

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA TIPO 2 POR RECEPTORES  
ADRENÉRGICOS EN HEPATOCITOS DE RATA.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS

P R E S E N T A

ANTONIO DÍAZ CRUZ

TUTOR:

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

COMITÉ TUTORAL:

ARTURO EDGAR ZENTENO GALIDO

ENRIQUE MARTÍN ABURTO FERNÁNDEZ



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.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Enrique Piña Garza por haberme dado la oportunidad de trabajar con él.

De igual manera, expreso mi agradecimiento para los Drs. Raquel Guinzberg Perrusquía, Magdalena Vilchis Landeros, Ruy Guerra García y Surid Virgen Díaz, así como a la Sra. Ma. Eugenia Perez B. por su participación y apoyo en la realización de este trabajo.

Agradezco a los Drs. Arturo Edgar Zenteno Galindo y Enrique Martín Aburto Fernández integrantes de mi comité tutor su participación en la conducción de este proyecto.

Gracias a los Drs. Alejandro Villa Godoy, Enrique Martín Aburto Fernández, Mario Pérez Martínez, Vicente Madrid Marina y Enrique Piña Garza revisores del trabajo de tesis e integrantes del jurado de examen por su disponibilidad y compromiso académico.

Expreso mi gratitud a la Facultad de Medicina-UNAM, A LA Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, a DGAPA-UNAM y al CONACYT, por las facilidades prestada para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

Este trabajo lleva una especial dedicatoria para Raquel, Abraham y Disraeli, con quienes comparto con gusto esta meta alcanzada, gracias por todo, los amo.

## RESUMEN

En los últimos años se ha hecho evidente el papel que juegan las especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés), tales como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en los procesos de transducción de señales. De hecho, una alteración en los mecanismos de transducción que involucre un incremento en la producción ROS contribuye a mantener la homeostasis. Por lo tanto, es importante identificar en las células el origen molecular de la producción de ROS que eventualmente intervienen en la señalización y los mecanismos que participan en la regulación de su síntesis. En este trabajo no se revisa la producción celular continua y exagerada de ROS por sistemas ajenos al de la transducción de señales y que llevan a un estado de estrés oxidativo, que deteriora y llega a comprometer la vida de la célula. En una situación ajena a los dos sistemas anotados, ambos generadores de ROS, se situaría a las células fagocíticas en el llamado estallido respiratorio, durante el cual existe una importante producción de ROS, por medio de la activación de la enzima NADPH oxidasa (Nox 2) que cataliza la reducción de un oxígeno molecular a  $O_2^{\bullet-}$  usando NADPH como fuente de electrones. En la década de los años 90 fueron descubiertos en células no-fagocíticas, un grupo de proteínas con diferentes porcentajes de identidad a la Nox 2 y que catalizan la misma reacción. Además en hepatocitos de rata a través de la expresión de RNAm, se reportó la existencia de RNAm para Nox 2, así como sus homólogos Nox 1 y Nox 4. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo reportó que la adrenalina estimula en hepatocitos aislados de rata la producción de  $OH^{\bullet}$ . El presente trabajo fue realizado para investigar la probable participación de alguna isoforma de la Nox hepática, como una señal inmediata

de estrés oxidativo en respuesta a la adrenalina. Para ello, a partir de células aisladas de hígado de rata y purificados por elutriación, se prepararon fracciones

enriquecidas de membranas plasmáticas. Dichas membranas mostraron propiedades características de la actividad catalítica de las isoformas de Nox: forman NADP al oxidar NADPH, los equivalentes reductores producidos reducen al  $O_2$  y generan  $O_2^{\bullet-}$ , el cual en un medio ligeramente ácido y sin la participación de enzimas se transforma en  $H_2O_2$ . La reacción catalítica requirió de una activación previa ya sea con  $Mn^{2+}$  a una concentración de 3 mM, o de concentraciones micromolares de  $GTP\gamma S$  y adrenalina. Se definieron las condiciones óptimas para la etapa de activación con  $Mn^{2+}$  y para la etapa catalítica: bajo tales condiciones ambas etapas fueron insensibles al ATP e inhibibles con difenilidonio (DPI). El valor de  $S_{0.5}$  para el NADPH fue de 44  $\mu M$  y para el FAD fue 8  $\mu M$ . Para este sistema, el NADH a concentraciones hasta de 1mM no fue usado como sustrato para la síntesis de  $O_2^{\bullet-}$ . En presencia de  $GTP\gamma S$ , la activación por adrenalina fue dosis dependiente y se llevó a cabo a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , mientras que la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\beta$  inhibió la actividad estimulada de la Nox. Por otro lado, a través del uso de anticuerpos, se identificó en membranas plasmáticas obtenidas de hepatocitos purificados por elutriación, los componentes proteicos del complejo Nox 2. Se propone a la Nox 2 como responsable de la generación de peróxido de hidrógeno en un sistema regulado por adrenalina, por lo que el  $H_2O_2$  podría participar como una molécula adicional a las ya conocidas en la transducción de señales para dicha hormona en células las hepáticas (CONACYT 45003-M, UNAM; DGAPA IN202106). Palabras clave: NADPH oxidasa, peróxido de hidrógeno, adrenalina, hepatocitos.

## ABSTRAC

It is known that adrenaline promotes hydroxyl radical generation in isolated rat hepatocytes. The aim of this work was to investigate a potential role of NADPH oxidase (Nox) isoforms for an oxidative stress signal in response to adrenaline in hepatocytes. Enriched plasma membranes from isolated rat liver cells were prepared for this purpose. These membranes showed catalytic activity of Nox isoforms, probably Nox 2 based on its complete inhibition with specific antibodies. NADPH was oxidized to convert O<sub>2</sub> into superoxide radical, later transformed into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This enzymatic activity requires previous activation with either 3 mM Mn<sup>2+</sup> or guanosine 5'-0-(3-thiotriphosphate) (GTP<sub>γ</sub>S) plus adrenaline. Experimental conditions for activation and catalytic steps were set up: ATP was not required; S<sub>0.5</sub> for NADPH was 44 μM; S<sub>0.5</sub> for FAD was 8 μM; NADH up to 1 mM was not substrate, and diphenyleneiodonium was inhibitory. Activation with GTP<sub>γ</sub>S plus adrenaline was dose- and Ca<sup>2+</sup>-dependent and proceeded through α<sub>1</sub>-adrenergic receptors (AR), whereas β-AR stimulation resulted in inhibition of Nox activity. These results lead us to propose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as additional transduction signal for adrenaline response in hepatic cells (CONACYT 45003-M, UNAM; DGAPA 1N202106).

**Keywords:** NADPH oxidase, adrenaline, hydrogen peroxide, liver cell.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	21
OBJETIVO GENERAL	25
HIPÓTESIS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	61
PERSPECTIVAS	66
BIBLIOGRAFÍA	68

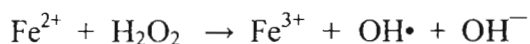
## INTRODUCCIÓN

### Especies de oxígeno reactivas

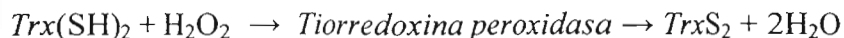
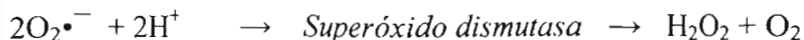
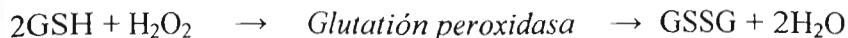
La vida surgió en la Tierra hace aproximadamente 3 500 millones de años a partir de compuestos relativamente simples y en una atmósfera primitiva con características reductoras. Con la aparición de células capaces de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis (algas cianofíceas o verde azules), hace aproximadamente 2 600 millones de años, comenzó a acumularse lentamente el  $O_2$  molecular en la atmósfera y solo entonces en el seno de una atmósfera oxidante, pudieron desarrollarse los organismos aerobios, capaces de utilizar el oxígeno para extraer una mayor cantidad de energía de los nutrientes. En etapas posteriores los organismos multicelulares complejos tales como los mamíferos han desarrollado mecanismos que aseguran que el  $O_2$  sea distribuido y liberado en todas las células que lo necesitan. Cerca del 85 – 90% del  $O_2$  consumido por los animales es utilizado en la mitocondria para la síntesis de ATP y del 10 – 15 % es usado en reacciones enzimáticas (oxidadas, oxigenasas) y no enzimáticas independientes de la síntesis de ATP<sup>1</sup>. Esta necesidad del oxígeno oscurece el hecho de que bajo ciertas condiciones, el  $O_2$  se comporta como un gas tóxico para la célula y que parte de la supervivencia celular radica en los mecanismos de defensa antioxidante que la célula ha desarrollado. El metabolismo del  $O_2$  implica la formación de sustancias intermedias que si están en concentraciones elevadas llegan a ser tóxicas para la célula, dichas sustancias poseen las características de las **Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)**<sup>1</sup>. La abreviatura ROS



(HOCl), el ozono (O<sub>3</sub>), el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>1,2</sup>. Para evitar confusiones posteriores, vale la pena incluir la definición química de radical libre: “un radical libre es cualquier especie capaz de existir independientemente que contiene un electrón desapareado”. Como regla general, para este conjunto de entidades químicas se menciona que el intermediario mas inestable tiene una alta reactividad y una vida media muy corta y viceversa, tal es el caso del OH•, probablemente el mas reactivo y citotóxico, ya que tiene una vida media de 10<sup>-9</sup> segundos, difunde menos de 2 nm del sitio en que es generado y reacciona con cualquier molécula biológica disponible en su sitio de producción. No ocurre lo mismo para los ROS como el O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que ejercen múltiples efectos, son menos reactivos y su vida media es más larga. En particular, solo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede difundir fácilmente a través de la membrana, mientras que el O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> difunde muy pobremente a través de las membranas celulares<sup>3</sup>. En algunas ocasiones, el peróxido de hidrógeno es el sustrato para la formación de hidroxilos, ya que el O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> se transforma espontáneamente o por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y este último puede generar OH• en presencia de Fe<sup>2+</sup> (reacción de Fenton)<sup>1,4</sup>.



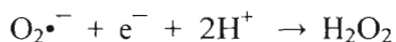
Los ROS son producidos natural y continuamente dentro de la célula, para prevenir su acumulación y por lo tanto sus efectos tóxicos, la célula desarrolló un conjunto de mecanismos a través de los cuales inactiva a los ROS, éstos mecanismos conocidos como



Una sobreproducción de ROS y/o una disminución en la capacidad antioxidante de la célula se traduce en un desorden metabólico conocido como “Estrés Oxidativo”<sup>1</sup>. La condición de estrés oxidativo puede ser inducido por varios factores, por ejemplo; la radiación energética genera  $\text{OH}^{\bullet}$ , un estado de hiperoxia promueve la formación de ROS<sup>6</sup>, la estimulación crónica del sistema inmune nos lleva a una producción de ROS debido a la actividad de la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa en los fagocitos<sup>7</sup>. Si la producción de ROS es masiva, causará necrosis celular, debido al daño irreversible de macromoléculas celulares, o bien, pueden inducir apoptosis sin generar daño al DNA<sup>8</sup>. Sin embargo, cuando el incremento en ROS es transitorio, moderado y regulado, este no es lesivo para la célula, puede participar en la señalización celular y es controlado por el sistema antioxidante.

Anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formado por la reducción del oxígeno molecular es rápidamente convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$



( $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ). Muchos tipos de células entre ellas las células endoteliales, producen

trombina, ácido lisofosfatídico, esfingosina 1-fosfato, histamina, bradiquinina), entre otros<sup>9</sup>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido intracelularmente en respuesta a la estimulación de un receptor se ha reportado que puede afectar la función de varias proteínas, incluyendo proteínas quinasas, proteínas fosfatasas, factores de transcripción, fosfolipasas, canales iónicos y proteínas G<sup>10</sup>.

### NADPH oxidasa (Nox)

La producción de ROS estimulada por un receptor fue primeramente reconocida en fagocitos, en donde a través de un consumo exagerado, brusco y transitorio de oxígeno (conocido como estallido respiratorio), células como los neutrófilos y macrófagos al ser estimuladas de manera apropiada generan, vía la enzima NADPH oxidasa (Nox), el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el que dismuta espontáneamente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir del cual se pueden formar nuevos ROS<sup>2</sup>. La presencia de ROS más la actividad de proteasas (catepsina G, proteinasa 3, elastasa) liberadas por los gránulos primarios del fagosoma complementan la acción antimicrobiana<sup>2, 11</sup>.

La enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática de los fagocitos es inactiva cuando dichas células se encuentran en reposo, pero llega a ser activada después de la exposición a microorganismos o mediadores de la inflamación<sup>12</sup>. Alteraciones en la funcionalidad de Nox resulta en un severo estado de inmunodeficiencia. Los individuos que sufren de la enfermedad granulomatosis crónica (CGD, por sus siglas en inglés), un desorden genético que es causado por mutaciones en los genes de la NADPH oxidasa o de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS) por los neutrófilos, juegan un importante papel en la respuesta inmune innata del individuo.

Los ROS propuestos como productos tóxicos de la NADPH oxidasa en neutrófilos son los siguientes: La Nox al oxidar al NADPH (1) se liberan electrones que via gp91<sup>phox</sup> genera en presencia de oxígeno molecular el radical superóxido (2), el cual dismuta a peróxido de hidrógeno en presencia de protones (3). El peróxido y superóxido pueden reaccionar para producir radicales hidroxilo en presencia de iones metálicos via la reacción de Fenton (4). El peróxido de hidrógeno sirve como sustrato para la enzima *mieloperoxidasa* y forma ácido hipocloroso (5).

