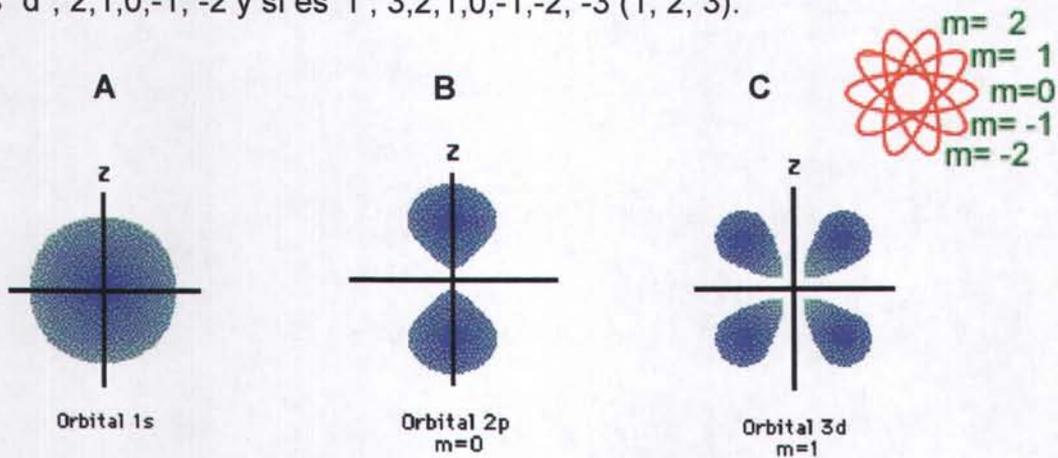
Los números cuánticos nos permiten tener una completa descripción de los electrones en los átomos, es decir, su posible posición y momento lineal (cantidad de movimiento) (1, 2, 3).

El número cuántico principal (n) define el nivel de energía que ocupa el electrón, en donde el nivel con menor energía se denota con la letra K ($n = 1$), este nivel sólo puede retener a 2 electrones, el siguiente nivel es el L ($n = 2$), que puede retener 8 electrones, luego el M ($n = 3$), que retiene hasta 18 electrones y por último el N ($n = 4$), retiene hasta 32 electrones y es el más alejado del núcleo y con mayor energía (1, 2, 3). El principio de aufbau del alemán *aufbau*, construir, indica que los electrones cubren al núcleo empezando primero por los orbitales de menor energía es decir que van de K hacia N, y si quedan disponibles dos o más orbitales de igual energía, se coloca un electrón

en cada uno con los espines paralelos dejando semilenos los orbitales (regla de Hund) (1, 2, 3).

El número cuántico de momento angular (l) indica la forma de los orbitales. Los valores de l dependen del valor del número cuántico principal (n), l tiene valores desde 0 a $n - 1$. Cuando $l = 0$ los orbitales son "s"; cuando $l = 1$, son orbitales "p"; si $l = 2$, orbitales "d"; y cuando $l = 3$, orbitales "f" (1, 2, 3).

El número cuántico magnético (m_l) describe la orientación del orbital en el espacio. El valor de m depende del número cuántico de momento angular, l . Si el orbital es de tipo "s", su número cuántico magnético es 0; si es "p", es 1, 0, -1; si es "d", 2, 1, 0, -1, -2 y si es "f", 3, 2, 1, 0, -1, -2, -3 (1, 2, 3).

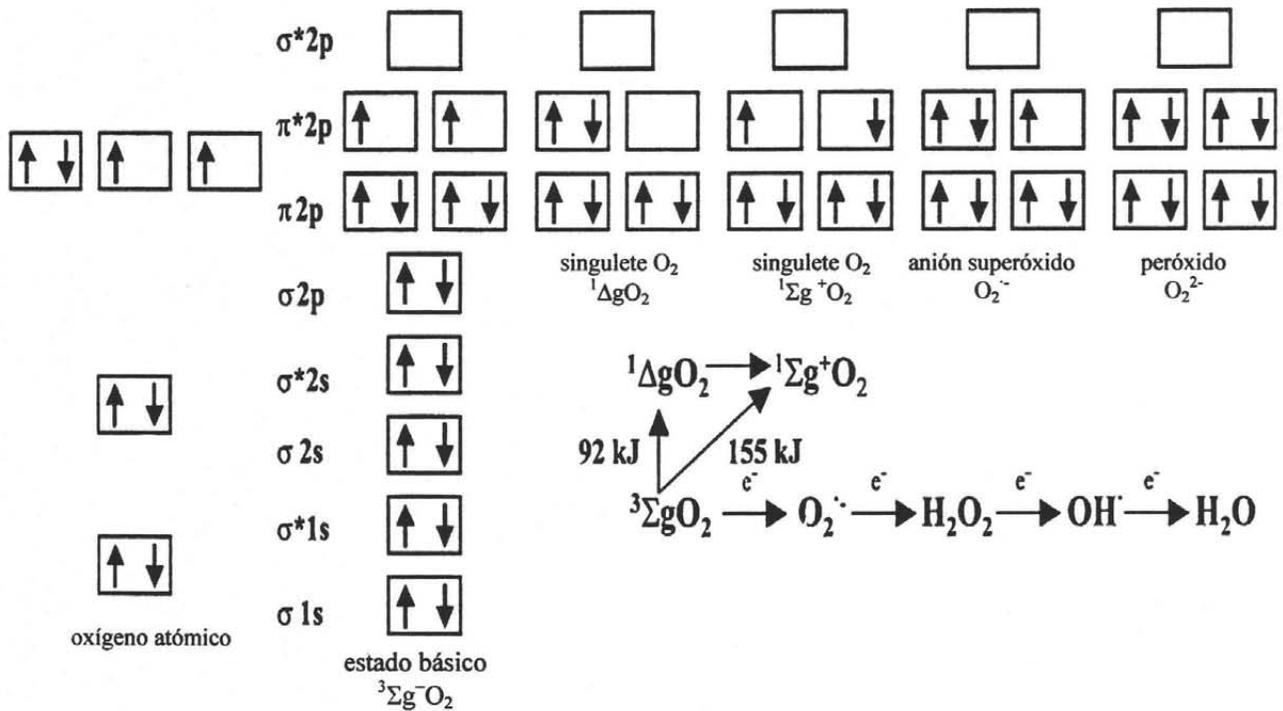


Esquema 1. Orbitales atómicos. A) Orbital de forma "s", número cuántico principal K. B) Orbital de forma "p", número cuántico principal L, número cuántico magnético = 0. C) Orbital de forma "d", número cuántico principal M, número cuántico magnético = 1.

Por último, el número cuántico de espín electromagnético (m_s) que marca el sentido del giro que dan los electrones sobre su orbital y puede ser en sentido

o contra sentido de las manecillas del reloj. Los valores de m_s son $-\frac{1}{2}$ y $+\frac{1}{2}$. La regla de exclusión de Pauli indica que en cada orbital sólo pueden alojarse dos electrones y éstos deben de ser de espín opuesto (1, 2, 3).

Con la información anterior podemos entonces analizar el esquema 2 donde se representa la configuración electrónica de las diferentes variedades de ERO.



Esquema 2. El oxígeno se encuentra en la naturaleza en forma diatómica unidos por enlaces covalentes, lo cual le confiere estabilidad (1). Las letras griegas σ y π se refieren a los orbitales de unión molecular, que son de baja energía y más estables que los orbitales atómicos. Los orbitales de antiunión molecular σ^* y π^* son de alta energía y menos estables que los anteriores. Los orbitales moleculares siguen las mismas reglas que los orbitales atómicos (1).

Oxígeno básico ($^3\Sigma_g^-O_2$)

Este es un gas mutagénico, tóxico y altamente inflamable que utilizan las células aerobias para obtener energía a partir de los alimentos (1). Puede difundir por cualquier membrana celular y su concentración citoplasmática es alrededor de $10^{-5}M$ (4). Su mérito y toxicidad se basan en que tiene dos electrones impares en el orbital π^*2p que le permite aceptar electrones de dos en dos (1, 5, 6).

Singlete de oxígeno ($^1\Delta_gO_2$ y $^1\Sigma_g^+O_2$)

Generalmente son formados en laboratorio al excitar moléculas por medio de radiación luminosa a determinada longitud de onda, la energía obtenida es transferida a una molécula de O_2 adyacente (1). El estado $^1\Delta_gO_2$ presenta 92 kJ por encima del estado básico del oxígeno y el singlete $^1\Sigma_g^+O_2$ es aún más reactivo con 155 kJ más que el estado básico (1, 4) (esquema 2), pero decae rápidamente en $^1\Delta_gO_2$ por lo que no es de interés en los sistemas biológicos (1).

En enfermedades que involucran a las porfirias, como defectos en la biosíntesis del grupo hemo, la radiación solar da lugar a la formación del singlete $^1\Delta_gO_2$, el cual no es un radical libre ya que no presenta electrones impares (esquema 2), pero sí es una ERO y tiene mayor capacidad de oxidación que el estado básico del oxígeno (1). Su concentración en el citoplasma es alrededor de $10^{-15}M$ (4).

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Se forma cuando el oxígeno básico acepta un electrón en el orbital π^*2p , de manera que es menos reactivo que su antecesor ya que sólo tiene un electrón impar (1). Debido a su carga no puede cruzar membranas plasmáticas y su vida media es de milisegundos (1). Su concentración en el citoplasma es alrededor de $10^{-11}M$ (4). Es un radical libre y es una ERO.

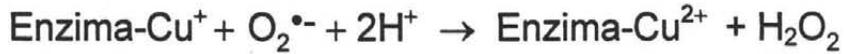
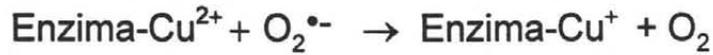
Peróxido (O_2^{2-})

No es un radical libre ya que se forma cuando el anión superóxido acepta al electrón faltante en el orbital π^*2p (1, 6), pero sí es una ERO. En los sistemas biológicos sólo se presenta la forma protonada que es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (1) (esquema 2). Ya que es una molécula de tamaño pequeño, sin carga y soluble en agua, puede difundirse con facilidad dentro y entre las células (1). Su concentración en los sistemas biológicos es mayor a $10^{-11}M$ (4).