1.  $\text{NADPH} \rightarrow \text{Nox} \rightarrow \text{NADP} + e^- + \text{H}^+$
2.  $e^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}\cdot^-$
3.  $\text{O}\cdot^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
4.  $\text{O}\cdot^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$
5.  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{mieloperoxidasa} \rightarrow \text{HOCl}$

La NADPH oxidasa de los fagocitos profesionales es el prototipo de una nueva familia de proteínas que al ser activada transporta electrones de manera regulada. Los electrones provienen de la oxidación del NADPH y son utilizados para la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a partir de oxígeno molecular<sup>14</sup>. Esta oxidasa del fagocito consiste de un flavocitocromo transmembranal (cyt b<sub>558</sub>) el cual está conformado por las subunidades proteicas gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> (Figuras 1 y 2) y un grupo de proteínas citosólicas con una estiquimetría de 1:1:1 que migran hacia el citocromo b<sub>558</sub> y son conocidas como: p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> (phox,

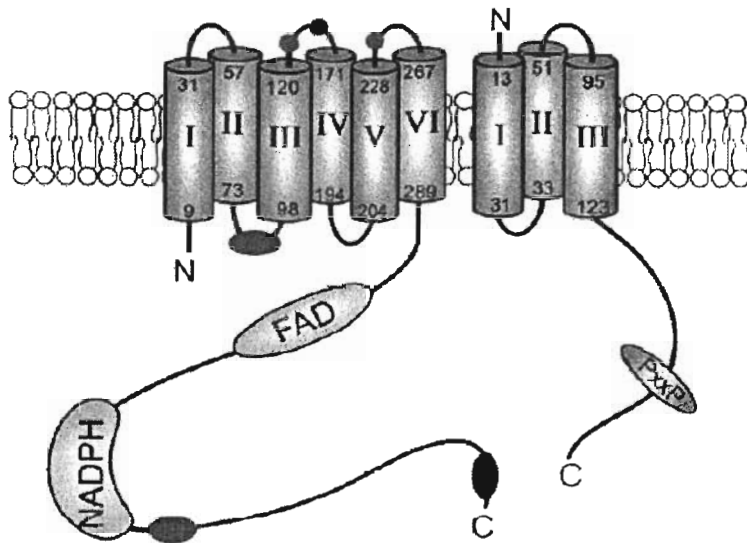


Figura 1. Modelo del citocromo  $b_{558}$ , constituido por las proteínas  $gp91^{phox}$  a la izquierda y  $p22^{phox}$  a la derecha. (Tomado de la referencia 15).

$p22^{phox}$

La proteína  $p22^{phox}$  contiene 195 aminoácidos y una masa molecular de 21.0 kDa, se asocia a  $gp91^{phox}$  en un complejo 1:1<sup>15, 17</sup>. Es la proteína que facilita a través de sus dominios de unión la fijación de los factores proteicos citosólicos. La porción N-terminal presenta tres  $\alpha$  hélices transmembranales, mientras que la porción C-terminal posee una región rica en prolina (PRR) a través de la cual se asocia al dominio SH3 (secuencias que identifican las proteínas específicas que serán reclutadas para los procesos de señalización de  $p47^{phox}$ , una mutación en la prolina 156 ha sido encontrada en CGD (Enfermedad de Granulomatosis Crónica)<sup>18</sup>.

SDS/poliacrilamina muestra una masa de 91 kDa debido a su patrón de glicosilación en residuos de asparragina<sup>2, 19</sup>. El N-terminal comprende 300 aminoácidos los cuales forman seis  $\alpha$  hélices transmembranales, mientras que el C-terminal posee los sitios de unión para FAD y NADPH del lado citoplasmático<sup>11</sup>. Esta subunidad, denominada también Nox 2, contiene los elementos necesarios para la translocación de electrones: dos moléculas de hierro protoporfirina IX (Hem *b*) y los sitios de unión, uno para el FAD y otro para el NADPH<sup>20</sup>.

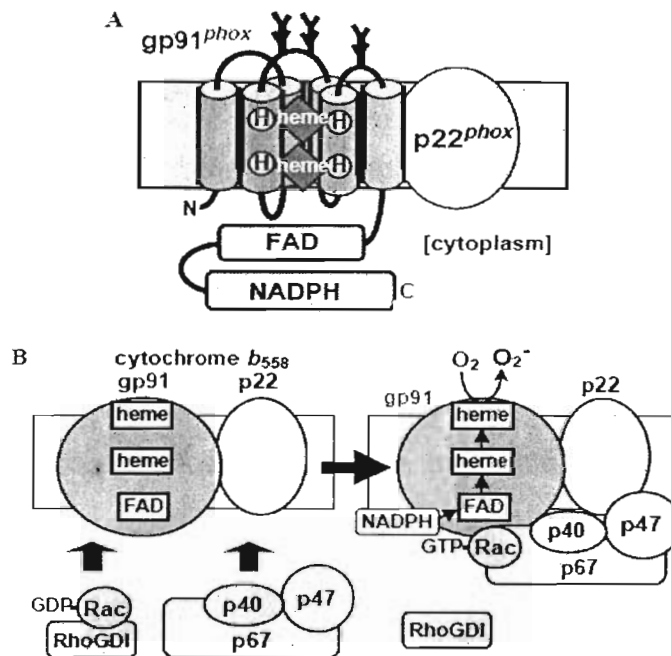


Figura 2. (A) Modelo propuesto para el citocromo *b*<sub>558</sub>, constituido por las proteínas gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>. (B) Formación del complejo activo NADPH oxidasa en el fagocito, el cual incluye las proteínas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y Rac (Tomado de la referencia 23).

### p47<sup>phox</sup>

Es una proteína con 390 aminoácidos y una masa molecular de 44.7 kDa que consiste de un dominio PX, dos dominios de SH3 adyacentes, una región rica en arginina y lisina, un dominio PRR<sup>15</sup> y un dominio de autoinhibición identificado como AIR. Algunos datos sobre los diferentes dominios de p47<sup>phox</sup> muestran que el dominio PX es reconocido por fosfoinosítidos, preferencialmente por el fosfoinosítido PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Con respecto a los dominios SH3, en uno se localizan los sitios de fosforilación para p47<sup>phox</sup> mientras que el otro se une a una región rica en prolina (PRR) de la subunidad p22<sup>phox</sup><sup>11, 21</sup>. Por otro lado, p47<sup>phox</sup> se asocia con el complejo p40<sup>phox</sup>-p67<sup>phox</sup> vía su secuencia PRR con el segundo dominio SH3 de p67<sup>phox</sup>. La región AIR establece una interacción intramolecular que enmascara los sitios de fosforilación en los dominios SH3<sup>22</sup>. El ensamble del complejo NADPH oxidasa se inicia cuando p47<sup>phox</sup> es fosforilado en múltiples serinas, algunas de las cuales se encuentran en AIR. La fosforilación induce un cambio conformacional de esta proteína y expone a los dominios SH3 y PX en un estado accesible a sus blancos de membrana, p22<sup>phox</sup> y fosfoinosítidos respectivamente<sup>15, 23</sup>.

### p67<sup>phox</sup>

Es una proteína de 526 aminoácidos con una masa molecular de 59.8 kDa, al igual que las otras proteínas citosólicas phox, es rica en dominios que involucran interacciones proteína/proteína. Estos incluyen dominios SH3, PRR, TPR (*tetratricopeptido repetido*) y PBI<sup>9</sup>. El reclutamiento de p67<sup>phox</sup> hacia la membrana, depende de su unión a p47<sup>phox</sup>, el cual

como un activador de la oxidasa, ya que a través de sus dominios TPR, PB1 y SH3 del C-terminal interactúa con Rac, p40<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> respectivamente<sup>11, 15, 22</sup>.

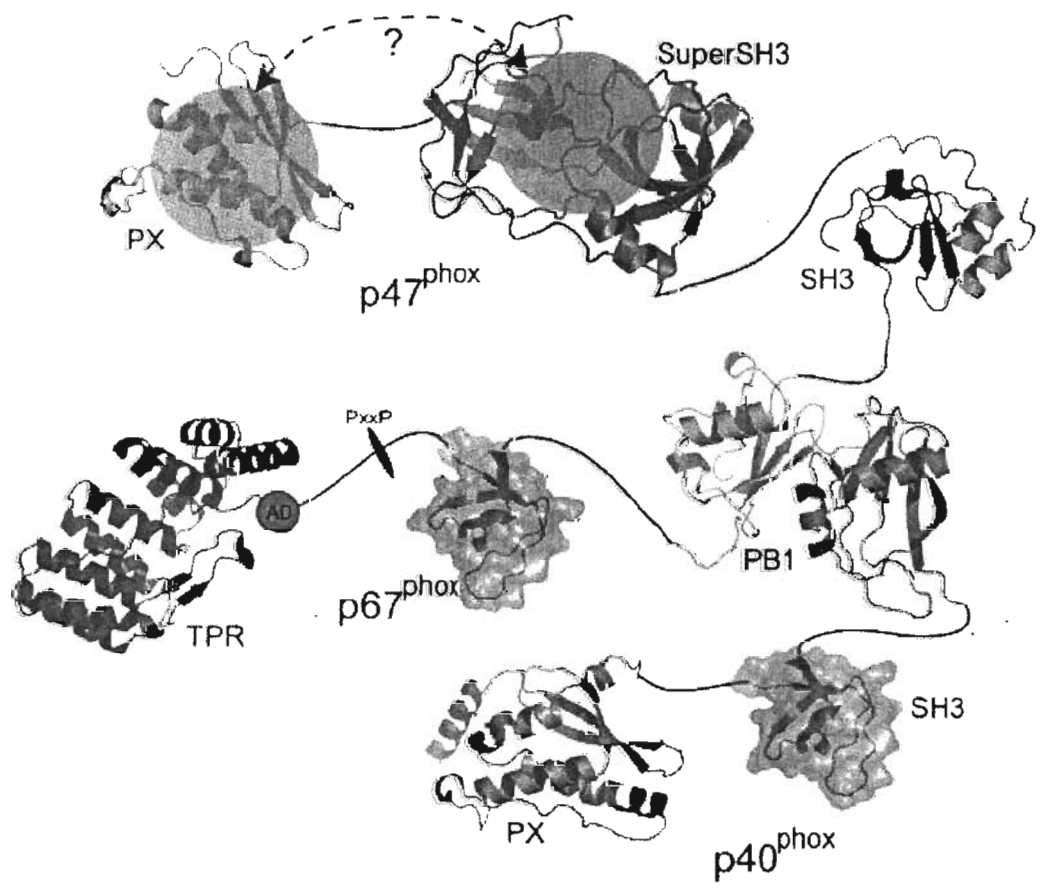


Figura 3. Modelo de interacción proteína-proteína entre p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> (Tomado de la referencia 15).



## p40<sup>phox</sup>

Fue identificada por coimmunoprecipitación y copurificación con p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, es una proteína de 339 aminoácidos con una masa molecular de 39 kDa, posee un dominio PX, un dominio SH3 y un dominio PB1. p47<sup>phox</sup> interactúa con p67<sup>phox</sup> vía su dominio PB1, mientras que su dominio SH3 interactúa con el sitio PRR de p47<sup>phox</sup> <sup>11, 15</sup>. Esta proteína se asocia con p67<sup>phox</sup> en el citoplasma de los fagocitos en reposo y la activación facilita la translocación hacia la membrana tanto de p67<sup>phox</sup> como de p47<sup>phox</sup>, pero no de Rac, por lo que su probable participación en la activación de la oxidasa sería a nivel de regular la migración de p67<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> <sup>21</sup>, sin embargo, su participación en la regulación de la oxidasa aún no ha sido precisada (Figura 3)

## Rac

Después del descubrimiento de p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> se observó que estos constituyentes del sistema NADPH oxidasa, no eran suficientes para reconstituir la actividad de la oxidasa al ser combinados con membranas en un sistema libre de células, por lo que se sugirió que una GTPasa podría jugar un papel en la activación de la NADPH oxidasa, cuando quedó de manifiesto que los nucleótidos de guanina eran capaces de estimular la actividad de la oxidasa <sup>24, 25</sup>. Posteriormente, la GTPasa fue identificada como Rac <sup>11</sup>. Bajo condiciones de reposo, Rac unida a un nucleótido de GDP, forma un heterodímero con una proteína inhibidora de la disociación de guaninas (GDI, por sus siglas en inglés). En la estimulación del fagocito, Rac es liberada de GDI, migra hacia la membrana plasmática y el GDP es

cual es específico para Rac y fundamental para la activación de gp91<sup>phox</sup> 26. Existen varias isoformas de la proteína Rac: Rac1, Rac1b, Rac2 y Rac3, de las cuales, solo Rac1 y Rac2, están involucradas en la activación de oxidasas. Rac2 es expresada solamente en células hematopoyéticas y participa en la activación de la NADPH oxidasa de neutrófilos humanos. Rac1 se expresa en los demás tejidos y activa a las NADPH oxidasas de las células no fagocíticas<sup>24-26</sup>.

#### Familia Nox

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), además de participar de forma regulada en la defensa del huésped en neutrófilos y fagocitos, tal como se describió en párrafos previos, también se localiza en otras estirpes celulares donde recientes observaciones han descrito su formación, a niveles modestos, en respuesta a un estímulo. Por otro lado, la información disponible en la base de datos del genoma humano ha conducido a la identificación de varios homólogos a gp91<sup>phox</sup>, los cuales constituyen en la actualidad la nueva familia de las proteínas Nox<sup>27,28</sup>, agrupados como: Nox 1, Nox 2 (gp91<sup>phox</sup>), Nox 3, Nox 4, Nox 5 y Duox 1 y 2<sup>29</sup> (Figura 4).