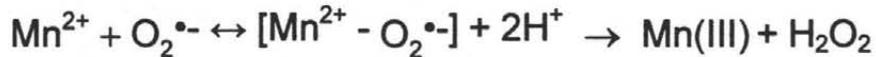
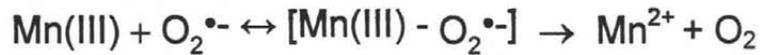
Reacciones por las cuales se obtiene peróxido de hidrógeno en los sistemas biológicos:

En 1969 McCord y Fridovich descubrieron las enzimas superóxido dismutasas (CuZnSOD y MnSOD) en eritrocitos (7). Estas enzimas están presentes en la mayoría de células eucariontes (8). La CuZnSOD se localizan principalmente en el citoplasma, lisosomas, núcleo, en el espacio intermembranal de la mitocondria y en el espacio extracelular (1, 7). La CuZnSOD está formada por dos subunidades, cada una con una molécula de cobre que sirve para acelerar la dismutación del anión superóxido ya sea oxidándose o reduciéndose en un

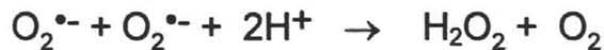
rango de pH de 5.3 a 9.5 (1). El zinc únicamente le confiere estabilidad a la enzima (1). La reacción se da de la siguiente manera (1, 9):



En la mitocondria también se encuentra una superóxido dismutasa, formada por cuatro subunidades, dependiente de manganeso (MnSOD) (1, 9). En hígado de rata representa sólo el 10% de la actividad de las superóxido dismutasas (1). MnSOD cataliza la misma reacción que la CuZnSOD pero de la siguiente forma (1):

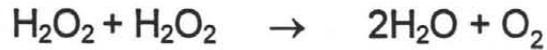


También el peróxido de hidrógeno se puede producir por una reacción espontánea (dismutación), en donde no requiere de enzimas.



Descomposición del peróxido de hidrógeno por reacción enzimática:

La catalasa es una enzima que consta de cuatro subunidades, cada una con un grupo férrico hemo unido a su sitio catalítico (1, 8, 9). Esta enzima antioxidante se encuentra en el citoplasma y peroxisomas de todas las células de los tejidos corporales, pero el hígado es el órgano que contiene la mayor cantidad de catalasa (1). La reacción que cataliza es la siguiente (1, 9):

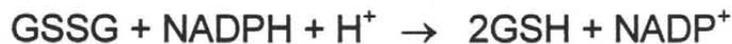


Por otra parte, la familia de enzimas glutatión peroxidasa (GPX) formadas por cuatro subunidades, cada una con un átomo de selenio (Se) en forma de selenocisteína en su sitio catalítico, remueven H_2O_2 al oxidar moléculas de glutatión reducido (GSH) de la siguiente manera (1):



El glutatión es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina que contiene un grupo tiol (SH) en el residuo de cisteína de forma reducida en su forma activa (1, 8, 9). Cuando es oxidado el grupo tiol, se forma un puente disulfuro entre dos glutationes oxidados (GSSG) (1, 8, 9).

La enzima glutatión reductasa contiene un grupo FAD (dinucleótido de flavina y adenina) con el que regenera al glutatión oxidado por medio de NADPH (dinucleótido de niacina, adenina y fosfato reducido) como donador de electrones; la reacción se da de la siguiente manera (1, 8, 9):



El glutatión es la principal molécula encargada de regular la concentración de H_2O_2 en los organismos superiores, se encuentra en todos los tejidos y en algunos fluidos como la leche (1). Para prevenir padecimientos como la enfermedad del músculo blanco (mink, caballo, cerdo, ganado bovino y borrego), como también la enfermedad de corazón de mora en cerdos, es importante suministrar selenio en la dieta de los animales (1). En los humanos se presenta

una degeneración del músculo cardíaco por falta de selenio, conocida como enfermedad de Keshan (1).

Radical hidroxilo (OH[•])

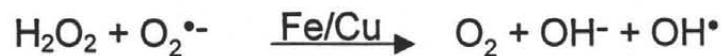
Se forma cuando el peróxido de hidrógeno acepta un electrón (esquema 2), la reacción es catalizada por metales de transición como hierro y cobre (1, 6). Su concentración en los sistemas biológicos es alrededor de 10⁻¹¹M (4).

Reacciones del peróxido de hidrógeno con metales de transición

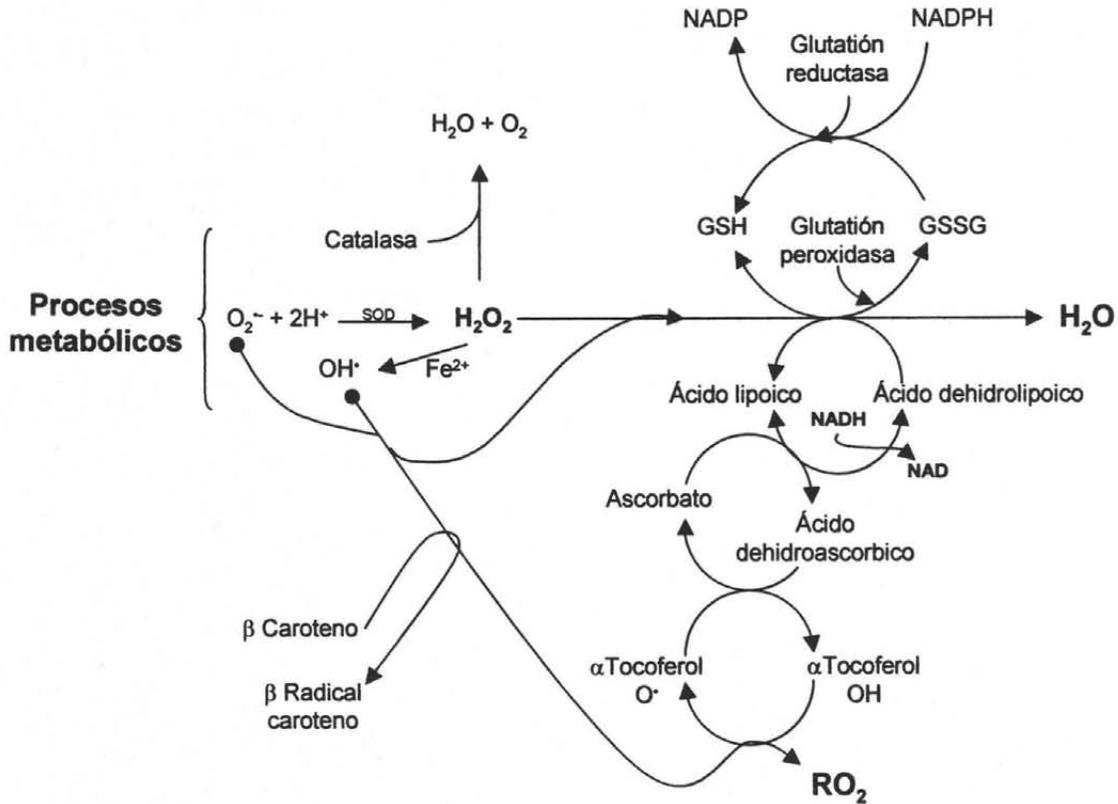
Reacción de Fenton (1, 3)



Reacción de Haber – Weiss (1, 3)

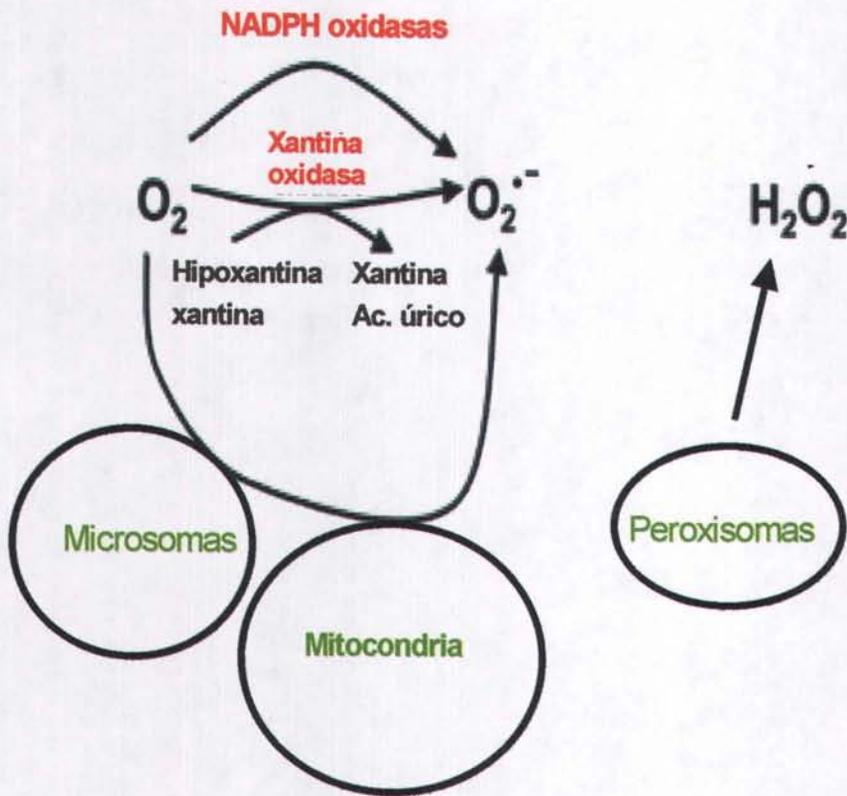


En el esquema 3 se muestra un resumen del sistema antioxidante enzimático (SOD, catalasa, glutatión) y no enzimático (Vitaminas A, C, E y ácido lipoico) encargados de mantener la integridad y función celular contra la amenaza de los radicales libres, producto de los procesos metabólicos celulares.



Esquema 3. En la parte superior se muestra al sistema antioxidante enzimático y en la parte inferior al no enzimático encargados de reducir a los radicales libres. El ácido dehidrolipoico regenera a la vitamina C, E y al glutatión y es reducido, a su vez, por el mismo organismo mediante equivalentes reductores NADH (dinucleótido de niacina y adenina reducido) (1, 8, 9, 10).

PRINCIPALES ENZIMAS Y SITIOS DONDE SE GENERAN ERO EN CÉLULAS HEPÁTICAS DE MAMÍFEROS

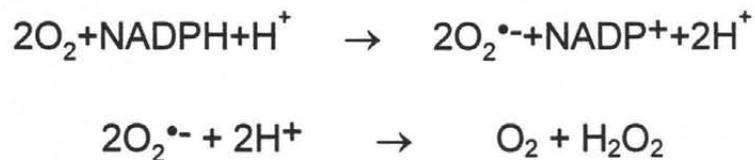


Esquema 4. Las enzimas NADPH oxidasas (Nox), xantina oxidasa, como también los microsomas y mitocondria reducen moléculas de oxígeno dando lugar al radical superóxido. En los peroxisomas se da directamente la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno (1, 6).

NADPH oxidasas (Nox)

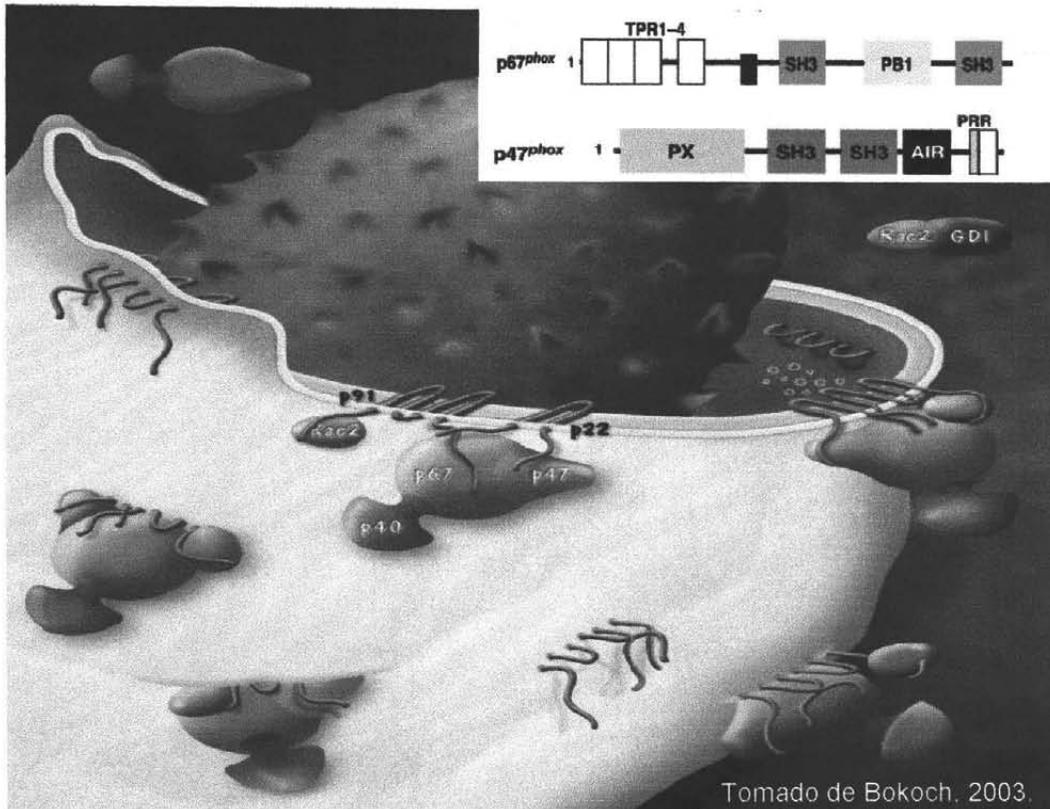
Son una familia de enzimas de la membrana plasmática conformadas por un dipéptido: la subunidad α (p22) asociada a la subunidad catalítica β (gp91) que contiene FAD (dinucleótido de flavina y adenina), dos moléculas del grupo hemo (citocromo b_{558} , citocromo b) y una región de unión de NADPH (dinucleótido de nicotina, adenina y fosfato reducido) (11, 12, 13).

La NADPH oxidasa se activa del lado citosólico, que conlleva a la oxidación de moléculas de NADPH, los electrones obtenidos del sustrato son conducidos por diferencia de voltaje del FAD al citocromo b y salen de la célula para reducir moléculas de oxígeno dando lugar al anión superóxido (12, 13). La reacción se da de la siguiente manera (1, 12):



El DPI (difeníleneiodonio) bloquea la actividad de esta enzima ya que compete con el NADPH en el sitio de unión con el FAD (14).

La Nox de las células fagocíticas (Nox 2) fue la primera de estas enzimas en caracterizarse. Sus subunidades membranales se denotan como $p22^{phox}$ y $gp91^{phox}$ (*phox*, en español oxidasa de fagocito), requiere de 4 subunidades citoplásmicas para su activación: p47, p67, p40 y una proteína G con actividad de GTPasa llamada Rac2 (esquema 5) (13, 15).



Esquema 5. La activación de la Nox 2 requiere de la traslocación dependiente de estímulo de las subunidades citoplásmicas Rac 2, p67^{phox} y p47^{phox} a la membrana (11, 13, 15). Las proteínas p67^{phox} y p47^{phox} contienen dos dominios SH3 (parte superior derecha del esquema). En estado inactivo, la subunidad p47^{phox} presenta sus dominios SH3 enmascarados por la región AIR (región autoinhibitoria) localizada en el lado carboxilo de la proteína (11, 13). Cuando se produce el efecto estimulatório, la subunidad p47^{phox} despliega sus dominios SH3 que interaccionan con p22^{phox} y Rac2 es liberado por su inhibidor GDI (inhibidor de la disociación de GDP), cambia su motivo de GDP a GTP e interacciona con p67^{phox} (11, 13). La proteína p40^{phox} tiene la función de regular el reclutamiento de p67^{phox} y p47^{phox} (11, 13, 15).

Se han encontrado 6 homólogos de la proteína gp91^{phox}: Nox 1, Nox 3, Nox 4, Nox 5, DUOX1 y DUOX2 (15). En el cuadro 1 se indican las subunidades citoplásmicas que los activan, como también su localización en el organismo y su función.

	Subunidades citoplásmicas	Localización	Función	Ref.
Nox 1	NOXA1 y NOXO1	Cólon, estómago, útero, próstata y sistema vascular.	Defensa, diferenciación celular y regulación de la presión sanguínea.	(16, 17, 18)
Nox 2	p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} y Rac2	Fagocitos.	Defensa.	(12, 13, 15, 17)
Nox 3	p47, p67	Oído interno	Formación de otoconia y auditividad.	(17, 19, 20)
	NOXO 1 y NOXA 1			
Nox 4	No requiere	Corteza renal, células endoteliales, músculo liso, esquelético y cardíaco, páncreas, placenta, ovarios, testículos, osteoclastos, fibroblastos y astrositos.	Regulación de la proliferación celular y de la expresión de genes.	(17, 21, 22)
Nox 5	Ca ²⁺	Tejido linfóide (células B y T) y testículos.	Señalización celular y activación de factores nucleares de transcripción.	(17, 23)
DUOX 1	Ca ²⁺	Glándula tiroide, y epitelio del aparato respiratorio.	Síntesis de hormonas tiroideas y defensa.	(17, 24, 25, 26)
DUOX 2	Ca ²⁺	Glándula tiroide, y epitelio de glándulas salivales y rectales.	Síntesis de hormonas tiroideas y defensa.	(17, 24, 25, 26)

Cuadro1. La proteína NOXO1 (organizador de Nox1) es homóloga a p67^{phox} y NOXA1 (activador de Nox1) es homóloga a p47^{phox} (17). Las DUOX (oxidasa

dual), son llamadas así ya que en su parte amino terminal presentan un dominio de peroxidasa y su extremo carboxilo es homólogo a gp91^{phox} (17).

Xantina/hipoxantina

Durante los procesos de isquemia el ATP es transformado hasta hipoxantina, cuando se da la reperfusión, el calcio y proteasas que se liberan por el daño celular hacen que la xantina funcione como una oxidasa y no como una deshidrogenasa, por lo tanto reduce al oxígeno y se produce el anión superóxido (27, 28). Este proceso requiere daño celular para que se dé (3).

Microsomas

Son vesículas de retículo endoplásmico (RE) que se obtienen al homogeneizar algún tejido. Según de qué porción del RE provengan es como se les denomina: microsomas rugosos o microsomas lisos (29). El interior de los microsomas rugosos es bioquímicamente equivalente al lumen total del organelo, por lo tanto se entiende como microsomas a las fracciones del retículo endoplásmico rugoso (30).

El retículo endoplásmico rugoso en el hígado es responsable de la oxidación de varias drogas, pesticidas y otros xenobioticos con el fin de que puedan ser liberados del cuerpo (30). La reducción se realiza por medio de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa, la cual requiere de la unión de alguno de los citocromos de la superfamilia P450 (llamada así porque el complejo que forman con monóxido de carbono absorbe gran cantidad de luz a 450nm) a un xenobiótico, formando un complejo que es reducido por la enzima

NADPH-citocromo P450 reductasa (1). Esta enzima utiliza como sustrato NADPH, el cual cede su par de electrones a una molécula de FAD y ésta por último reduce al complejo citocromo P450-xenobiótico y a una molécula de oxígeno la cual da lugar al anión superóxido (1, 30). No hay ninguna evidencia de que exista interacción entre microsomas y receptores de membrana.

Complejo I y II de la cadena respiratoria

Durante la respiración mitocondrial, tanto la NADH óxido-reductasa (complejo I) como el sitio ubiquinona-citocromo b (complejo II) reducen moléculas de oxígeno dando lugar al radical libre anión superóxido, esto sucede ya que la afinidad que presenta el complejo I como también el complejo II 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 hemo de los citocromos provoca que su afinidad al electrón sea mayor (31, 32).

La producción de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria es accidental y para ello existe todo un sistema enzimático antioxidante que lo contrarresta como se explicó con anterioridad (6) (esquema 3).

Peroxisomas

Es importante mencionar la participación de los peroxisomas en la producción de H_2O_2 . Estos organelos utilizan una gran cantidad de oxígeno como las mitocondrias (1). Los peroxisomas presentan una sola membrana que ellos mismos sintetizan (29). Se piensa que los peroxisomas son vestigios de algún

organelo ancestral encargado de realizar todas las reacciones involucradas con el oxígeno para proteger a la célula de daños oxidativos por la acumulación en la atmósfera de O_2 producto de las bacterias fotosintéticas (1).

Los peroxisomas contienen enzimas que utilizan oxígeno molecular para remover átomos de hidrógeno de sustratos orgánicos específicos mediante reacciones de oxidación que originan H_2O_2 (1, 29). La catalasa es una enzima que contienen los peroxisomas y utiliza el H_2O_2 para oxidar fenoles, ácido fórmico, formaldehído, alcohol y otros compuestos principalmente en hígado y riñón; esto mediante reacciones de peroxidación en donde se sustraen moléculas de hidrógeno a un compuesto y se producen dos moléculas de agua (29). Al igual que los microsomas, no hay evidencia de que exista interacción entre peroxisomas y receptores de membrana.

SEÑALIZACIÓN CELULAR POR MEDIO DE ERO

En los últimos años ha cambiado el criterio de los grupos de investigación dedicados al estudio de los radicales libres, debido al surgimiento de evidencias que constatan la participación de especies reactivas de oxígeno en procesos como la diferenciación y proliferación celular, apoptosis, regulación de la expresión genética (6, 33, 34), control de la ventilación (6, 11) y amplificación de la respuesta inmunológica (6, 33, 34).

Los cambios en el estado de óxido – reducción (redox) que se generan en el organismo son de forma balanceada, es decir, por un lado tenemos los sitios en los que la célula produce moléculas oxidantes *versus* los sistemas de reducción que los captan por los grupos tioles (SH) que se encuentran en lugares estratégicos de algunas proteínas. Cuando estos grupos son oxidados, forman un puente disulfuro con la molécula de azufre vecina, lo que produce un cambio conformacional de la proteína y por lo tanto un cambio en su función (6, 33). El sistema de la tioredoxina es el encargado principal de reducir a los puentes disulfuro mediante la utilización de NADPH para reestablecer el ciclo (1, 33). El sistema del glutatión (esquema 3) presenta un grupo tiol en el residuo de cisteína, el cual se ha visto involucrado en las reacciones de defensa antioxidante, detoxificación de xenobióticos electrofílicos, regulación de la transducción de señales, regulación de la proliferación celular y regulación de la respuesta inmune (33).