Nox 1 fue el primer homólogo reconocido de Nox 2 (gp91<sup>phox</sup>) identificado en tejidos no-fagocíticos, su presencia ha sido reportada en próstata y útero<sup>9</sup>, también en células vasculares del músculo liso y altamente expresada en células epiteliales de colon<sup>30, 31</sup>, este complejo lo integran: la proteína gp91, la cual muestra un 58% de identidad en aminoácidos con Nox 2 así como la proteína p22<sup>phox</sup> y las proteínas citosólicas p67<sup>phox</sup> y

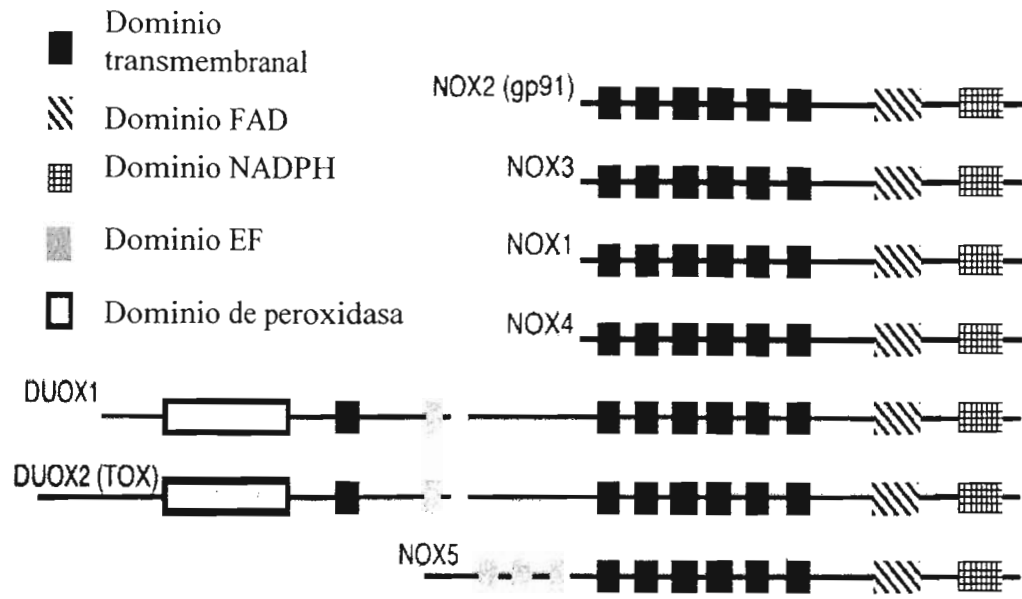


Figura 4. Topología de la familia Nox. Todos los integrantes muestran características en común con aquellas originalmente identificadas como regiones de la oxidasa del fagocito, gp91<sup>phox</sup> (Tomado de la referencia 11).

Nox 3 fue originalmente descrita como una enzima expresada en varios tejidos fetales, tales como hígado, riñón, pulmón y bazo<sup>27-30</sup>. Esta enzima muestra un 58% de identidad con Nox 2, actualmente se sabe que Nox 3 se expresa en el oído interno del ratón y participa en la formación de la otoconia. Nox 3 parece ser constitutivamente activa y forma un complejo funcional con p22<sup>phox</sup>, hasta el momento, no se ha demostrado que requiera de un organizador y un activador (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> respectivamente), no se dispone de suficiente información para aseverar la necesidad o no de la proteína Rac<sup>32</sup> para su funcionamiento.

Nox 4 se encuentra asociada con  $p22^{phox}$  y se sabe muy poco si  $p46^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  y Rac participan en su regulación.

Nox 5 es altamente expresada en linfocitos T y B, también se ha detectado RNAm de esta oxidasa en testículo; sin embargo, no se sabe a ciencia cierta su papel biológico y con respecto a sus características estructurales, es una proteína que está construida sobre la estructura básica de  $gp91^{phox}$ , con la diferencia de que en la extensión N-terminal tiene cuatro sitios de unión para  $Ca^{2+}$  (dominios EF). Nox 5 no forma complejo con  $p22^{phox}$  ni con alguna otra proteína citosólica<sup>23,24,27</sup>.

Duox 1 y 2. Estas proteínas Duox (dual oxidasas) contienen 1551 y 1548 aminoácidos respectivamente y al igual que Nox 5, estas se encuentran construidas sobre la estructura básica  $gp91^{phox}$ , solo que además poseen hacia el N-terminal dos dominios para  $Ca^{2+}$ , otro segmento transmembranal y un dominio con actividad de peroxidasa y no forman complejos con ninguna otra proteína. Estas enzimas se encuentran presentes en los tirocitos y se ha demostrado que Duox 2 es esencial para la síntesis de las hormonas tiroideas, su actividad, parece estar modulada por  $Ca^{2+}$ <sup>20,23</sup> (Tabla 1, Figura 5). Las proteínas Duox son también codificadas por otras especies, tales como *C. elegans*. Se sugiere además, que participan en el proceso microbicida del tracto digestivo bajo<sup>27,29</sup>.

## Enzimas Nox/Duox humanas

Enzima	Altos niveles de expresión	Factores reguladores conocidos
gp91 phox (Nox 2)	Fagocitos	p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> , p40 <sup>phox</sup> y Rac 2
Nox 1	Colon y celulas vasculares	Noxo1, Noxa1, p22 <sup>phox</sup> y Rac
Nox 3	Hígado y riñón fetal	p22 <sup>phox</sup>
Nox 4	Riñón, osteoclastos, ovario, ojo, adipocitos	p22 <sup>phox</sup>
Nox 5	Bazo, testículo, glándulas mamarias y cerebro	Calcio
Duox 1	Tiroides, cerebelo y pulmón	Calcio
Duox 2	Tiroides, colon, islotes pancreáticos y próstata	Calcio

Tabla 1. Distribución de la familia Nox (Tomado de referencias 15 y 23).

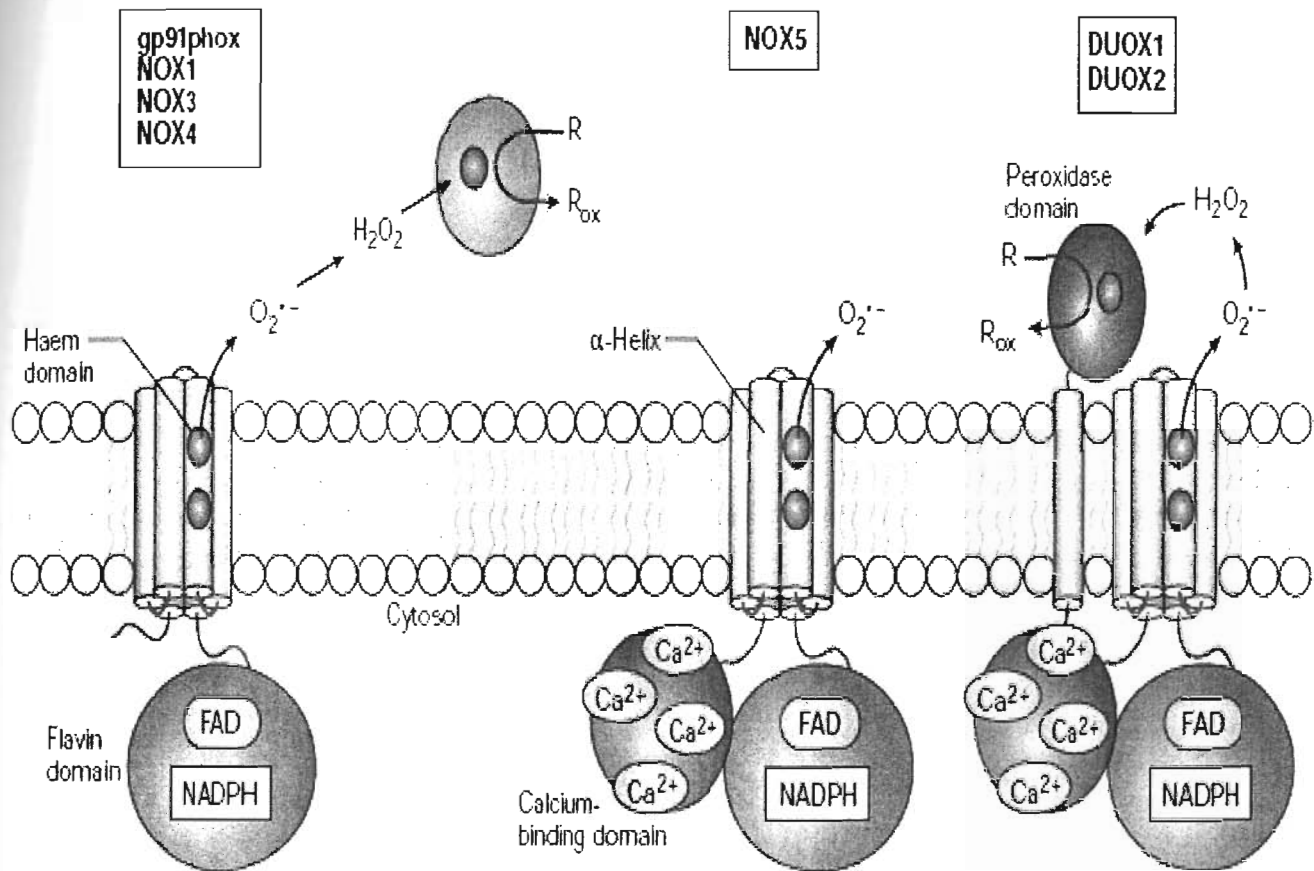


Figura 5. Modelo que representa la topología de las enzimas Nox y Duox (Tomado de referencia 12).

## ANTECEDENTES

La producción de ROS en células no fagocíticas ha sido relacionada con procesos mitogénicos y cancerígenos<sup>34, 35</sup>, incluso se ha observado un incremento en los niveles de ROS en células cancerígenas<sup>36</sup>, también se les ha asociado a la regulación de genes participantes en el crecimiento celular<sup>37</sup>, por ejemplo se ha observado en células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un aumento en sus procesos proliferativos<sup>38</sup>. Por otro lado, en la enfermedad de Alzheimer, la cual se caracteriza por demencia y pérdida progresiva de las neuronas, se observan depósitos de fibrillas β-amiloideas las cuales han mostrado en estudios *in vitro* que activan una NADPH oxidasa en monocitos, neutrófilos y microglia<sup>39</sup>, así mismo, Shimohama *et al*<sup>40</sup>, demuestran que en la enfermedad de Alzheimer, los factores citosólicos p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> se expresan en la microglia y son translocados hacia la membrana plasmática. En células de la pared vascular, también se forman ROS derivados del anión superóxido, los cuales son generados ya sea por Nox 1, Nox 2 o Nox 4, y que han sido responsabilizadas del desarrollo de lesiones ateroscleróticas, hipertensión y diabetes<sup>41</sup>. Una molécula que podría estar ligada a estos procesos es la angiotensina II, la cual, vía sus receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> promueve la fosforilación de residuos de serina de la p47<sup>phox</sup>, y por consiguiente, su translocación hacia la membrana plasmática ocasionando la activación de una Nox en este tipo de células<sup>42</sup>. Así mismo, se ha reportado que células vasculares de músculo liso y fibroblastos aumentan sus niveles de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> cuando son expuestas a una dosis de 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugiriendo que el peróxido de hidrógeno estimula una Nox y que por lo tanto, una sobreproducción de ROS, es el factor que ocasiona el daño celular<sup>43</sup>. El hígado es un órgano bien equipado en términos de su sistema antioxidante, sin embargo se ha sugerido que las moléculas reactivas originadas por estados de estrés oxidativo juegan un papel patogénico en las enfermedades hepáticas crónicas, un ejemplo de ello es la

fibrosis hepática, en donde uno de los factores desencadenantes es el consumo crónico de etanol, debido a que durante su metabolismo se observa un aumento en los niveles de ROS, los cuales han sido considerados como los mediadores responsables de la fibrosis<sup>44</sup>. Al respecto, Wheeler *et al*<sup>45</sup> reportan que los ROS producidos durante la intoxicación con etanol activan al NFκB ocasionando un incremento en la producción de TNFα causando la muerte celular y que estos oxidantes son generados por una Nox de las células de Kupffer. En el mismo sentido, Kono *et al*<sup>46</sup>, encontraron que la administración de difenileneiodonium (DPI) a ratas intoxicadas con etanol previno el daño hepático que este último ocasiona, sugiriendo que una Nox podría ser estimulada por el propio etanol. Por otro lado se reporta que las células estelares hepáticas contienen una NADPH oxidasa, la cual es activada por citoquinas liberadas durante la reparación del tejido lesionado y que esta Nox es la responsable del incremento en las acciones fibrogénicas de las células estelares y por lo tanto de la fibrosis hepática<sup>47</sup>. Otro dato que sugiere la participación de una Nox en la generación de ROS en el hígado durante la intoxicación con etanol es el reportado por Castrejon *et al*<sup>48</sup>, quienes observaron que la adrenalina, por sí misma, estimula la producción de radicales OH• a través de la activación de su receptor α<sub>1B</sub> en hepatocitos aislados de rata. También reportan un incremento significativo en los niveles de OH• en los hepatocitos incubados con etanol. Sin embargo, cuando los autores incuban hepatocitos en presencia de etanol más adrenalina, se observa un efecto aditivo sobre la producción de OH•, situación que podría exacerbar el efecto tóxico del etanol, de manera similar a la demostración experimental de que el efecto hepatotóxico del CCl<sub>4</sub>, acetaminofen y metilfenidato es mayor al administrar agonistas adrenérgicos<sup>49</sup>. De igual manera, el efecto que la adrenalina tiene sobre la producción de ROS también fue observado en células endoteliales de arterias coronarias, en donde la adrenalina a concentraciones



micromolares estimula la producción de  $O_2^{\bullet-}$  <sup>50</sup>, en el mismo sentido se tienen los datos reportados por Bleeke *et al* <sup>51</sup>, quienes demuestran que la fenilefrina incrementa la expresión de  $p47^{phox}$  en células vasculares de músculo liso, de ahí que el efecto reportado por Castrejón *et al*, bien podría ser el resultado de la estimulación de un sistema generador de ROS ubicado en la membrana plasmática del hepatocito, posiblemente una Nox, la cual responde a la adrenalina liberada bajo condiciones de estrés. Adicionalmente se ha reportado que los hepatocitos expresan RNAm para Nox 1, Nox 2 ( $gp91^{phox}$ ), Nox 4, Duox 1 y 2, así como para la subunidad reguladora  $p47^{phox}$  <sup>52</sup>. Nox 2 y  $p47^{phox}$  también fueron identificadas a nivel de proteína <sup>53</sup>. En consecuencia, estos datos nos sugieren que un sistema de NADPH oxidasa presente en células no fagocíticas podría estar involucrado directamente en procesos de señalización celular y que la actividad de esta enzima responde a diferentes agonistas, entre ellos, a la adrenalina.

Se sabe que la adrenalina es una hormona que actúa a través de receptores de superficie de membrana plasmática, estos receptores pertenecen a la superfamilia de “receptores acoplados a proteínas G” (GPCR, por sus siglas en inglés). Por medio de estudios farmacológicos y con radioligandos se demostró la existencia de distintos subtipos de receptores adrenérgicos, clasificados como:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  <sup>54</sup>.