Por otra parte, los cambios en el estado redox celular inducen la fosforilación de algunas proteínas con actividad de enzimas, receptores, factores

de transcripción y elementos contráctiles que pueden ser activadas o desactivadas según el estado de fosforilación en residuos de aminoácidos específicos (6, 35).

El factor de crecimiento epidermal (EGF) es un claro ejemplo de regulación por medio de ROS. El receptor de EGF presenta del lado extracelular un dominio rico en cisteína y del lado citoplásmico un dominio con actividad enzimática del tipo cinasas de tirosina (6, 29). En las células de carcinoma epidermoide de humano se ha visto que al ser activado el receptor de EGF por su agonista, se produce la activación de una GTPasa llamada Rac 1 (6), la cual cambia su motivo de GDP (estado inactivo) a GTP (estado activo) por medio de un factor de intercambio de nucleótido de guanina de igual forma que Rac 2 en las células fagocíticas (esquema 5) (29), lo que ocasiona la activación de una enzima NADPH oxidasa, la cual produce anión superóxido y posteriormente peróxido de hidrógeno por dismutación (6). El H_2O_2 producido facilita la autofosforilación del dominio de cinasas de tirosina del EGF por medio de ATP y la inducción de la cascada de señalización (6).

Concentraciones de H_2O_2 del orden milimolar en adelante provocan la conversión del residuo de cisteína tiolado (Cis-S-SH) del centro activo del receptor en ácido sulfénico de cisteína (Cis-S-OH), de esta forma se inactiva la función enzimática del receptor de EGF por un cambio en el estado redox tiol/disulfuro (6). En el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético, el H_2O_2 mimetizan el efecto de la insulina; el receptor de este péptido hipoglucemiante pertenece al mismo grupo de receptores con actividad de cinasas que el de

EGF, los cuales también al ser estimulados activan a una enzima NADPH oxidasa y el H_2O_2 que se forma produce una retroalimentación positiva al facilitar la autofosforilación de los receptores de insulina (6).

RECEPTORES ADRENÉRGICOS Y SU ACCIÓN EN EL HÍGADO

Existen tres tipos de receptores de membrana plasmática: a) Receptores unidos a un canal iónico, b) Receptores unidos al heterotrímero de la proteína G y c) Receptores con actividad enzimática (27, 29).

Los receptores adrenérgicos pertenecen al grupo de los receptores unidos a una proteína G (superfamilia reguladora de GTPasas), la cual está formada por tres subunidades denotadas por las letras griegas “ α ”, “ β ” y “ γ ”. La subunidad α presenta actividad de GTPasa y es regulada por las otras dos subunidades (27, 29).

Los receptores adrenérgicos se clasifican en dos grupos: receptores *alfa* (α) y receptores *beta* (β), los cuales también han sido divididos en diferentes subgrupos y subtipos (36, 37).

Receptores *alfa* (α):

α_1	$\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D}$	$G_{q/11} - \text{FLPC-}\beta - \text{DAG} + \text{IP}_3$
α_2	$\alpha_{2A}, \alpha_{2B}, \alpha_{2C}$	$G_i - \text{inhibición de adenilil ciclase}$

Los receptores α_1 al ser estimulados por su agonista producen la activación de la *fosfolipasa c- β* (FLPC- β) por medio de la proteína $G_{q/11}$, la cual causa la hidrólisis del *fosfatidilinositol bisfosfato* (PIP₂) en *inositol trifosfato* (IP₃) y *diacil glicerol* (DAG), mientras que los receptores α_2 inhiben la actividad de la enzima *adenilil ciclase* a través de la activación de la proteína G_i (37, 38). Los

tipos de receptores α adrenérgicos que han sido identificados en hepatocitos de rata son: α_{1B} , α_{2A} y α_{2B} (36).

Receptores *beta* (β):

β	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$	G_s – estimulación de adenilil ciclasa – AMPc
---------	-----------------------------	---

A diferencia de los receptores α y en especial del subtipo α_2 , los receptores β producen un incremento de AMPc mediado por la *adenilil ciclasa* mediante la activación de la proteína G_s (37). De esta subfamilia, sólo los receptores β_3 están presentes en hepatocitos de rata (36).

Esta clasificación está basada en la afinidad que tiene cada uno de estos receptores a un determinado antagonista, por lo tanto pueden ser bloqueados selectivamente (36).

El funcionamiento bioquímico de los receptores α_1 en las células hepáticas es el siguiente: al ser ocupado el receptor se produce el cambio de GDP a GTP en la proteína $G_{q/11}$ y activa a la FLPC- β que produce la hidrólisis del PIP_2 situado en la membrana plasmática, se libera el IP_3 y el DAG; el IP_3 causa un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} por medio de la apertura de canales intermembranales y por la estimulación del retículo endoplásmico. El calcio y el DAG activan a la *protein cinasa C* (PKC) que desencadena la glucogenólisis e inhibe la secreción de insulina de las células β pancreáticas y estimula a las células α a liberar glucagon (27, 29, 37).

En el caso de los receptores α_2 , las subunidades β y γ de la proteína G inhiben a la enzima *adenilil ciclasa*. La subunidad α con su motivo de GTP activa

a la *fosfolipasa A₂*, la cual libera el ácido araquidónico de un fosfolípido situado en la membrana plasmática lo cual produce la respuesta fisiológica al introducir sodio y liberar hidrogeniones de la célula. La subunidad α también está involucrada en la inhibición de la *adenilil ciclasa* ya que compite con la proteína G_s de los receptores β adrenérgicos (38).

Los receptores β al ser activados por su agonista estimulan la actividad de la enzima *adenilil ciclasa* por medio de la subunidad α de la proteína G_s al cambiar su motivo de GDP a GTP. La *adenilil ciclasa* es la enzima membranal responsable de la formación de AMPc, el cual estimula a la *protein cinasa A* (PKA), dando como resultado la ruptura del glucógeno y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo, como también la inhibición de la enzima glucógeno sintasa y la fosforilación de la piruvato cinasa que conlleva a una estimulación de la gluconeogénesis (27, 36).

ANTECEDENTES

En el 2002 se determinó que el receptor α_{1B} es el causante del incremento de la concentración de ERO en células hepáticas aisladas de rata y el receptor β_3 inhibe el efecto (32). En el 2000 Krieger-Brauer y col. demostraron que las subunidades β y γ del receptor β adrenérgico inhiben directamente a la enzima NADPH oxidasa de adipositos humanos al utilizar isoproterenol (agonista específico β adrenérgico) (39). Posteriormente, en el 2003 Shi y col. encontraron que la formación de células tumorales hepáticas está influenciada por un desorden en el sistema antioxidante; el peróxido de hidrógeno producido por la enzima NADPH oxidasa actúa como segundo mensajero: Incrementa la síntesis de ADN e inhibe la apoptosis. En presencia de MnSOD, antioxidantes, o DPI, la síntesis de ADN decrece y las células tumorales sufren apoptosis (40).

Hipótesis

Los receptores adrenérgicos regulan la síntesis de especies reactivas de oxígeno mediante la modulación de una NADPH oxidasa en la membrana de las células hepáticas.

Objetivo

Determinar la participación de los receptores adrenérgicos en la regulación de una NADPH oxidasa en la membrana de las células hepáticas.

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 (36) y dificulta la lisis celular (41). La alimentación fue *ad libitum*. Se tuvo especial cuidado atendiendo las recomendaciones de Olfert *et al.* para el manejo de los animales utilizados (42).

Aislamiento de hepatocitos

Se realizó a las 9:30 a.m. Con el fin de que el procedimiento fuera indoloro, los animales fueron anestesiados con éter, el cual inhalaron 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 (43) con modificación de Guinzberg (44) 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, NaHCO₃ 12mM, dextrosa 10mM) J.T. Baker, Edo. de Mex. más colagenasa relación 1:1 p/v (20mg en 20ml) SIGMA chem. St. Louis, Mo., a pH de 7.4 y a 37°C, lo cual separa 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 tripán.

Obtención de membranas de células hepáticas

La lisis de hepatocitos se realizó con un medio hipotónico a una razón de 10:100 v/v hepatocitos buffer de lisis a 4°C; consistió de MES (2-[N-ácido morfolino]etanosulfónico) (20mM) SIGMA chem. St. Louis, Mo. a pH de 5.8, MgCl₂ (2mM), CaCl₂ (1mM), KCl (5mM) J.T. Baker, Edo. de Méx. La mezcla de células hepáticas en buffer de lisis se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se centrifugó a 1000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C, luego el sobrenadante se centrifugó a 10 000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se desechó el sobrenadante con cuidado de no eliminar la capa blanca situada en la superficie de la pastilla. El siguiente paso fue resuspender la pastilla; como las centrifugaciones se realizaron con varios tubos, las pastillas se obtuvieron con 1ml de buffer de activación (ver más adelante etapa de activación). Se volvió a centrifugar a 10 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y las pastillas se resuspendieron en 4ml de buffer de activación, este último paso se repitió una vez más con el propósito de lavar los fragmentos de membrana plasmática.

Pruebas bioquímicas para determinar la pureza de las membranas obtenidas

Se determinó la actividad de la enzima 5´nucleotidasa por medio de la técnica de Touster *et al.* con el fin de identificar la presencia de membranas plasmáticas (45).

Para determinar la contaminación por microsomas, se realizó la técnica de Duve *et al.* que permite cuantificar la actividad de la enzima glucosa 6 fosfatasa (45).

La contaminación por mitocondrias fue detectada mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa a partir de la técnica espectrofotométrica de King (46).

Activación de la enzima NADPH oxidasa

La caracterización de la enzima NADPH oxidasa de la membrana plasmática de las células hepáticas de rata se realizó a una concentración final de manganeso (3mM).

Una vez caracterizado el sistema, se evaluó el efecto de los siguientes compuestos incubando las muestras durante 2 minutos a 37°C: epinefrina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($1 \times 10^{-5} \text{M}$), prazosina (antagonista $\alpha_{1\text{B}}$), yohimbina (antagonista $\alpha_{2\text{A}}$), rauwolscina (antagonista $\alpha_{2\text{B}}$) y propranolol (antagonista β_3), estos últimos a una concentración de ($1 \times 10^{-7} \text{M}$). Como control se inhibió a la NADPH oxidasa con DPI ($10 \mu\text{M}$) (47), todos los reactivos fueron de SIGMA chem. St. Louis, Mo.

Fueron bloqueados todos los tipos de receptores adrenérgicos excepto uno y se añadió epinefrina con el fin de aislar el efecto del que se dejó libre sobre la enzima NADPH oxidasa caracterizada.

El buffer de activación consistió de: MOPS (3-[N-ácido morfolino]propano-sulfónico) (30mM) a pH de 7.5 SIGMA chem. St. Louis, Mo. NaCl (120mM), CaCl₂ (1.4mM), MnCl₂ (3mM) y NaHCO₃ (10mM), J.T. Baker, Edo. de Mex.

Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se realizó la etapa de catálisis.

Etapa de catálisis

Después de activar las membranas, estas fueron lavadas con la finalidad de retirar el buffer de activación y a los moduladores. En la etapa de catálisis, el FAD (-280mV) recibe el par de electrones y se los pasa al citocromo b (-245mV) y éste por último reduce al oxígeno (0.83V) (12, 31). Para ello la pastilla fue resuspendida en el buffer de catálisis, el cual consistió de: MES (2-[N-ácido morfolino]etanosulfónico) (30mM) a pH de 6 SIGMA chem. St. Louis, Mo., NaCl (120mM), KH₂PO₄ (1.2mM) J.T. Baker, Edo. de Mex. NaN₃ (1mM) (adicionado con el fin de inhibir a la catalasa que pudiera estar contaminando el sistema) (1) Hycel de México, Zap. Jal. y FAD (100µM) SIGMA chem. St. Louis, Mo. Se agregó NADPH (0.25mM) y las muestras se incubaron durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético (1.5 M) SIGMA chem. St. Louis, Mo. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 r.p.m. 10 minutos a 4°C y con un mililitro del sobrenadante se realizó la determinación de peróxido de hidrógeno por la técnica de Fioravanti (48). También se realizó la determinación de anión superóxido por medio de la técnica de McCord y Fridovich (7) ya que es el primer producto formado por la enzima NADPH oxidasa.

RESULTADOS

En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de pureza de las membranas plasmáticas de las células hepáticas, las cuales se realizaron con el objetivo de descartar la presencia de mitocondrias y microsomas ya que estos dos organelos producen ROS de manera fisiológica como se comentó con anterioridad en la introducción.

Prueba (enzima)	(P= fósforo)	Hepatocito	Membranas aisladas
5' nucleotidasa (nmol. P/mg proteína)		67.24	200.9
Glucosa – 6- fosfatasa (nmol. P/mg proteína)		18	0
Succinato deshidrogenasa (% actividad)		100	2

Cuadro 2. Determinación de la pureza de las membranas plasmáticas de células hepáticas. Los resultados muestran que la metodología aplicada enriqueció los fragmentos de membrana plasmática debido a la actividad mostrada por la enzima que se sabe está localizada en dicha membrana; mientras que la actividad de las enzimas ubicadas en otras membranas diferentes de la plasmática disminuyó o desapareció.

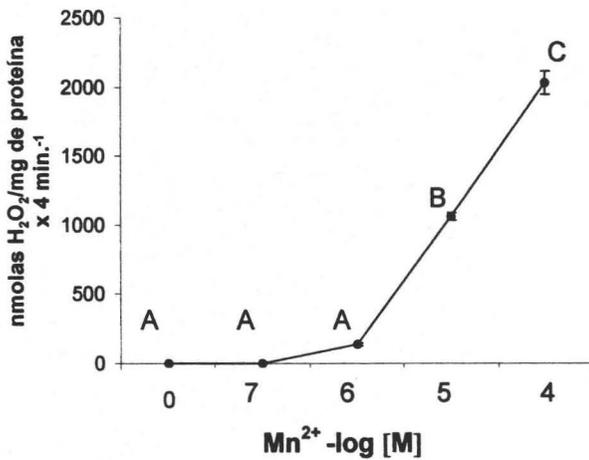
Para demostrar la presencia de una enzima NADPH oxidasa se hizo la determinación de su primer producto, el anión superóxido, que utiliza como sustrato NADPH y que es inhibida por DPI.

La reacción para la determinación de $O_2^{\bullet -}$ fue la siguiente:

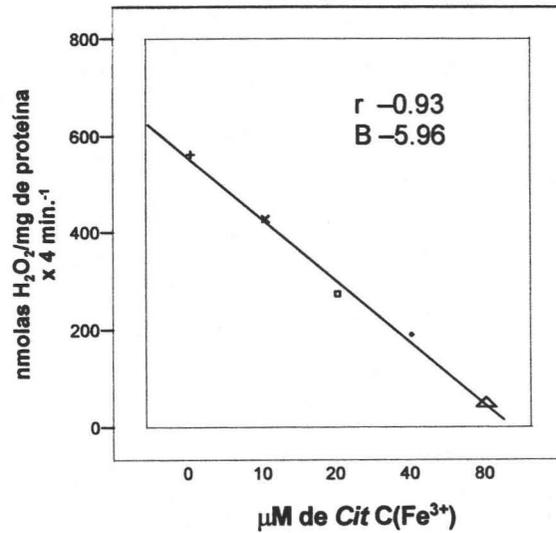


Se obtuvo una curva dosis respuesta de ferricitocromo [$\text{Cit C(Fe}^{3+})$] y se determinó la presencia de peróxido de hidrógeno formado. En la gráfica 2 se

muestran los resultados obtenidos y se puede apreciar que al aumentar la concentración de ferricitocromo disminuyó la formación de peróxido de hidrógeno ya que este último se forma a partir de $O_2^{\bullet-}$.

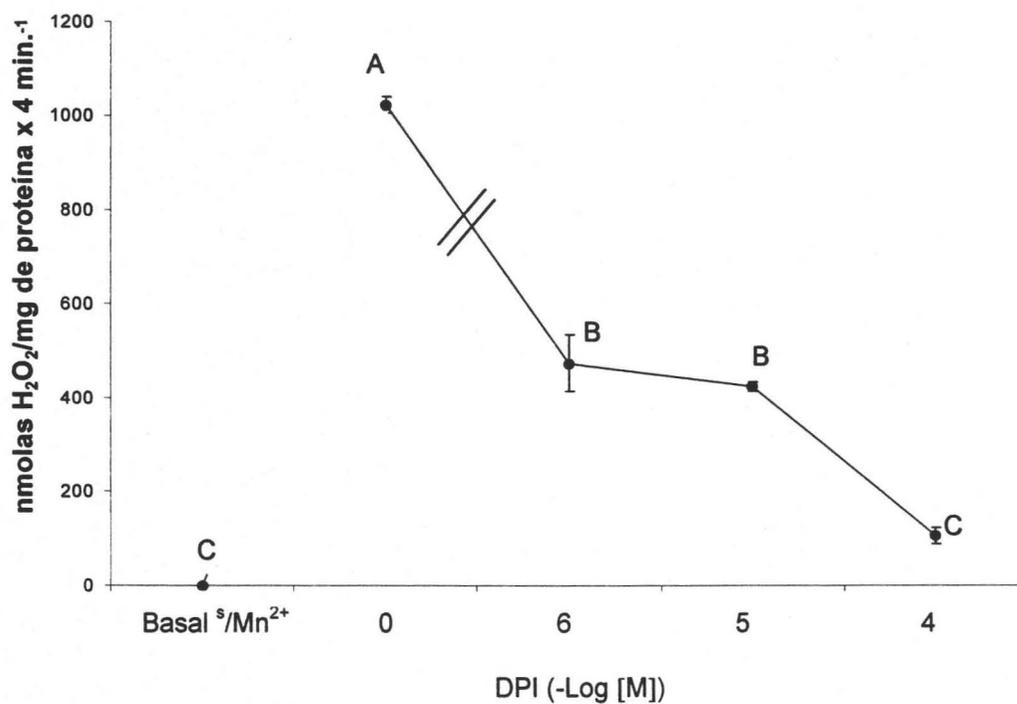


Gráfica 1. Activación de la Nox por medio de Mn^{2+} . Membranas incubadas con concentraciones crecientes de manganeso en la etapa de incubación. Para la etapa de catálisis se añadió (0.25mM) de NADPH y al término de ésta, se cuantificó la producción de peróxido de hidrógeno. Medias que no comparten la misma literal presentan diferencia estadística significativa $P < 0.05$. $n=3$.



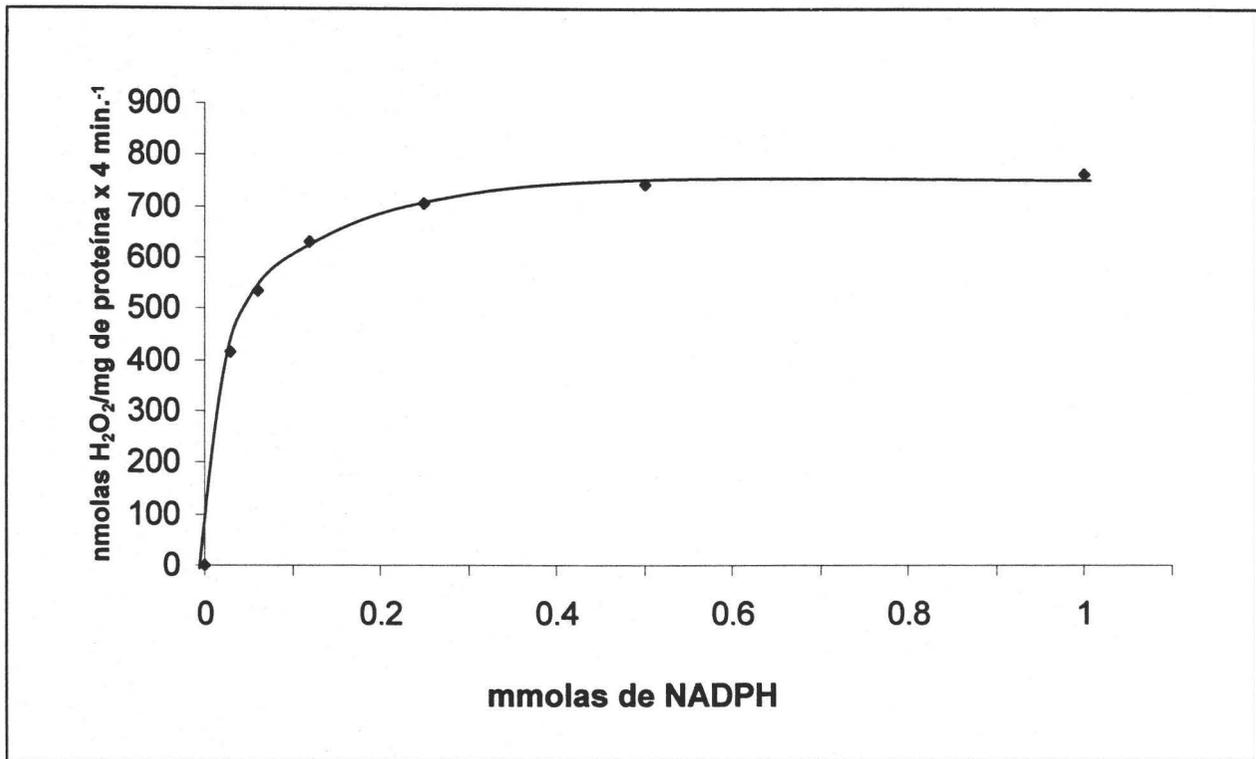
Gráfica 2. Determinación de la formación de $O_2^{\bullet-}$. Primero se realizó la etapa de activación con manganeso (3mM), posteriormente se añadieron dosis crecientes de ferricitocromo más el sustrato de la enzima, NADPH a una concentración de (0.25mM) y se determinó la formación de peróxido de hidrógeno. $n=4$.