Los receptores  $\alpha_1$  median su respuesta celular a través del recambio de fosfoinsítidos y la movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico vía la proteína  $G_{q/11}$  <sup>55</sup>, mientras que los receptores  $\alpha_2$  inhiben la actividad de la enzima adenilato cilcasa al activar la proteína  $G_i$  <sup>56</sup>. Contrario a los receptores  $\alpha_2$ , los receptores  $\beta$  al ser estimulados por su agonista, estimulan la actividad de la enzima adenilato cilcasa, vía una proteína  $G_s$  <sup>54</sup>. El uso de ligandos con actividad selectiva para los receptores adrenérgicos, tales como los antagonistas prazosina ( $K_i = 0.56$  nM), yohimbina ( $K_i = 0.42$  nM), rauwolscina ( $K_i = 0.66$  nM), y

porpanolol ( $K_i = 0.38 \text{ nM}$ ), nos permite distinguir la participación de los receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\beta$  respectivamente, en la regulación de un proceso metabólico<sup>57</sup>.

Con relación al efecto que posee la adrenalina sobre la producción de  $\text{OH}\cdot$  en los hepatocitos aislados reportado por Castrejón *et al*<sup>48</sup> se sugiere al  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fuente de éste radical libre, por lo que nuestro grupo de trabajo realizó varios ensayos experimentales para explorar la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimulada por adrenalina en hepatocitos aislados de rata. Sin embargo, no fue posible detectar la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células completas, debido a su capacidad antioxidante, por lo que se recurrió a un modelo de membrana plasmática obtenida del hepatocito aislado. De lograrse la detección de un sistema de Nox y la generación de ROS en la preparación de membranas podría disponerse de un excelente instrumento de estudio, debido al antecedente de que al activarse un receptor de superficie de membrana plasmática (adrenoreceptor) en presencia de su agonista (adrenalina) se sintetizan ROS de manera dosis-dependiente. Por otro lado, es importante señalar que la literatura no reporta evidencias experimentales sobre la caracterización funcional, molecular y posible mecanismo de regulación de un sistema proteico generador de  $\text{O}_2\cdot^-$  y su producto de dismutación, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a nivel de membrana plasmática en el hepatocito, por lo que es de gran importancia fisiológica, dilucidar el origen de estas especies de oxígeno reactivas y su mecanismo de regulación en tejidos no fagocíticos como el hígado.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar funcional y molecularmente el sistema de NADPH oxidasa presente en membrana plasmática del hepatocito, con la finalidad de explorar su posible participación en los procesos de señalización celular.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar funcionalmente el sistema generador de ROS ( $O_2^{\bullet-}$  /  $H_2O_2$ ) dependiente de NADPH en membrana plasmática del hepatocito.
2. Explorar la participación de la adrenalina sobre la activación de una NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito.
3. Identificar la isoforma de NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito que eventualmente responda a la adrenalina.
4. Identificar los componentes proteicos que integran el sistema de NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito.

## HIPÓTESIS

Una isoforma de NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito al ser activada mediante la estimulación de receptores acoplados a proteínas G por la adrenalina, eleva la poza de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ .

## MATERIAL Y METODOS

### Reactivos

MES [2-(N-moepholino)ethanesulfonic acid],  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ , KCl,  $NaHCO_3$ , MOPS [4-morpholinepropanesulfonic acid],  $GTP\gamma S$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaN_3$ , FAD, NADPH, ácido tricloroacético, difenileneidonium (DPI), ATP, NADH, citocromo *c*, adrenalina, prazosina, yohimbina, rauwolscina, propanolol , colagenasa tipo IV y albúmina bovina sérica fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA. Inhibidores de proteasas de MP Biochemicals, Inc. Solon, OH, USA; los anticuerpos fueron de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

### Material biológico

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Con base a los datos experimentales, se decidió alojarlas en el laboratorio durante una semana previa al experimento a una temperatura controlada de 20° C, colocadas por parejas en jaulas de plástico de 20 cm x 30 cm y cama de mascotas “celulosa vegetal” granulada, alimentadas *ad limitum* con alimento Nutrition Zeigler: Laboratory Animal (Zeigler. Gardners, P.A. 17324 USA) y libre acceso al agua.

Los animales utilizados en este trabajo fueron mantenidos de acuerdo a los lineamientos para el Uso y Cuidad de los Animales (NOM 062-Z00-1999, SAGARPA, México) y los diferentes protocolos de estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de la UNAM, Facultad de Medicina.

### Aislamiento de células hepáticas

Los animales fueron anestesiados con éter y obtenidas las células hepáticas por el método de Berry y Friend<sup>58</sup> y modificado por Guinzberg *et al*<sup>59</sup>. Brevemente, se disecciona el hígado y a través de la vena porta es perfundido con una solución Ringer-Krebs-Bicarbonato (120 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>) libre de Ca<sup>2+</sup> a 37°C y pH 7.4. Una vez que el hígado ha sido perfundido en su totalidad, se recircula con una solución de Colagenasa IV al 1% en Ringer-Krebs-Bicarbonato, libre de Ca<sup>2+</sup>, por 10 min aproximadamente. Posteriormente se coloca el hígado en una caja de Petri de plástico en donde se separa el paquete celular del parénquima hepático. El paquete celular se hace pasar por una malla de nylon. Lo filtrado es recuperado en un tubo de plástico, el cual es resuspendido en Ringer-Krebs-Bicarbonato (20 ml aproximadamente) libre de Ca<sup>2+</sup> y se centrifuga a 2500 rpm por 1 min, se deshecha el sobrenadante y el precipitado lo constituyen las células hepáticas aisladas. La viabilidad celular es determinada por la prueba de exclusión de tripan; los experimentos fueron realizados cuando al menos el 90% de las células excluyó el colorante.

### Obtención de hepatocitos por elutriación

El precipitado de células hepáticas aisladas, obtenidas a partir del hígado de una rata, es resuspendido en 40 ml de solución Ringer-Krebs-Bicarbonato libre de Ca<sup>2+</sup>. De esta suspensión se toman 5 ml (5 x 10<sup>6</sup> células aproximadamente), los cuales son inyectados en un “contenedor” del equipo de elutriación. En resumen, la muestra se hace llegar a través de un sistema de mangueras de tygon a la “cámara de separación de células” localizada en el rotor (Elutriador JE-6B, Beckman) de elutriación. La velocidad a la cual fluye la muestra está regulada por una bomba peristáltica y es calculada, según el tamaño de la célula. Para hepatocitos, la velocidad de flujo es de 30 ml / min y la

velocidad de centrifugación es de 800 rpm (Centrifuga J2-21, Beckman). Cuando se alcanza un equilibrio entre la velocidad de flujo y la velocidad de centrifugación, se separan los hepatocitos, los cuales son recolectados en tubos de plástico. Se recolecta un volumen total de 90 ml (30 ml por min), esta muestra se centrifuga a 2500 rpm por 1 min, se deshecha el sobrenadante y el precipitado (hepatocitos) se resuspende en 10 ml de Ringer-Krebs-Bicarbonato libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH 7.4. Se toma una alícuota ( $20 \times 10^3$  células), para determinar la viabilidad de los hepatocitos por medio de la técnica de exclusión de azul de tripán. En este trabajo se determinó la pureza celular de la muestra con técnicas inmunohistoquímicas, para ello se usaron los anticuerpos contra CD95 como marcador de células de Kupffer y el anticuerpo contra el factor von Willerbran para las células endoteliales, los resultados mostraron un 99% de pureza para hepatocitos, este dato, coincide con lo reportado en la literatura<sup>60,61</sup> y fue corroborado con estudios histopatológicos (datos no mostrados).

#### Lisis celular

Los hepatocitos obtenidos por elutriación y resuspendidos en 10 ml de Ringer-Krebs-Bicarbonato libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH 7.4, fueron homogenizados en un homogenizador Potter Elvehem durante 2 min a 4° C y después se sometieron a un proceso de lisis celular por choque osmótico con 100 ml de un amortiguador hipotónico denominado Buffer de Lisis, el cual contiene 20 mM de MES (2-[N-ácido morfolino] etanosulfónico), pH 5.8, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1mM de  $\text{CaCl}_2$ , 5mM de KCL, más 1 ml de una mezcla de inhibidores de proteasas (40 mg AEBSF, 100  $\mu\text{g}$  de leupeptina, 100  $\mu\text{g}$  de pepstatina A). La lisis fue completada con agitación vigorosa por 5 min.

## Obtención de membranas plasmáticas de hepatocitos

A partir del lisado celular se procedió con la obtención de membranas plasmáticas de hepatocitos, de acuerdo con el protocolo de centrifugación representado en la Figura 6, en donde, en el precipitado 3 encontramos la muestra de membranas plasmáticas. Para corroborar el enriquecimiento de las membranas plasmáticas en la muestra se ensayaron las actividades catalíticas de enzimas localizadas exclusivamente en cada una de las siguientes membranas presentes en la célula: para monitorear la membrana plasmática se usó la enzima 5'nucleotidasa<sup>62</sup>, para la membrana mitocondrial a la succinato deshidrogenasa<sup>63</sup> y la glucosa 6-fosfatasa para la membrana microsomal<sup>64</sup>. Los resultados de la actividad específica y actividad total de estas enzimas, se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Al comparar los valores de actividad específica del lisado celular con el precipitado 3 se observa un incremento en la actividad específica de la enzima 5'nucleotidasa (indicador de membrana plasmática) y un 25% de recuperación de la actividad total (Tablas 2 y 3). Por el contrario, para las enzimas glucosa 6-fosfatasa, de retículo endoplásmico y succinato deshidrogenasa de membrana mitocondrial disminuyó su actividad específica con un porcentaje de recuperación del 5% o menos para el precipitado 3, lo que nos demuestra que la fracción 3 es una muestra enriquecida de membranas plasmáticas de hepatocitos.

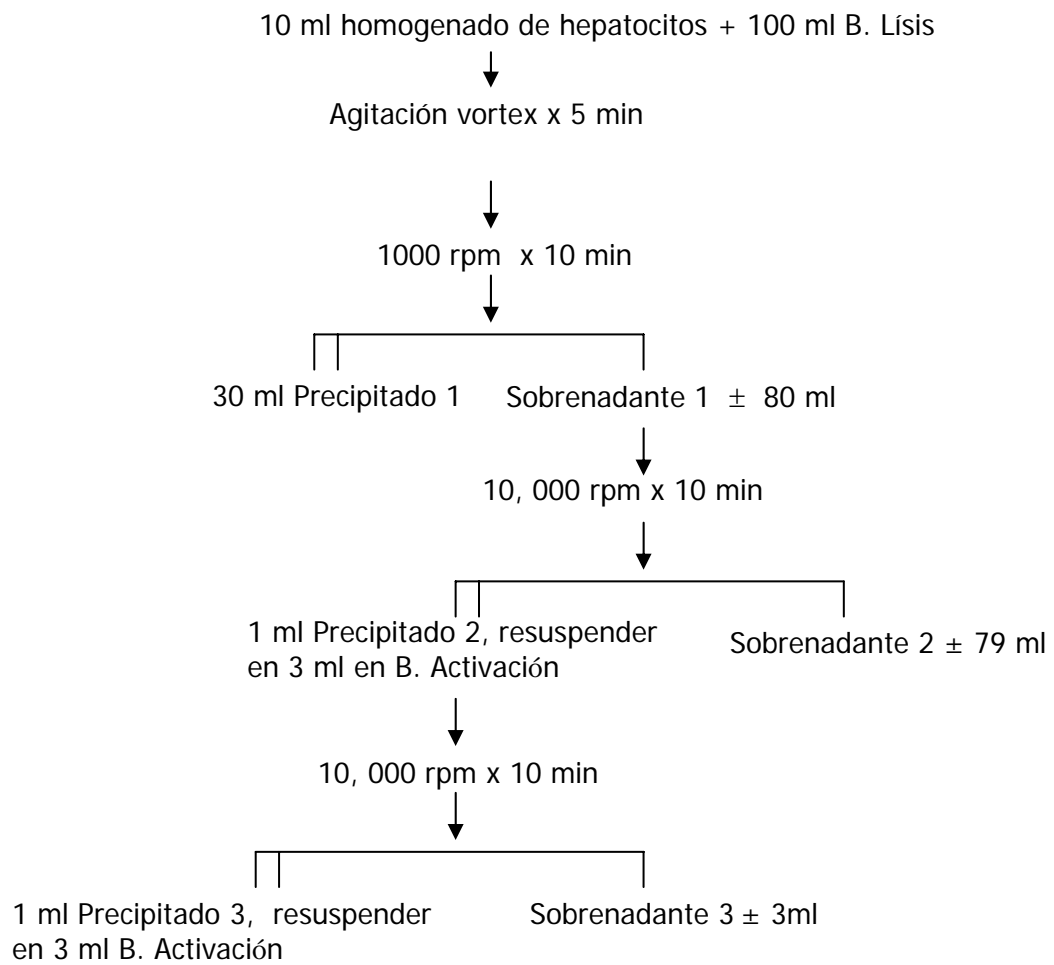


Figura 6. Protocolo para preparar membranas plasmáticas de hepatocitos.



Fracción	5'nucleotidasa $\mu\text{mol} / \text{mg} \times \text{min}^{-1}$	Glucosa 6-Pasa $\mu\text{mol} / \text{mg} \times \text{min}^{-1}$	Succinato deshidrogenasa $\mu\text{mol} / \text{mg} \times \text{min}^{-1}$
Lisado celular	$246.0 \pm 6.0$	$0.119 \pm 0.015$	$0.042 \pm 0.009$
Precipitado 1	$165.0 \pm 1.0$	$0.078 \pm 0.008$	$0.008 \pm 0.0001$
Sobrenadante 1	$62.0 \pm 4.0$	$0.056 \pm 0.009$	$0.008 \pm 0.001$
Precipitado 2	$196.0 \pm 8.0$	$0.124 \pm 0.019$	$0.015 \pm 0.004$
Sobrenadante 2	$62.0 \pm 4.4$	0.0	$0.017 \pm 0.003$
Precipitado 3	$3454.0 \pm 50.0$	$0.07 \pm 0.009$	$0.006 \pm 0.001$
Sobrenadante 3	$65.0 \pm 4.6$	0.0	0.0

Tabla 2. Actividad específica de enzimas marcadoras.