En la gráfica 3 se muestra la inhibición del DPI sobre la producción de peróxido de hidrógeno de las membranas plasmáticas de células hepáticas mediante la utilización de manganeso (3mM) como activador del sistema.



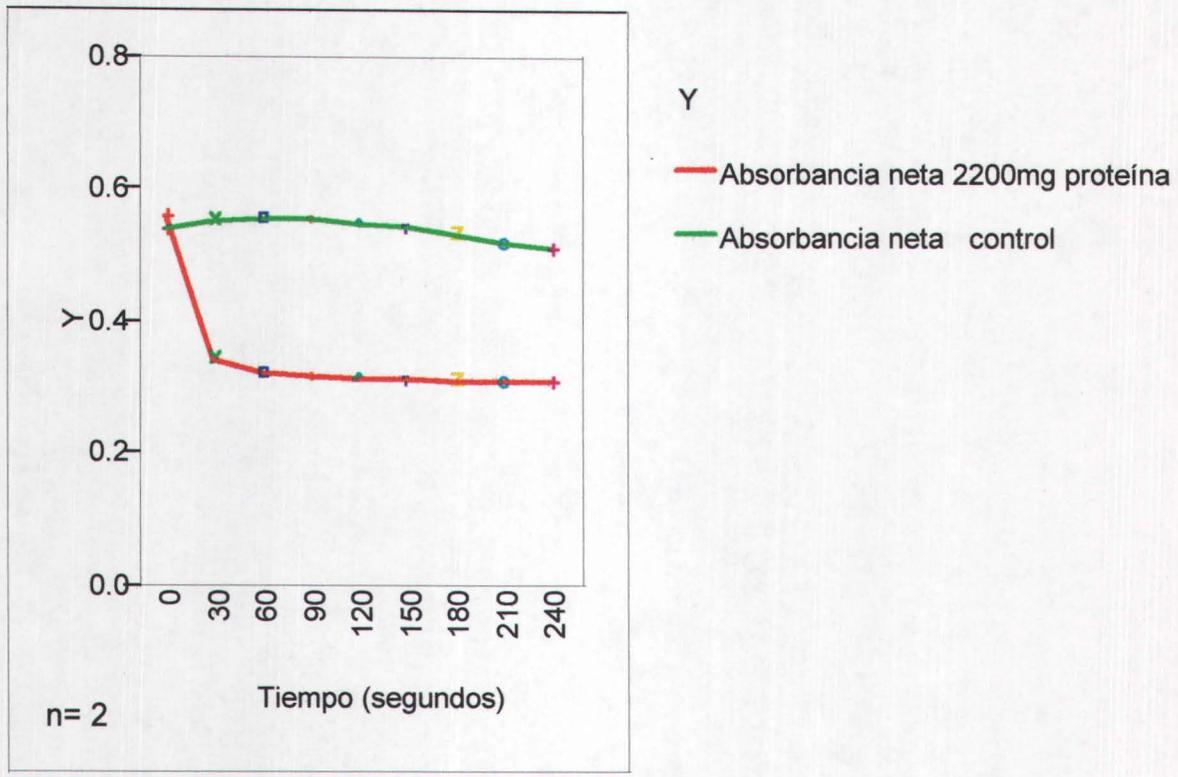
Gráfica 3. Inhibición de la enzima NADPH oxidasa por DPI. Durante la etapa de activación se agregaron diferentes concentraciones de DPI más manganeso (3mM). Los datos que se muestran son la media \pm el error estándar. Medias que no comparten la misma literal presentan diferencia estadística significativa $p<0.05$. $n=3$.

En la gráfica 4 se muestra la curva dosis respuesta de NADPH con la cual se obtuvo la K_m de la enzima (constante de Michaelis).



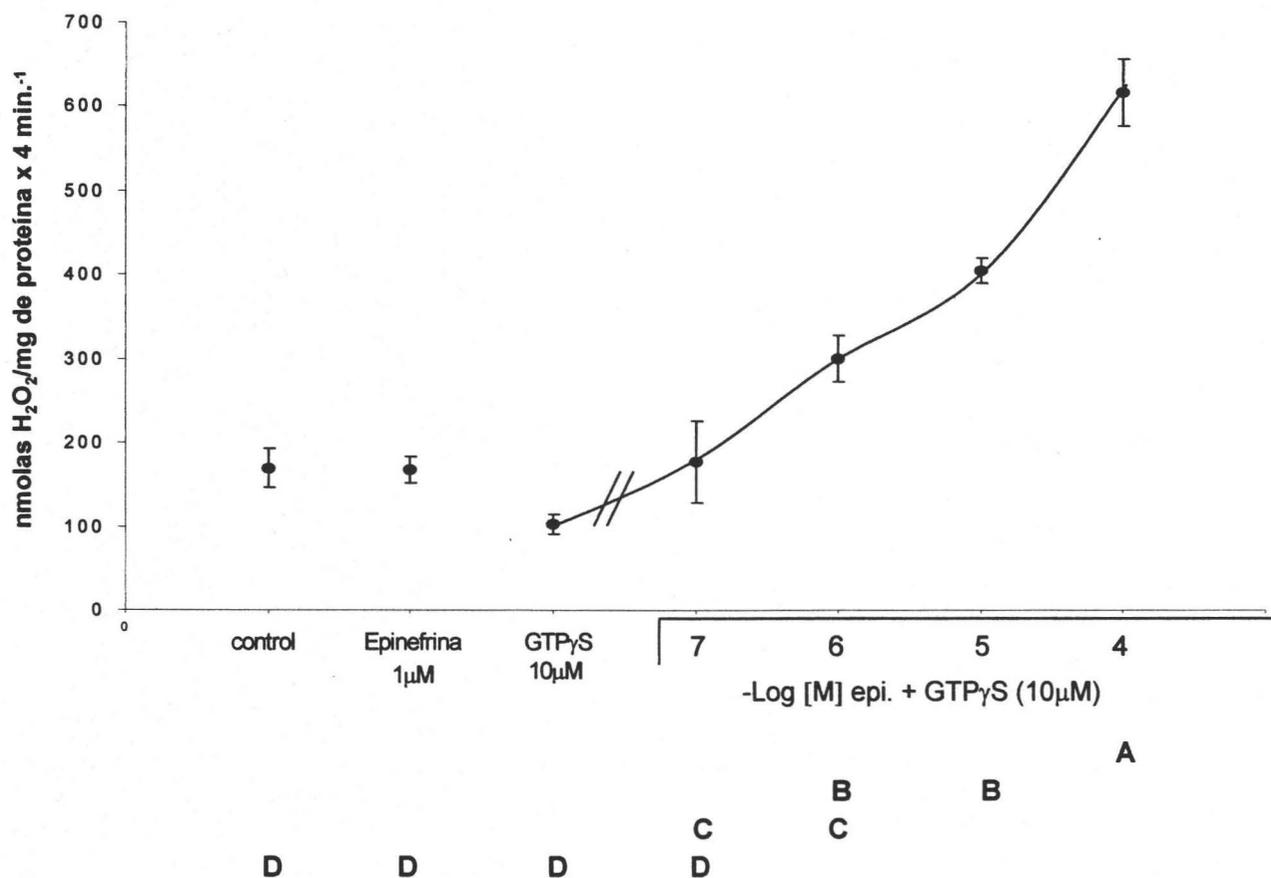
Gráfica 4. Determinación de la K_m de la enzima Nox de membrana de células hepáticas. Se agregó NADPH en la etapa de catálisis, después de una activación con (3mM) de Mn^{2+} . El valor de la K_m fue de $44\mu M$ (la K_m es la concentración de sustrato con la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima). La concentración fisiológica de sustrato en el hígado de rata es alrededor de (0.5mM) (49), esto indica que el sustrato no es un factor limitante para el funcionamiento fisiológico de la enzima. La valoración de NADH a las mismas concentraciones no indujo la producción de H_2O_2 .

Con el propósito de comprobar la utilización de NADPH por la NOX situada en las membranas plasmáticas de células hepáticas, se realizó una curva de extinción de NADPH. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 5.



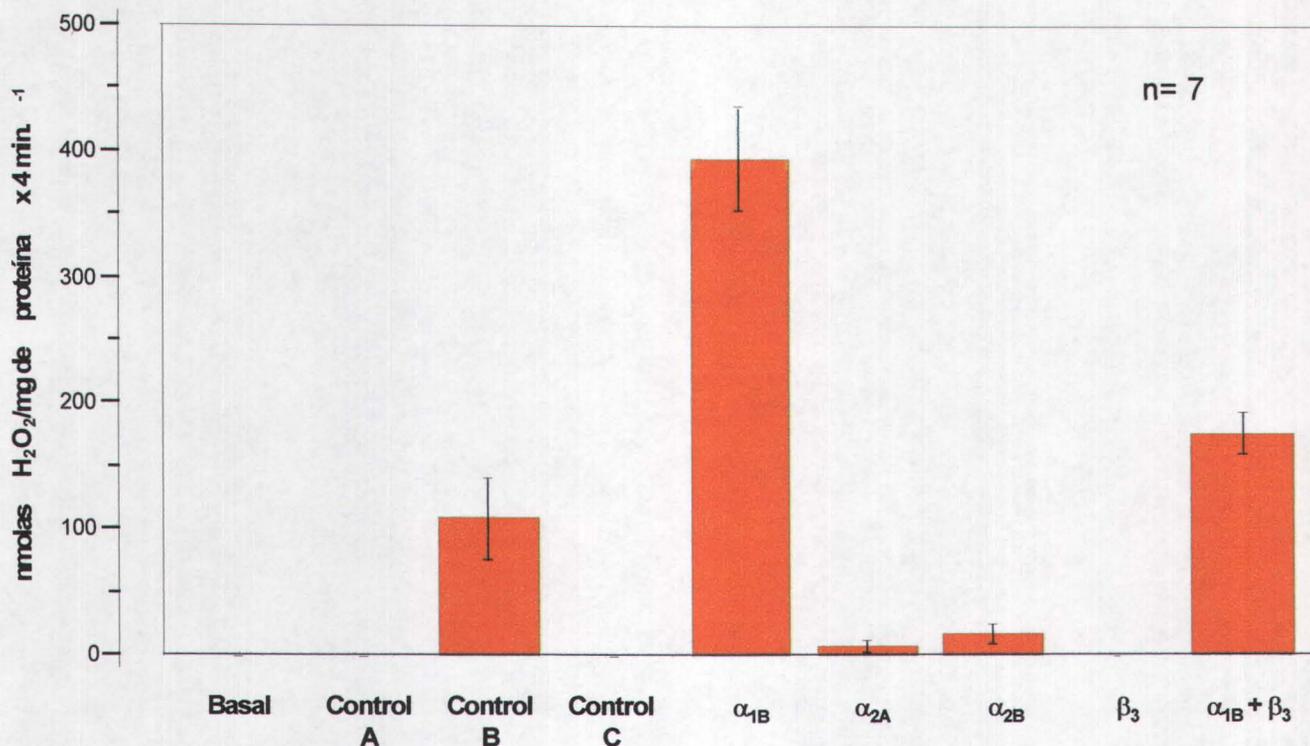
Gráfica 5. Extinción de NADPH a 340nm. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo DU 7500 en el modo de cinética enzimática. Para el control se agregó (1mM) de NADPH en H₂O y para el experimental (2.2μg) de proteína en membranas previamente activadas con Mn²⁺ (3mM) más (1mM) de NADPH. Se puede apreciar que durante el primer minuto la enzima utiliza la mayor parte del sustrato, lo cual no coincide con los experimentos en los cuales se fijó el tiempo de la etapa de catálisis, en donde se encontró que hasta los cuatro minutos la enzima sigue consumiendo su sustrato.