Fracción	5'nucleotidasa $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$	Glucosa 6-Pasa $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$	Succinato deshidrogenasa $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$
Lisado celular	$11.7 \pm 0.26$	$6.0 \pm 0.06$	$2.20 \pm 0.4$
Precipitado 1	$4.8 \pm 0.08$	$6.3 \pm 0.45$	$0.40 \pm 0.08$
Sobrenadante 1	$1.0 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.7$	$0.24 \pm 0.07$
Precipitado 2	$0.046 \pm 0.02$	$0.7 \pm 0.2$	$0.03 \pm 0.009$
Sobrenadante 2	$0.9 \pm 0.06$	0.0	$0.10 \pm 0.02$
Precipitado 3	$3.0 \pm 0.08$	$0.3 \pm 0.05$	$0.06 \pm 0.027$
Sobrenadante 3	$0.03 \pm 0.005$	0.0	0.0

Tabla 3. Actividad total de enzimas marcadoras.

A pesar del bajo rendimiento de membranas plasmáticas obtenidas con este protocolo, se decidió utilizar al precipitado 3 como una fuente de NADPH oxidasa, además de ser un método simple, fácil y reproducible.

Es importante aclarar que en algunos experimentos el precipitado 3 fue obtenido directamente de las células hepáticas aisladas, a esta muestra se le identificó como membranas plasmáticas de células hepáticas (MPCH). En otro grupo de experimentos, el precipitado 3 fue obtenido de una muestra de células hepáticas aisladas que se sometió al proceso de elutriación, a esta muestra se le identificó como membranas plasmáticas de hepatocitos (MPH).

## Activación de la enzima NADPH oxidasa

Inicialmente, la muestra de MPCH suspendidas en el amortiguador de catálisis en presencia de FAD y NADPH no registró actividad catalítica, razón por la cual, se consideró la posibilidad de que la enzima responsable de la generación de ROS en la membrana plasmática de hepatocitos se encontrara en un estado de reposo de manera similar a como se mantiene la Nox 2 en ausencia de fagocitosis. Se procedió a buscar un procedimiento de activación que fuera equivalente al de la fagocitosis, para ello se adaptó la estrategia de activación de una NADPH oxidasa de adipocitos humanos<sup>65</sup> y se utilizó al manganeso como un activador del sistema de oxidación del NADPH<sup>66</sup>, a través de la activación de las proteínas G<sup>67</sup>, posiblemente asociadas a alguna isoforma de la Nox.

Luego de varios ensayos en los que se exploró la presencia o ausencia de iones como el  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en el medio de incubación, se llegó a un amortiguador que favoreció la actividad óptima de la enzima, a este medio se le identificó como amortiguador de activación, el cual contiene: 120 mM de NaCl, 1.4 mM de  $CaCl_2$ , 10 mM de  $NaHCO_3$ , disueltos en 30 mM de MOPS (3-[N-ácido morfolino] propanolsulfónico) ajustado a pH de 7.4. Brevemente, 20  $\mu g/ml$  de proteína de la muestra de MPCH o MPH fueron resuspendidos en 1 ml del amortiguador de activación, incubados por 2 min a 37° C y suplementado con 3mM de  $MnCl_2$  o 1 $\mu M$  de adrenalina más 10 $\mu M$  de GTP $\gamma$ S (análogo no hidrolizable del GTP) y 1  $\mu M$  de antagonistas adrenérgicos (prazosina, yohimbina, rauwolscina, propanolol), según el protocolo. La etapa de activación finalizó con una centrifugación de 10,000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla (membranas plasmáticas) fue utilizada para determinar la actividad catalítica de la enzima. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford<sup>68</sup>.

### Actividad catalítica de la enzima NADPH oxidasa

Después de varios experimentos en los cuales se investigó el medio de incubación, tiempo y temperatura de incubación para la etapa de catálisis, se obtuvieron las condiciones óptimas para la actividad catalítica de la enzima. Después de la etapa de activación, las membranas plasmáticas fueron resuspendidas en 540  $\mu$ l del amortiguador de catálisis (120 mM de NaCl, 1.2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM de  $\text{NaN}_3$  y 100  $\mu$ M de FAD disueltos en 20 mM de MES, pH 6.0) e incubadas por 4 min a 37° C. La reacción enzimática se inició al adicionar a la mezcla anterior, 60  $\mu$ l de 0.25 mM de NADPH disuelto en buffer de catálisis y se terminó por la adición de 1.5 mM de ácido tricloroacético. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue usado para medir la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  vía la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Determinación de $\text{H}_2\text{O}_2$

Al sobrenadante obtenido en la etapa de catálisis se le adicionan 200  $\mu$ l de sulfato ferroso amoniacal [10 mM] y 100  $\mu$ l de tiocianato de potasio [2.5 M], se agita mecánicamente y se lee a 480 nm. El principio de esta técnica<sup>69</sup> se basa en la oxidación del hierro por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado en un medio ácido, así, el hierro oxidado se combina con el tiocianato de potasio y se genera ferritiocianato, que se detecta en el espectrofotómetro. Por lo tanto, la cantidad de ferritiocianato formado es proporcional a la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente en el sobrenadante. Por la sencillez de esta técnica y la reproducibilidad de los datos, decidimos utilizar este indicador como un marcador de la oxidación del NADPH por la enzima NADPH oxidasa, en todos los experimentos.

## Determinación de $O_2^{\bullet-}$

La producción de  $O_2^{\bullet-}$  dependiente de NADPH fue confirmada por medio del uso del ferricitocromo *c*, el cual se agregó en la etapa de catálisis previo a la adición de NADPH, con el objetivo señalado por Allen<sup>70</sup> de que una vez iniciada la reacción el  $O_2^{\bullet-}$  formado fuera atrapado por el ferricitocromo *c* y se transformara en ferrocitocromo *c*. De esta forma se evitaría la formación de  $H_2O_2$ .

## Análisis de Western blot

La confirmación de la presencia de las proteínas Nox y de las subunidades  $p22^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  y Rac en la membrana plasmática de los hepatocitos se realizó mediante la técnica de Western blot<sup>71</sup>. Para ello, se emplearon anticuerpos primarios policlonales que reconocen a éstas proteínas, los cuales fueron obtenidos de una fuente comercial (Santa Cruz Biotechnology). Para la detección de los anticuerpos primarios se usaron anticuerpos conjugados a peroxidasa (anticuerpos secundarios) adquiridos de la misma marca comercial. El revelado se llevó a cabo por medio de quimioluminiscencia. Las membranas plasmáticas de los hepatocitos fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida), transferidas a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) y analizadas con los anticuerpos.

La muestra de membrana plasmática de hepatocito (MPH) preservada a  $-70^\circ C$ , o recién obtenida, es centrifugada a 10 000 rpm por 5 min, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 500  $\mu l$  de la solución de lisis (PBS 1X, NP40 1%, EDTA 1mM, PMSF 1mM) a la cual se le adiciona 10  $\mu l$  de inhibidores de proteasas. A esta mezcla se le determina su concentración proteica y con base a este dato, se toma el volumen de muestra de MPH que contenga 60  $\mu g$  de proteína, este volumen será aplicado a cada uno de los carriles del gel, según el protocolo que se indica en cada

figura, así como un marcador de peso molecular y los respectivos controles. Los geles de poliacrilamida discontinuos desnaturalizantes fueron hechos al 7% para la proteína gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, Nox 1 y Nox 4, al 15% para las proteínas p22<sup>phox</sup> y Rac y al 10% para p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>. La separación electroforética de las proteínas se realizó a una corriente constante de 40 miliamperes, cuando la banda de las proteínas llega a 5 mm aproximadamente del borde inferior del gel (frente del gel), se detiene la electroforesis y el gel es llevado al proceso de transferencia. La transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida a membranas de PVDF se lleva a cabo a 100 miliamperes (3 horas aproximadamente), al finalizar la transferencia, se deshecha el gel de poliacrilamida y sobre la membrana de PVDF se identifica y se recorta cada uno de los carriles a donde se transfirió la muestra de MPH, el marcador de peso molecular y los controles respectivos. Las tiras de cada carril se lavan en TBS-Tween y se bloquean con leche 5% (Difco™ SkimMilk) en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavan las membranas de PVDF y se incuban en presencia del anticuerpo primario correspondiente (anticuerpo vs gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac, Nox 1 y Nox 4) en TBS-Tween con leche al 1% en agitación continua a 4°C durante 12 hrs. Una vez transcurrido este tiempo de incubación, las membranas de PVDF se lavan varias veces con TBS-Tween y se incuban en TBS-Tween en presencia del anticuerpo secundario (anti IgG de conejo-HRP 1:5000 o anti IgG de cabra-HRP 1:5000) por 1 hr en agitación continua y a temperatura ambiente, finalmente, al terminar el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, las membranas de PVDF son dispuestas para el proceso de revelado.

Las diluciones usadas del anticuerpo primario fueron de: 1:250 gp91<sup>phox</sup>, 1:100 para Nox 1, Nox 4 y p40<sup>phox</sup>, 1:200 para p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y Rac. Por otro lado y con la finalidad de probar la presencia de algunas proteínas del complejo Nox, se aplicó una

muestra de extracto de hepatocitos (identificada en el gel como HE). Además, como control positivo se usó un extracto de la línea celular de leucemia monocítica THP-1 (identificada en el gel como T) que contiene las proteínas gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y Rac.

#### Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  error estándar (ES). Se aplicó la prueba de *t* de student para realizar el análisis comparativo de los datos, considerando una  $P < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

En esta sección se presenta gráficamente los datos obtenidos de diferentes protocolos de investigación, los cuales fueron conducidos para caracterizar funcional y molecularmente la enzima NADPH oxidasa del hepatocito de rata, conforme al objetivo general.

Las figuras 7 a la 11 responden al primer objetivo específico: Caracterizar funcionalmente el sistema generador de ROS ( $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ ) dependiente de NADPH en membrana plasmática del hepatocito. Los datos mostrados en la Figura 7, son los representativos de varios experimentos, los cuales nos permitieron obtener las condiciones óptimas para la activación y la actividad catalítica de un sistema enzimático generador de  $H_2O_2$  presente en membrana plasmática de hepatocitos. En los paneles A y B, se muestra el pH óptimo para la actividad de la enzima en la etapa de activación (panel A, pH 7.4) y en la etapa de catálisis (panel B, pH 6.0). Los tiempos de incubación para la actividad óptima de la enzima en las etapas de activación y catálisis fueron de 2 y 4 minutos respectivamente (panel C), al respecto es importante resaltar que la etapa de activación es un requisito previo a la catálisis, ya que cuando la muestra se incuba en presencia de NADPH sin una previa exposición con el activador o agonista específico del sistema no se detecta producción de  $H_2O_2$ . Para la concentración de proteína (panel D) se seleccionó un punto que estuviera en la sección lineal de la curva (20  $\mu$ g/ml de proteína). Una vez establecidas las condiciones óptimas para medir la activación y la actividad de la enzima (pH, concentración de proteína y tiempos de incubación) se procedió a dilucidar funcional y molecularmente el sistema generador de  $H_2O_2$  presente en membrana plasmática de hepatocitos de rata. A continuación se describen los resultados obtenidos.

El  $Mn^{2+}$  estimuló de manera dosis dependiente, la actividad catalítica de la Nox, la cual se observa como un incremento en la formación de  $H_2O_2$  (Figura 8). A partir de estos datos, se utilizó una concentración no fisiológica de  $Mn^{2+}$  (3 mM), para activar el sistema, como ha sido descrito por otros investigadores<sup>65,66</sup>.

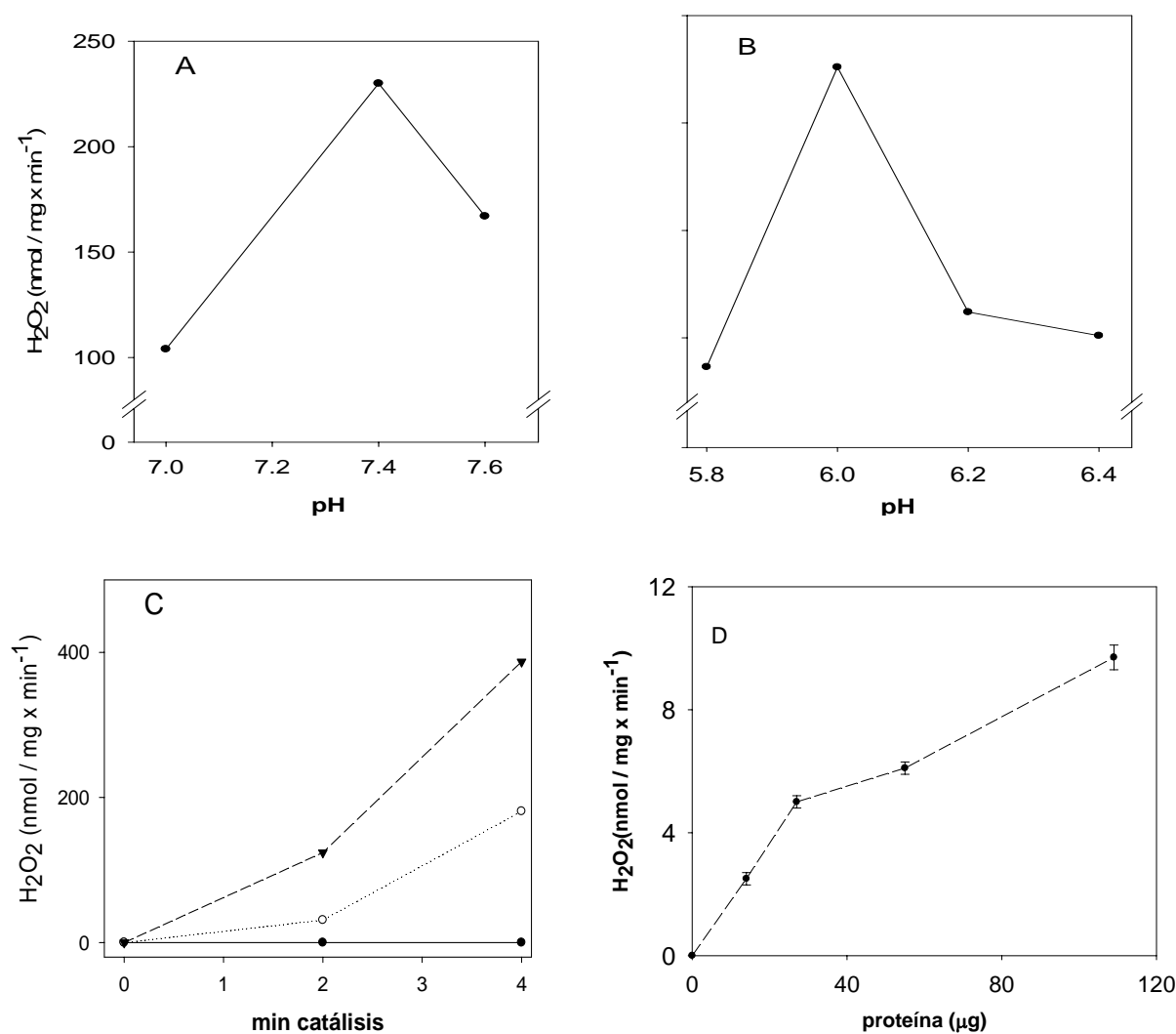


Figura 7. Condiciones experimentales básicas para la producción de  $H_2O_2$  por una NADPH oxidasa, presente en MPCH. A) pH de activación. B) pH de catálisis. C) Reacción enzimática en función del tiempo de activación: 0 min (●), 1 min (○), 2 min (▲) y tiempo de catálisis. D) Concentración de proteína.