Una vez que se caracterizó a la enzima, se procedió a su activación con epinefrina más GTP γ S (gráfica 6).



Gráfica 6. Activación de la NADPH oxidasa por la epinefrina y GTP γ S. En la etapa de activación se agregó GTP γ S (10 μ M) más epinefrina a concentraciones crecientes en presencia de Ca²⁺ (1.4 mM). Los datos son la media \pm error estándar. Medias que no comparten la misma literal presentan diferencia estadística significativa P < 0.05. n=4.

La participación de cada uno de los receptores adrenérgicos presentes en el hígado de rata en la producción de H₂O₂ por medio de la NOX se resume en la siguiente gráfica 8.

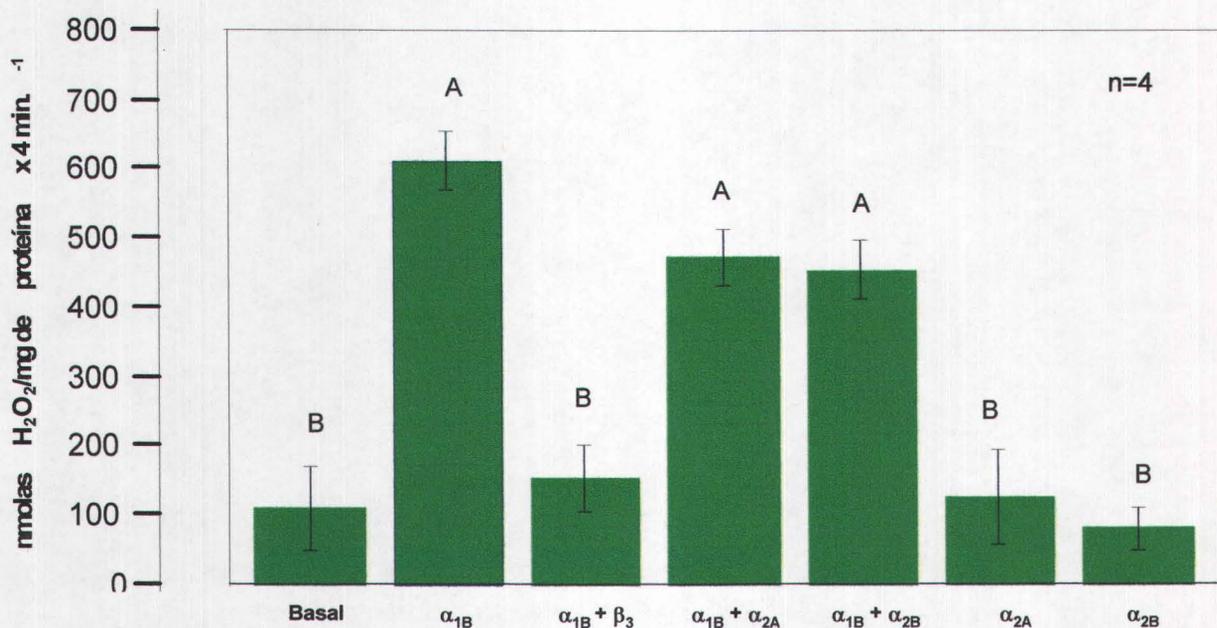


Tratamiento	Media	Error estándar	Dif. Est.
Basal	0	0	C
Control A	0	0	C
Control B	108.45	32.06	B
Control C	0	0	C
α ₁ B	394.7	40.95	A
α ₂ A	7.62	5.01	C
α ₂ B	16.32	8.29	C
β ₃	0	0	C
α ₁ B + β ₃	176.25	16.91	B

Gráfica 8. Valoración de los receptores adrenérgicos presentes en células hepáticas en la regulación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa. El control A únicamente con GTP_γS, el control B con epinefrina y GTP_γS y el

control C epinefrina, GTP γ S más prazosina, yohimbina, rauwolscina y propranolol (epinefrina 1 μ M, Ca $^{2+}$ 1.4mM, GTP γ S 10 μ M, antagonistas 1 μ M). Los receptores que se indican debajo de cada columna son los que no se bloquearon. Medias que no comparten la misma literal presentan diferencia estadística significativa P < 0.05. n=7.

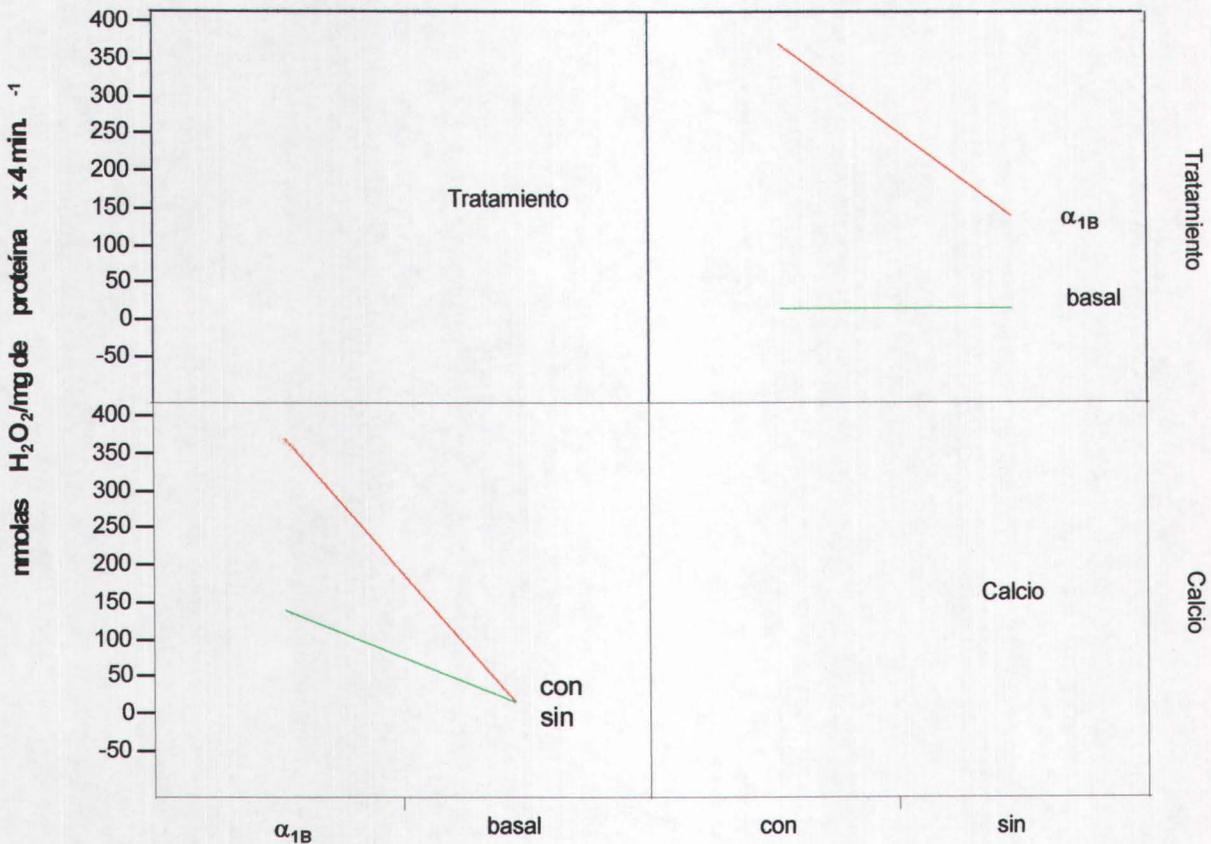
En la gráfica 8 se puede observar que el agonista β_3 inhibió la acción del receptor α_{1B} . La gráfica 9 muestra que los receptores α_{2A} y α_{2B} no tuvieron ningún efecto sobre la regulación de la enzima NADPH oxidasa presente en los fragmentos de membrana plasmática de células hepáticas de rata.



Gráfica 9. Efecto de los receptores α_{2A} y α_{2B} sobre la NADPH activada por el receptor α_{1B} . La etapa de activación se realizó en presencia de epinefrina (1 μ M), GTP γ S (10 μ M) más los antagonistas requeridos para dejar libres los

receptores que se indican en cada barra de la gráfica a una concentración de (1 μ M). Los datos son la media \pm error estándar. Medias que no comparten la misma literal presentan diferencia estadística significativa $P < 0.05$.

En la gráfica 10 se muestra la participación del calcio en la activación de la enzima NADPH oxidasa de la membrana plasmática de células hepáticas de rata.



Gráfica 10. Efecto aditivo del calcio (1.4 mM) sobre el receptor α_{1B} adrenérgico en la estimulación de la enzima NADPH oxidasa. La etapa de activación se llevó a cabo en presencia de GTP γ S (10 μ M), epinefrina (1 μ M), con y con Ca²⁺ (1.4mM) más los antagonistas adrenérgicos requeridos para dejar

libre únicamente al receptor α_{1B} . Los datos son la media \pm error estándar (n= 4, P < 0.0001).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN

La caracterización de la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática presente en las células hepáticas se realizó mediante la utilización de Mn^{2+} , ya que los cationes bivalentes a concentraciones milimolares mimetizan el efecto del GTP (47). La utilización del manganeso fue necesaria para determinar los tiempos ideales para cada etapa, pH de las mismas, concentración de sustrato y cofactores.

Para alcanzar la actividad máxima de la enzima, se concluyó que se requiere de dos incubaciones a tiempo y pH distinto. La primera incubación sirvió para activar a la enzima, ya fuese con Mn^{2+} (3mM) o con $GTP\gamma S$ (10 μ M) más epinefrina (1 μ M) a un pH de 7.4 durante 2 minutos a 37°C con el fin de que en la siguiente etapa la enzima catalizará la reacción de reducción de moléculas de oxígeno a partir de su sustrato, el NADPH. La duración de esta última etapa fue de 4 minutos a pH de 6 y a 37°C.

Existen algunos criterios bioquímicos fundamentales para determinar si la enzima productora de H_2O_2 pertenece a la familia de las NADPH oxidasas, los cuales son: 1) el peróxido de hidrógeno debe de provenir del anión superóxido, el cual es el primer producto formado por la enzima al sustraer electrones del NADPH y pasarlos a través del FAD y del citocromo b a las moléculas de oxígeno situadas en el exterior de la célula; 2) no se requiere de ATP para que se lleve la reacción y 3) la producción de H_2O_2 se ve inhibida con DPI (difeniileneiodonium) (11).