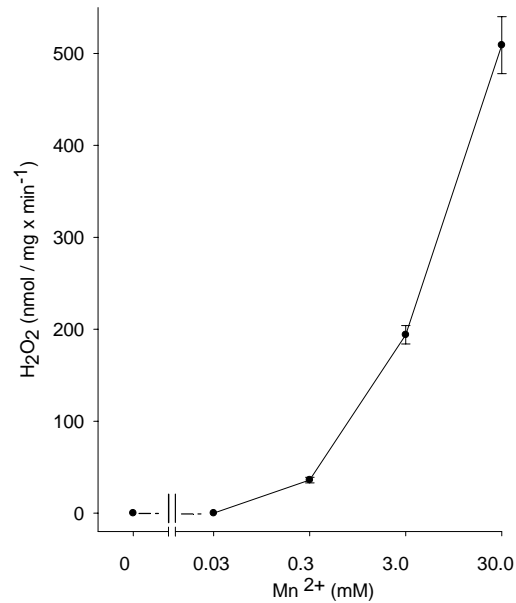


Figura 8. Efecto de la concentración de  $Mn^{2+}$  sobre la generación de  $H_2O_2$  dependiente de NADPH en membranas plasmáticas de células hepáticas (MPCH). Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

En la Figura 9 se demuestra que en presencia de un atrapador de radicales  $O_2^{\bullet-}$ , tal como es el ferricitocromo *c*, disminuye la posibilidad de sintetizar  $H_2O_2$ . Al ocurrir una menor generación de  $H_2O_2$  en función de las dosis crecientes del atrapador permite concluir que el primer producto de la actividad enzimática corresponde precisamente al radical  $O_2^{\bullet-}$ . Esta es una prueba adicional de que la enzima con la que estamos trabajando es una NADPH oxidasa.

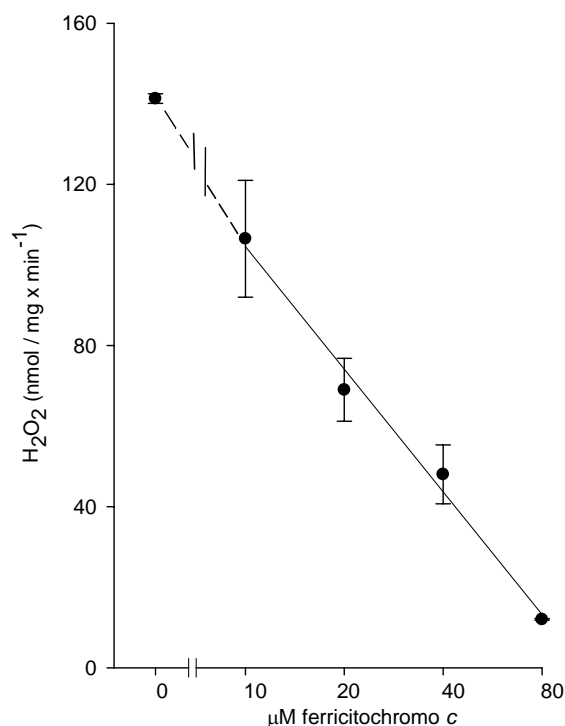


Figura 9. Efecto de la concentración del ferritocromo *c* sobre la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de NADPH en MPCH, en presencia de 3mM de Mn<sup>2+</sup>. Los valores son el promedio ± ES de tres experimentos independientes.

En otra serie de experimentos, se exploró la especificidad del sustrato y la afinidad de la enzima por el mismo. En la Figura 10 se presenta la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la muestra de MPCH en presencia de Mn<sup>2+</sup> como activador del sistema más dos fuentes posibles de electrones para la síntesis de ROS. Se observa que cuando el NADH está presente en concentraciones hasta 1 mM no se sintetiza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo que el NADH no es un donador de electrones para éste sistema; sin embargo, cuando se ensayó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de NADPH se observa una afinidad de la enzima por el NADPH, además, la enzima se comporta frente a su sustrato con una cinética de Michaelis en la cual, el valor de 0.5 V<sub>max</sub> fue de 44 μM. Con base en estos datos se decidió utilizar una concentración final de 250 μM de NADPH en todos los experimentos. Como un protocolo aparte, se realizaron experimentos con ratas tratadas con GdCl<sub>3</sub> con el

propósito de comprobar la ausencia de células de Kupffer, como ya ha sido reportado por otros investigadores<sup>43</sup>.

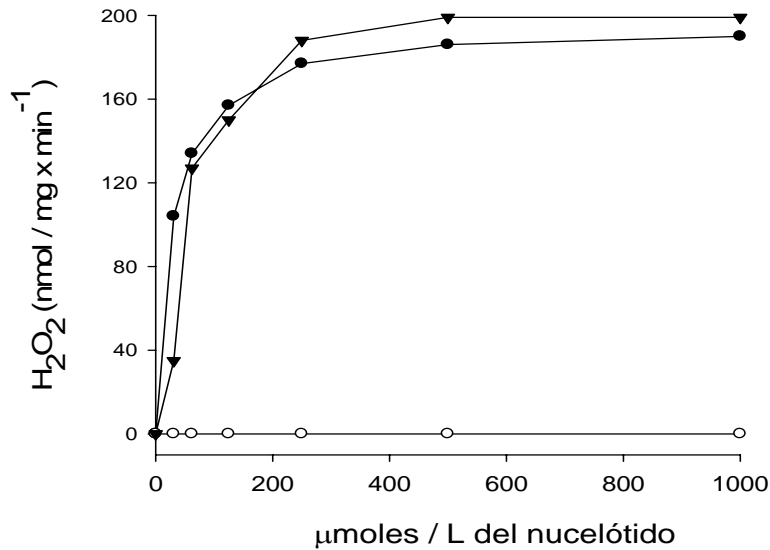


Figura 10. Generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por MPCH activadas con 3 mM Mn<sup>2+</sup> en presencia de NADPH (●) K<sub>M</sub> 44 µM, NADH (○) y ratas tratadas con Gd Cl<sub>3</sub> (▼) K<sub>M</sub> 69µM. Los valores son el promedio ± ES de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos con las MPCH de estas ratas exhibieron una actividad enzimática de tipo Michaelis frente al NADPH con una 0.5 V<sub>max</sub> de 69 µM, lo que indica que no hay participación de las células de Kupffer como fuente de Nox para los experimentos aquí reportados por lo que se concluye que las ratas muestran actividad de una NADPH oxidasa en hígados sin células de Kupffer. Por otro lado, la falta de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de NADH nos indica la ausencia de una proteína NADH oxidasa, de origen microsomal o mitocondrial que pudiera haber contaminado la muestra de MPCH, por lo que este dato puede ser considerado como otro indicador de pureza de nuestra fuente de enzima.

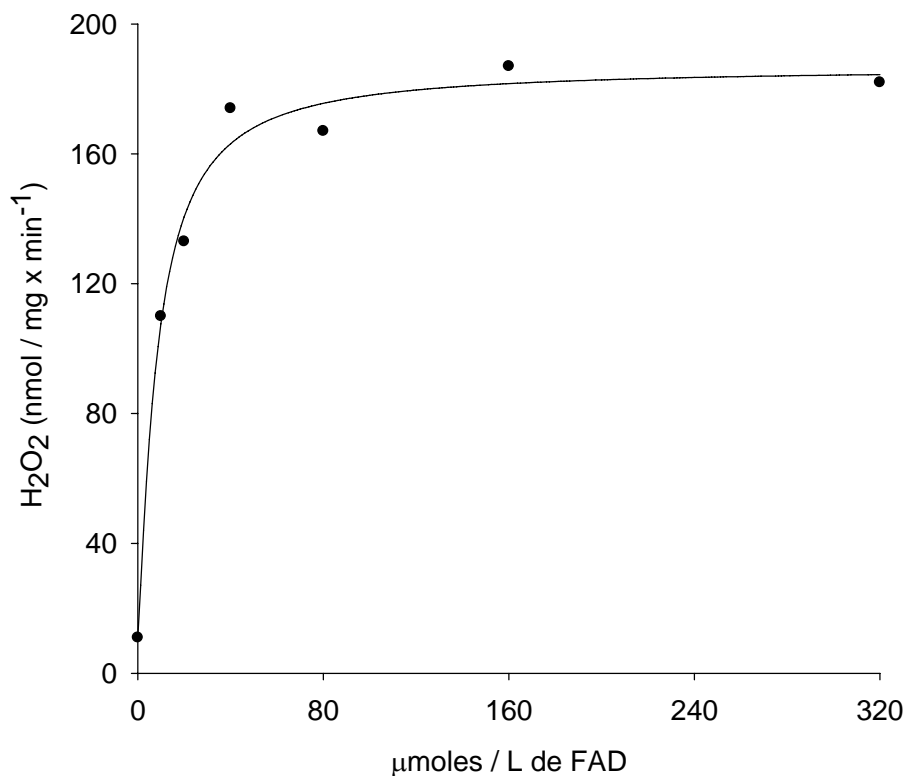


Figura 11. Formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por MPCH en presencia de FAD (K<sub>M</sub> 8 μM) y 3 mM de Mn<sup>2+</sup>. Los valores son el promedio ± ES de tres experimentos independientes.

La Figura 11 muestran la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando se adiciona FAD al ensayo con MPCH durante la etapa de catálisis, en la gráfica se observa una actividad basal de aproximadamente el 6% de la actividad máxima registrada, esta actividad, pudiera ser debida a residuos de FAD que hubieran estado unidos al dominio de FAD de gp91<sup>phox</sup>. Sin embargo, con la adición de FAD se manifiesta un aumento en la actividad de la enzima, que alcanza su máximo con concentraciones de FAD cercanas a las 50 μM, el comportamiento cinético de la enzima frente al FAD es el clásico de Michaelis y la mitad de la velocidad máxima se obtiene con una concentración de 8 μM de FAD.

Tomando en cuenta estos datos, se decidió usar una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  de FAD en los experimentos posteriores.

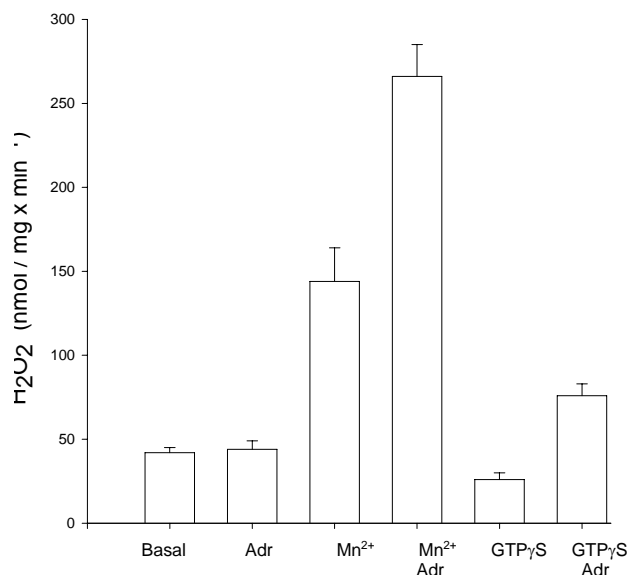


Figura 12. Efecto 1 $\mu\text{M}$  de adrenalina, 3mM de Mn<sup>2+</sup>, 10 $\mu\text{M}$  de GTP $\gamma$ S y de adrenalina mas Mn<sup>2+</sup> y adrenalina mas GTP $\gamma$ S, sobre la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en MPCH. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

Por las razones expuestas en el apartado de antecedentes y los lineamientos marcados en el segundo objetivo específico (Explorar la participación de la adrenalina sobre la activación de una NADPH presente en la membrana plasmática del hepatocito) se consideró que la adrenalina pudiera ser un regulador fisiológico de la Nox presente en las células hepáticas. En los experimentos en los cuales se usó adrenalina como posible regulador se planteo la conveniencia de sustituir el uso de concentraciones elevadas de Mn<sup>2+</sup> por GTP $\gamma$ S, un análogo no hidrolizable del GTP, el cual mantiene activada a la proteína G. Los resultados presentados en la Figura 12 muestran que el sistema responde positivamente a la concentración suprafisiológica del Mn<sup>2+</sup> y que si además se le adiciona adrenalina se observa un incremento aún mayor en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo

que nos sugiere una activación directa del  $Mn^{2+}$  probablemente mediada por una proteína G y la de un receptor activado por la hormona. La actividad basal de Nox que se registra en ausencia del activador puede ser la respuesta al estado de estrés moderado en el que se encuentra la rata y quizá este factor sea una parte del mecanismo de regulación de la actividad de la enzima *in vivo*. En la misma figura, la adrenalina y el  $GTP\gamma S$  ( $10\mu M$ ) individualmente no estimulan la generación de  $H_2O_2$ , sin embargo, la adición de ambos en la etapa de activación promueve un incremento en la formación de  $H_2O_2$ , este aumento es estadísticamente significativo con respecto a la basal. La concentración de  $3\text{ mM}$  de  $Mn^{2+}$  no es fisiológica, sin embargo, promueve la síntesis de  $H_2O_2$  en nuestro sistema por lo que en algunos experimentos fue utilizado como control positivo, por otro lado, el uso de adrenalina más  $GTP\gamma S$  en la etapa de activación representa la condición más fisiológica. De ahí que en los siguientes experimentos se decidió sustituir al  $Mn^{2+}$  por el  $GTP\gamma S$  para la activación de la isoforma de Nox presente en la membrana plasmática del hepatocito de rata, con la finalidad de caracterizar los efectos de la adrenalina sobre la enzima. Inicialmente se hizo una curva dosis respuesta con adrenalina (Figura 13) en donde se observa un aumento en los niveles de  $H_2O_2$  dependiente de la concentración de la hormona.