La curva dosis respuesta de la reducción del anión superóxido por medio de ferricitocromo, mostró que no hubo lugar para la formación de H_2O_2 . El coeficiente de correlación r mostró que la disminución de peróxido de hidrógeno se relacionó con la presencia de ferricitocromo en un 93% y la pendiente de la recta indicó que por cada micromola de ferricitocromo agregada, la producción de H_2O_2 disminuye 5.9 nmolas.

Los resultados muestran que la actividad de la enzima fue dependiente de NADPH exclusivamente y su K_m fue de $44 \mu M$; si se hace la comparación con la K_m de las células fagocíticas, que va de $30-80 \mu M$ (50) podemos concluir entonces que no existe diferencia, por lo que la actividad de la enzima presente en células hepáticas es de consideración.

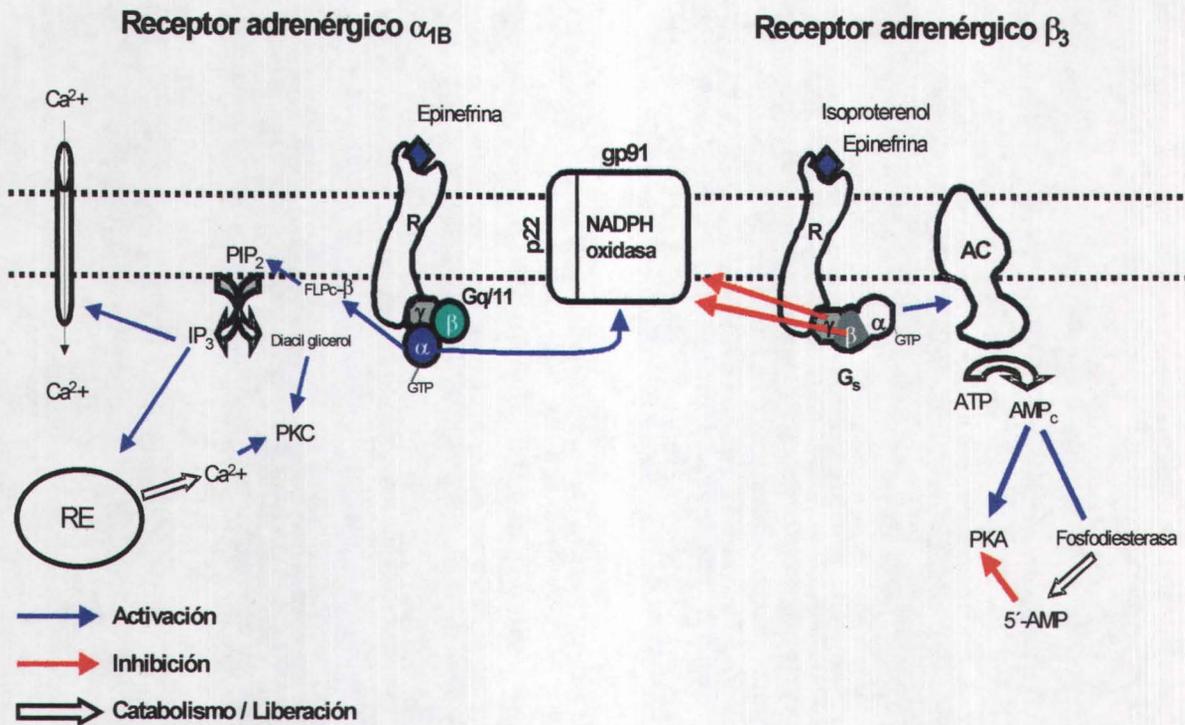
Para la etapa de catálisis se observó que la enzima requiere la adición del cofactor FAD (dinucleotido de flavina y adenina), elemento estructural de la proteína gp91, el cual se encarga de oxidar a las moléculas de sustrato.

Con este trabajo se demostró que el receptor α_{1B} por medio de una enzima NADPH oxidasa situada en la membrana plasmática de células hepáticas produce especies reactivas de oxígeno y que el receptor β_3 inhibe el efecto tal y como fue descrito por Krieger – Brauer en adipositos de humano (47).

La concentración de peróxido de hidrógeno que se cuantificó, producto de la activación y catálisis de la enzima NADPH oxidasa situada en los fragmentos de membrana plasmática de células hepáticas, es del orden nanomolar, concentración no tóxica para cualquier estructura celular. La concentración

mínima tóxica de H_2O_2 para la célula es de $10\mu\text{M}$ (1) por lo que la producción de ERO por esta enzima sugiere su participación en la señalización celular, al estar involucrado un receptor hormonal de por medio.

Con el siguiente esquema se propone un modelo sobre la respuesta integral de los dos receptores adrenérgicos, sobre la regulación de la enzima NADPH oxidasa en células hepáticas.



Esquema 6. Posible mecanismo de regulación de la NADPH oxidasa por los receptores adrenérgicos α_{1B} y β_3 y la cascada de señalización por cada uno de estos. El receptor α_{1B} mediante la proteína $G_{q/11}$ activa directamente a la enzima NADPH oxidasa, la cual también desencadena la respuesta fisiológica de su agonista. Por otra parte, las subunidades β y γ del receptor β_3 inhiben a la misma enzima productora de H_2O_2 y la subunidad α estimula a la adenilil ciclasa la cual incrementa los niveles de AMPc. Los receptores α_{1B} adrenérgicos constituyen la mayor parte de la población de receptores adrenérgicos en el

hígado y son los principales responsables de la acción de las catecolaminas en ese órgano (51, 52).

LITERATURA CITADA

- 1 Halliwell B. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. New York: Oxford; 1999.
- 2 Sienko MJ. Química principios y aplicaciones. México: Mc Graw-Hill; 1990.
- 3 Chang R. Química. 4 ed. México: Mc Graw-Hill; 1994.
- 4 Bronisław K. Application of high-performance liquid chromatography to the investigation of free radical reactions in biological systems. *TrAC trends in analytical chemistry*. 2000;19(8):492-497.
- 5 Beckman KB. The free radical theory of aging matures. *physiological reviews*. 1998;78(2):547-580.
- 6 Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *physiological reviews*. 2001;82:47-95.
- 7 McCord JM. Superoxide Dismutase. *The journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6049-6055.
- 8 Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free radical biology and medicine*. 1996;20(5):675-705.
- 9 Baskin SI. Oxidants, antioxidants, and free radicals. USA: Taylor and Francis; 1997.
- 10 Díaz Cruz. Prophylactic action of lipoic acid on oxidative stress and growth performance in broilers at risk of developing ascites syndrome. *Avian pathology*. 2003;32(6):645-653.
- 11 Bokoch GM. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *TRENDS in biochemical sciences*. 2003;28(9):502-508.
- 12 Jones RD. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free radical biology and medicine*. 2000;29(5):416-424.
- 13 Groemping Y. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. 2003;113(3):343-355.

- 14 O'Donnell VB. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochemical journal*. 1993;290:41-49.
- 15 Massenet C. Effects of p47^{phox} C terminus phosphorylations on binding interactions with p40^{phox} and p67^{phox}. *The journal of biological chemistry*. 2005;280(14):13752-13761.
- 16 Banfi B. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science*. 2000;287(5450):138-142.
- 17 Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese journal of infectious disease*. 2004;57(5):S28-S29.
- 18 Suh YA. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.
- 19 Banfi B. NOX 3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *Journal of biological chemistry*. 2004;279(44):46065-46072.
- 20 Paffenholz R. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes development*. 2004;18(5):486-491.
- 21 Shiose A. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *Journal of biological chemistry*. 2001;276(2):1417-1423.
- 22 Geiszt M. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(14):8010-8014.
- 23 Banfi B. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):37594-37601.
- 24 Moreno J. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med*. 2002;347(2):95-102.
- 25 Edens WA. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91^{phox}. *Journal of cell biology*. 2001;154(4):879-891.

- 26 De Deken X. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of biological chemistry*. 2000;275(30):23227-23233.
- 27 Cox MC Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry*. 14 ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2005.
- 28 Murray RK. *Bioquímica de Harper*. 15 ed. México: Manual moderno; 2001.
- 29 Alberts. *Molecular biology of the cell*. 4 ed. New York: Garland science; 2002.
- 30 Rashba-Step J. Increased NADPH- and NADH-Dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;300(1):401-408.
- 31 Piña E Laguna J. *Bioquímica de Laguna*. 5 ed. México: Manual moderno; 2002.
- 32 Guerra R. 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. México: UNAM FMVZ; 2002.
- 33 Sen ChK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochemical pharmacology*. 1998;55:1747-1756.
- 34 Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB journal*. 1997;11:118-124.
- 35 Suzuki YJ. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free radical biology and medicine*. 1997;22(1/2):269-285.
- 36 Stephen JP editor. *Handbook of receptors and channels*. Boca Raton: CRC Press. Inc.; 1994.
- 37 Minneman KP Zhong H. α_1 Adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology*. 1999;375:261-276.
- 38 Limbird LE. *The α_2 adrenergic receptors*. New Jersey: Humana press; 1988.
- 39 Krieger-Brauer. Inhibitory effect of isoproterenol on NADPH-dependent H_2O_2 generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by

- $\beta\gamma$ - subunits derived from G_s . The journal of biological chemistry. 2000;275(4):2486-2490.
- 40 Shi DY. Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. FEBS Letters. 2003;542:60-64.
- 41 Neville DM. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. The journal of biophysical and biochemical cytology. 1960;8:413-422.
- 42 Cross BM Olfert ED, McWilliam AA editors. Manual sobre el cuidado y uso de los animals de experimentación. 2 ed. Canadá: Consejo canadiense de protección de los animales; 1998.
- 43 Friend DS Berry MN. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. J. Cell Biol. 1969;43:506-512.
- 44 Guinzberg PR. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. Biochem J. 1987;245:371-374.
- 45 Touster O. Isolation of rat liver plasma membranes. J.Cell biol. 1970;47:604-618.
- 46 King TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. Methods in enzymology. 1967;10:322-331.
- 47 Krieger-Brauer. The stimulus-sensitive H_2O_2 - generating system present in human fat-cell plasma membranes is multireceptor- linked and under antagonistic control by hormones and cytokines. Biochem. J. 1995;307:543-548.
- 48 Fioravanti CF. Mitochondrial hydrogen peroxide formation and fumarate deductase of *Hymenolepis diminuta*. J. Parasitol. 1990;76(4):457-463.
- 49 Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. 2 ed. USA: Academic press, Inc.; 1974.
- 50 Krieger-Brauer. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H_2O_2 -generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. Journal of clinical investigation. 1992;89:1006-1013.

- 51 Goodhardt M. The hepatic α_1 -Adrenergic receptor. *Biochemica pharmacology*. 1984;33(6):863-868.
- 52 Mahmoud F. Evidence for heterogeneous distribution of α_1 , α_2 - and β -adrenergic binding sites on rat-liver cell surface. *Biochimica et biophysica acta*. 1984;775:356-364.