En seguida se decidió investigar el tipo de receptor adrenérgico que se activa en presencia de adrenalina y que diera como respuesta la activación de la Nox. Para esto se emplearon antagonistas para cada subtipo de receptor adrenérgico, la prazocina para bloquear al receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, yohimbina y rauwolscina para bloquear a los receptores  $\alpha_2$  y propanolol para bloquear al receptor  $\beta$ <sup>72</sup>.

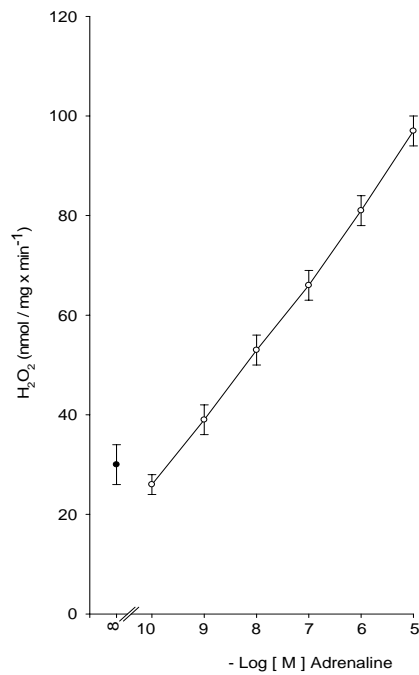


Figura 13. Efecto de la adrenalina más GTP $\gamma$ S (10 $\mu$ M) sobre la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en MPCH. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

Los experimentos fueron conducidos de la siguiente forma: durante la etapa de activación (previo a la etapa de catálisis), se agregó al medio de incubación una mezcla de los antagonistas mencionados, de manera que la ausencia de uno de ellos permite que ese subtipo de receptor, no bloqueado, sea el único que pueda ser activado en presencia adrenalina.

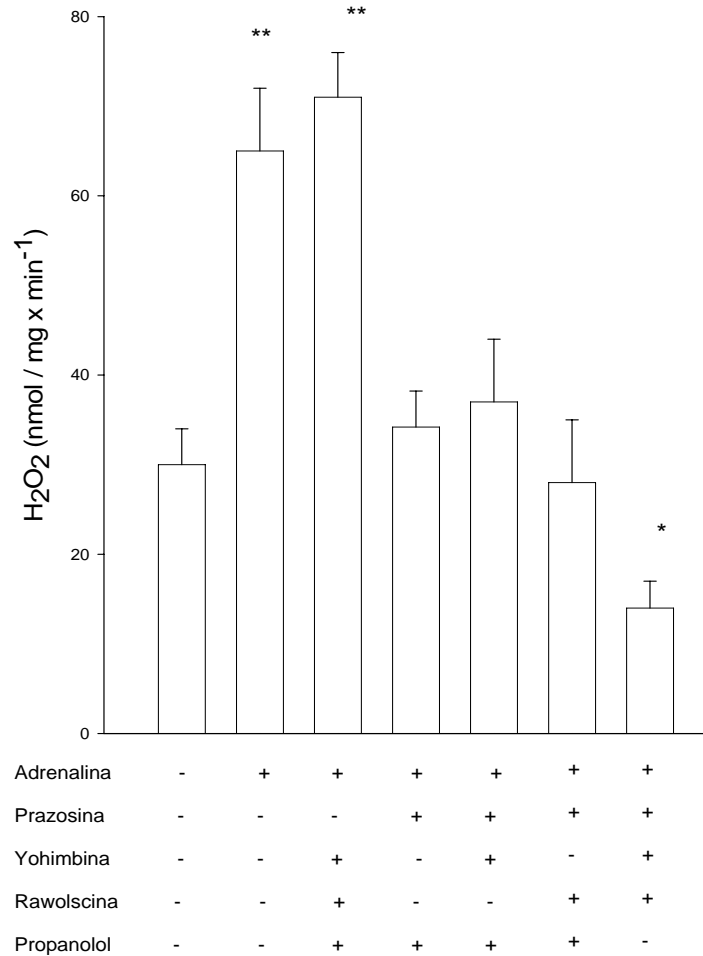


Figura 14. Efecto de la adrenalina ( $1\mu\text{M}$ ) simultáneamente a la presencia de antagonistas adrenérgicos ( $0.1\mu\text{M}$ ) sobre la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de NADPH en MPCH. Prazocina ( $\alpha_1$ ), Yohimbina ( $\alpha_{2A}$ ), Rauwolscina ( $\alpha_{2B}$ ), Propanolol ( $\beta$ ). Los datos son promedio  $\pm$  ES de tres determinaciones,  $*P < 0.005$  y  $**P < 0.001$ .

En la Figura 14, se presenta la respuesta del receptor que llegó a ser activado por adrenalina. Se obtuvo un efecto cuantitativamente importante con el receptor  $\alpha_1$ , no se registró una respuesta significativamente estadística con respecto al control de los subtipos de receptor  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ) en presencia de adrenalina; sin embargo, la respuesta del receptor  $\beta$  a la hormona fue de una marcada inhibición en la síntesis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que significa que la adrenalina estimula o inhibe la actividad de una isoforma de Nox presente en membrana plasmática de hepatocito de rata al activar al receptor  $\alpha_1$  o al  $\beta$  respectivamente.



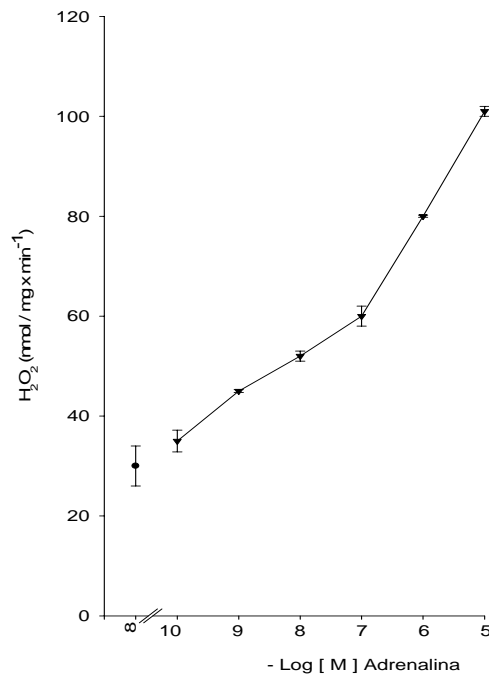


Figura 15. Curva dosis respuesta de la adrenalina sobre el receptor  $\alpha_1$ . Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

Para confirmar la respuesta del receptor  $\alpha_1$  a la adrenalina se realizó un ensayo con concentraciones crecientes de la hormona en presencia de  $GTP\gamma S$  mas los tres antagonistas de los receptores adrenérgicos (yohimbina, rauwolscina, propanolol), sin bloquear el receptor  $\alpha_1$ . Los datos obtenidos se muestran en la Figura 15, en la que observamos que el tipo de respuesta registrada es muy similar a la obtenida en ausencia de antagonistas (Figura 12), lo que significa que el receptor  $\alpha_1$  es el estimulado por la adrenalina para activar la Nox de la membrana plasmática, este dato coincide con el reporte de la literatura donde menciona que el subtipo de receptor adrenérgico que predomina en el hígado de una rata joven es el  $\alpha_1$ , en comparación con el  $\beta$ , el cual predomina en la rata en edad adulta<sup>73</sup>.

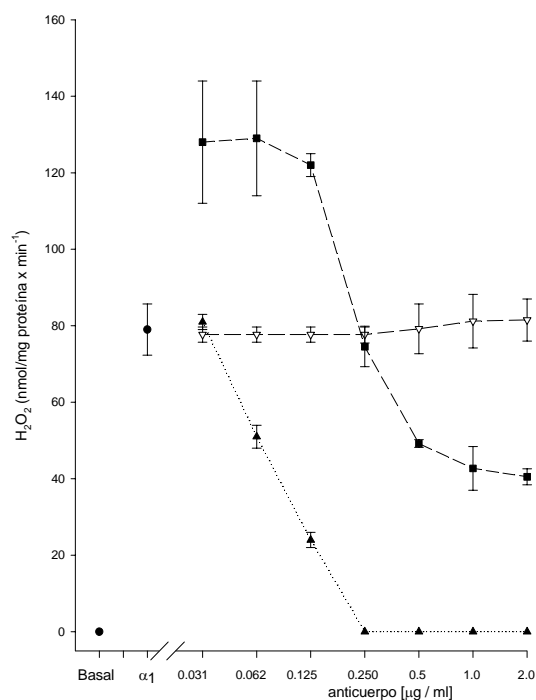


Figura 16. Efecto de la adición de anticuerpos contra las isoformas de NADPH oxidasa: Nox 1 (■----■), Nox 2 (▲-----▲) y Nox 4 (∇----∇), sobre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en MPH. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

La identificación de la isoforma de NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito que eventualmente responda la adrenalina, es el tercer objetivo específico del trabajo, el cual fue abordado a través de una metodología que nos permitió investigar a las proteínas que participan en la síntesis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dicha estrategia consistió en utilizar anticuerpos dirigidos contra los distintos constituyentes proteicos que se sabe conforman el sistema Nox 2 en los macrófagos ( $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  y  $p22^{phox}$ ), así como para el tipo de Nox presente en los hepatocitos (Nox 1, Nox 2, Nox 4).

Para esta serie de experimentos se utilizaron ratas que fueron mantenidas en un ambiente de confort (temperatura controlada, agua y alimento *ad libitum*) por una semana previa a la obtención de hepatocitos, los cuales fueron purificados por

elutriación. Se decidió estimular específicamente al receptor  $\alpha_1$ , para lo cual se emplearon los antagonistas de los otros receptores adrenérgicos. En la etapa de activación se agregaron concentraciones crecientes del anticuerpo dirigido contra las isoformas de Nox (Figura 16) o bien, contra algún integrante proteico del complejo NADPH oxidasa presente en el macrófago (Figura 17).

En la Figura 16, se muestran los datos obtenidos con el uso de anticuerpos contra las isoformas de Nox 1, Nox 2 y Nox 4. El efecto conseguido con el anticuerpo contra Nox 1 muestra un efecto bifásico, es decir, aumento en la producción de  $H_2O_2$  a bajas concentraciones del anticuerpo y una disminución en los niveles de  $H_2O_2$  a concentraciones mayores del anticuerpo. El aumento en los niveles de  $H_2O_2$  observado fue mayor al registrado con la estimulación del control ( $\alpha_1$ ) y la disminución no llegó a niveles de cero. Con respecto al anticuerpo contra Nox 2, los datos de la Figura 16 nos muestran una disminución del efecto estimulador de la adrenalina, dependiente de la concentración del anticuerpo. Para el anticuerpo contra Nox 4, se observa una producción de  $H_2O_2$  igual a los niveles producidos por el control, sin embargo, dicha producción no es modificada por ninguna de las concentraciones del anticuerpo ensayadas. De este conjunto de datos, sobresale la respuesta obtenida con el anticuerpo contra la proteína Nox 2, sugiriendo que la actividad de la enzima activada por la adrenalina, vía su receptor  $\alpha_1$ , es una isoforma de Nox 2 presente en la membrana plasmática del hepatocito. En relación a lo observado con el anticuerpo contra Nox 1, la respuesta obtenida no la podemos explicar, por lo que se sugieren experimentos adicionales para interpretar estos resultados. Con respecto a la isoforma de Nox 4, parecería que la proteína no está presente en las membranas de los hepatocitos; sin embargo, la literatura reporta su presencia en los mismos hepatocitos<sup>52</sup>, por lo que una explicación probable es que la enzima no sea estimulada por la adrenalina. Es

importante hacer notar, que en esta serie de experimentos, no se registra actividad enzimática en ausencia del agonista (basal), lo que nos indica que la enzima no está activada, debido probablemente a las condiciones de manejo (ambiente de confort) que tuvo la rata.

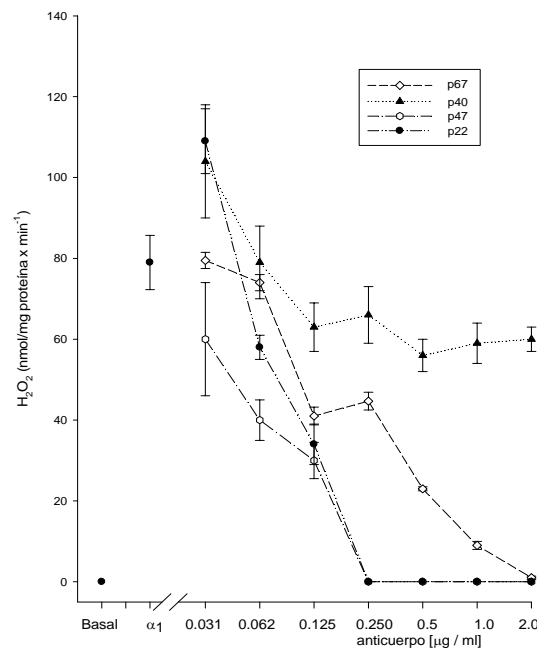


Figura 17. Efecto de la adición de anticuerpos contra las proteínas  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  y  $p22^{phox}$  sobre la producción de  $H_2O_2$ , en MPH. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

La Figura 17 muestra los datos obtenidos sobre la producción de  $H_2O_2$  en membrana plasmática de hepatocitos, después de la adición de anticuerpos dirigidos contra las proteínas  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  y  $p22^{phox}$ . El comportamiento observado de las proteínas  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  y  $p22^{phox}$  en presencia del anticuerpo fue similar entre ellas, es decir, una disminución en la síntesis de  $H_2O_2$  estimulada por adrenalina, dependiente de la concentración del anticuerpo, sin embargo, la respuesta de la proteína  $p40^{phox}$  al anticuerpo fue diferente, ya que a las concentraciones más bajas del anticuerpo se

observó un efecto estimulador, el cual, fue más allá del valor registrado para el control, dicho efecto fue disminuyendo hasta llegar a un punto ligeramente por debajo del control y manteniéndose en este nivel, independientemente de la concentración del anticuerpo. Estos datos nos sugieren que las proteínas p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> están presentes en la membrana plasmática del hepatocito y que son esenciales para la oxidación de NADPH y la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a la adrenalina. Es probable que la proteína p40<sup>phox</sup> se encuentre en la membrana plasmática pero no participa en la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como ha sido reportado por otros autores<sup>21</sup>.

Otra de las proteínas que forman parte del complejo activo de la NADPH oxidasa es la proteína Rac perteneciente al grupo de las “pequeñas proteínas G” de la familia Rho<sup>74</sup>. Esta proteína tiene un peso de 32 kDa aproximadamente y requiere para su activación nucleótidos de guanina trifosfato. Una vez activada la proteína Rac y asociada a p67<sup>phox</sup> se manifiesta la actividad catalítica de Nox 2, por lo que se decidió explorar con el uso de anticuerpos comercialmente disponibles contra la proteína Rac, su posible participación en la activación del complejo proteico de la isoforma de NADPH oxidasa presente en MPH. Para ello, se emplearon anticuerpos dirigidos contra Rac 1 y Rac 2 con la finalidad también, de averiguar además cual de estas isoformas estaría participando en el sistema generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hepatocito. En la Figura 18, se observa que con el uso del anticuerpo contra Rac 1, se observa una disminución en la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estimulada por adrenalina, esta disminución fue dependiente de la concentración del anticuerpo; sin embargo, no ocurrió lo mismo con la proteína Rac 2 cuya actividad no se ve modificada. Con los datos mostrados en esta figura, podemos ver que la proteína Rac 1, además de estar presente en la membrana plasmática del hepatocito, participa en el proceso de activación de esta NADPH oxidasa, no así la isoforma de Rac 2.

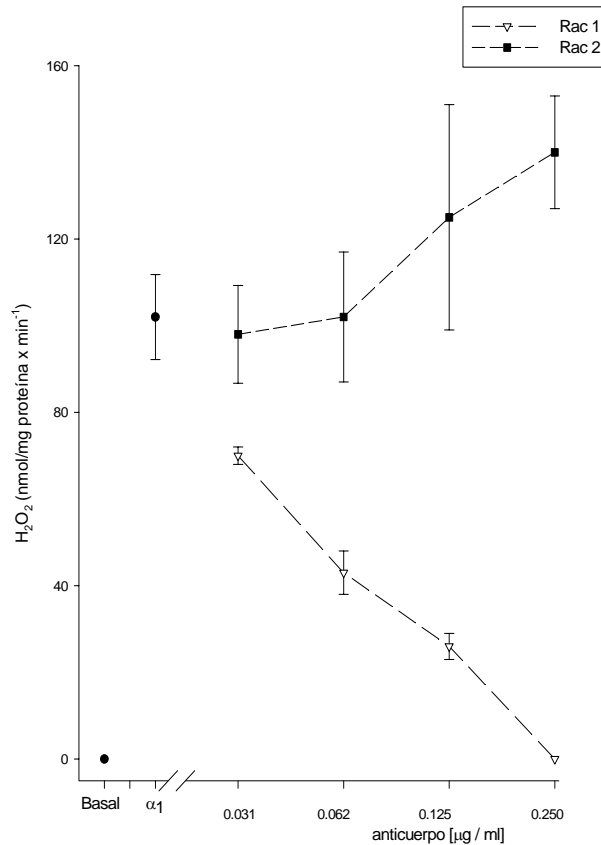


Figura 18. Efecto de la adición de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Rac 1 y Rac 2 sobre la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en MPH estimulada por adrenalina. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

El efecto regulador de la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hepatocito, vía la activación de una isoforma de Nox 2, comprende la participación de receptores adrenérgicos, pertenecientes al grupo de “receptores acoplados a las proteínas G”. Estos receptores, una vez estimulados, activan a una proteína heterotrimérica denominada proteína G, quien en respuesta al estímulo, se disocia en las subunidades  $\alpha$  y el heterodímero  $\beta\gamma$ , responsables de regular la síntesis de algunos efectores relacionados con los procesos de señalización celular<sup>75,76</sup>. Estas proteínas G se clasifican en G <sub>$\alpha$ s</sub>, G <sub>$\alpha$ i/o</sub>, G<sub>q/11</sub>, G <sub>$\alpha$ 12</sub> y G <sub>$\alpha$ 13</sub>, las cuales regulan la actividad de otras proteínas. G <sub>$\alpha$ s</sub> esta relacionada con la

activación de la enzima adenilato ciclasa;  $G_{\alpha i/o}$  participa en la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa;  $G_{q/11}$  estimula la actividad de la enzima fosfolipasa C (PLC);  $G_{\alpha 12}$  y  $G_{\alpha 13}$  modulan la actividad de las “pequeñas proteínas G”, pertenecientes al grupo de la familia Rho<sup>74-76</sup>. Como se mencionó con anterioridad, las proteínas Rac pertenecen al grupo de las proteínas de la familia Rho, aunado a los datos experimentales obtenidos en este trabajo en donde se demuestra la participación de una proteína G (Figura 12) y la proteína Rac 1 (Figura 18) en la producción de  $H_2O_2$  regulada por la adrenalina en hepatocito de rata, se decidió investigar cual de las proteínas  $G_{\alpha 12}$  o  $G_{\alpha 13}$  participa en el proceso de transducción de la adrenalina para la síntesis de  $H_2O_2$ . Para el diseño del experimento se decidió incubar la muestra de MPH con anticuerpos comerciales dirigidos contra cada una de estas dos proteínas G y evaluar su participación en la generación de  $H_2O_2$  estimulada por la hormona.

Los datos presentados en la Figura 19, nos muestran una inhibición en la síntesis de  $H_2O_2$  estimulada por adrenalina en presencia del anticuerpo dirigido contra la proteína  $G_{\alpha 13}$ , esta inhibición fue dependiente de la concentración del anticuerpo. En el caso del anticuerpo contra la proteína  $G_{\alpha 12}$ , solo se registró una disminución constante en los niveles de peróxido de hidrógeno, la cual fue mantenida hasta la concentración mas elevada del anticuerpo. Estos resultados confirman la participación de una proteína G, del tipo  $G_{\alpha 13}$  en la síntesis de  $H_2O_2$  estimulada por la adrenalina, vía la isoenzima Nox 2 en el hepatocito de rata. Es probable que la proteína  $G_{\alpha 13}$  pudiera ser la responsable de la activación de la NADPH oxidasa vía la proteína Rac 1.

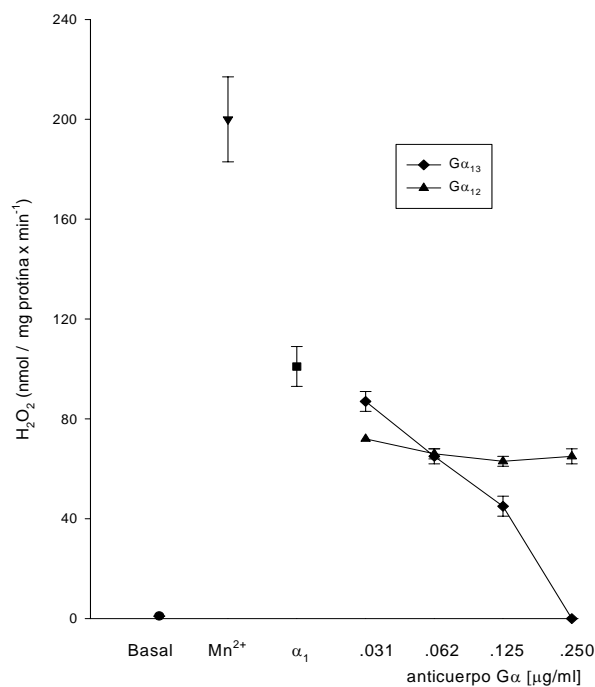


Figura 19. Efecto de la adición de anticuerpos dirigidos contra las proteínas  $G_{\alpha 12}$ ,  $G_{\alpha 13}$ , sobre la síntesis de  $H_2O_2$  en MPH. Los valores son el promedio  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

Los resultados hasta aquí obtenidos comprenden la caracterización funcional de un sistema generador de  $H_2O_2$  en el hepatocito de rata y demuestran la actividad de una NADPH oxidasa en la membrana plasmática de estas células. Esto sugiere un sistema en el que todas las subunidades identificadas en el macrófago también intervienen en la actividad y la activación de la enzima presente en los hepatocitos, y que todas las subunidades previamente identificadas en el macrófago ya se encuentran en la membrana del hepatocito antes de aplicar el estímulo. Es por ello que se procedió conforme a lo establecido en el cuarto objetivo específico (Identificar los componentes proteicos que integran el sistema de NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática del hepatocito) a comprobar la presencia (Figuras 20-23) en la membrana plasmática del hepatocito de las proteínas  $gp91^{phox}$  y  $p22^{phox}$  así como de las subunidades reguladoras  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  y la proteína Rac. Además se buscó la



eventual presencia de las isoformas Nox 1 y Nox 4. Para ello se utilizó la separación electroforética de las proteínas de dichas membranas y su identificación mediante la técnica de Western blot (Material y Métodos).

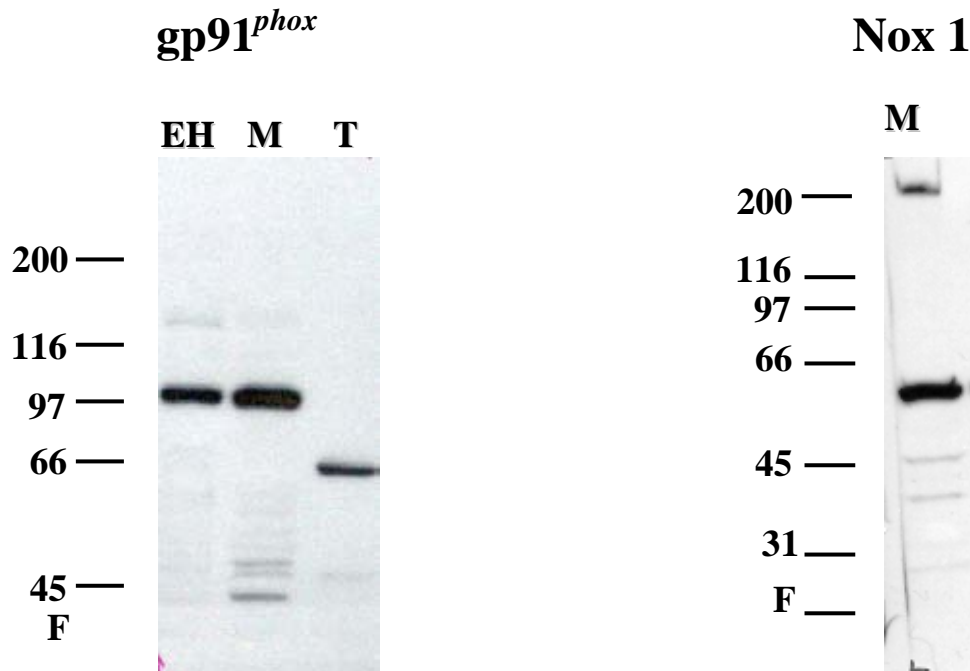


Figura 20. Identificación de gp91<sup>phox</sup> y Nox 1 en membrana plasmática de hepatocitos. EH (extracto de hepatocitos) 60 µg de proteína, M (muestra de membrana plasmática de hepatocitos) 60 µg de proteína, T (THP-1) 20 µg de proteína, F (frente del gel). Al margen izquierdo de cada gel, se indica el valor de referencia de masa molecular en kDa. Para mas detalles ver Material y Métodos.

En la Figura 20, se presenta la imagen de los geles de las proteínas aisladas de las membranas plasmáticas de las células hepáticas detectadas con los anticuerpos comerciales dirigidos contra gp91<sup>phox</sup> y Nox 1. En el lado izquierdo, para el caso de la proteína gp91<sup>phox</sup>, tanto en el extracto de hepatocitos (EH) como en la muestra de MPH (M) se observa una sola banda reactiva al anticuerpo contra gp91<sup>phox</sup> alrededor de los 97 kDa y una banda a la altura de 65 kDa en el control positivo T (THP-1, línea celular de neutrófilos). La diferencia de peso entre la proteína detectada en MPH y en el EH con el control positivo, se debe probablemente al estado de glicosilación en el que se

encuentra la proteína de 97 kDa y a la carencia de glicosilación en la proteína de la línea celular THP-1. Aunque la glicosilación no es un requerimiento para la función catalítica de gp91<sup>phox</sup>, esta proteína contiene tres sitios de glicosilación (asparaginas 132, 149 y 240), sin embargo, el evento de glicosilación varía entre los distintos tipos de fagocitos y entre las diferentes especies<sup>11,19</sup>. En el lado derecho de la Figura 20, para el caso de la proteína Nox 1, se observa una banda de 65 kDa aproximadamente en MPH que reaccionan a la presencia de anticuerpo contra Nox 1. El corrimiento de esta banda coincide con lo reportado en la literatura<sup>20</sup>, en donde se menciona que la proteína Nox 1 posee una masa molecular calculada de 65 kDa, además de carecer de los sitios de glicosilación típicos en gp91<sup>phox</sup>. Podemos decir que estas dos proteínas se localizan en la MPH.

En el lado izquierdo de la Figura 21, para el caso de la proteína Nox 4, se observa una banda a la altura de 65 kDa, que reacciona con el anticuerpo contra Nox 4, este resultado es muy similar a lo encontrado con Nox 1 y aplica la misma explicación para ambas proteínas.

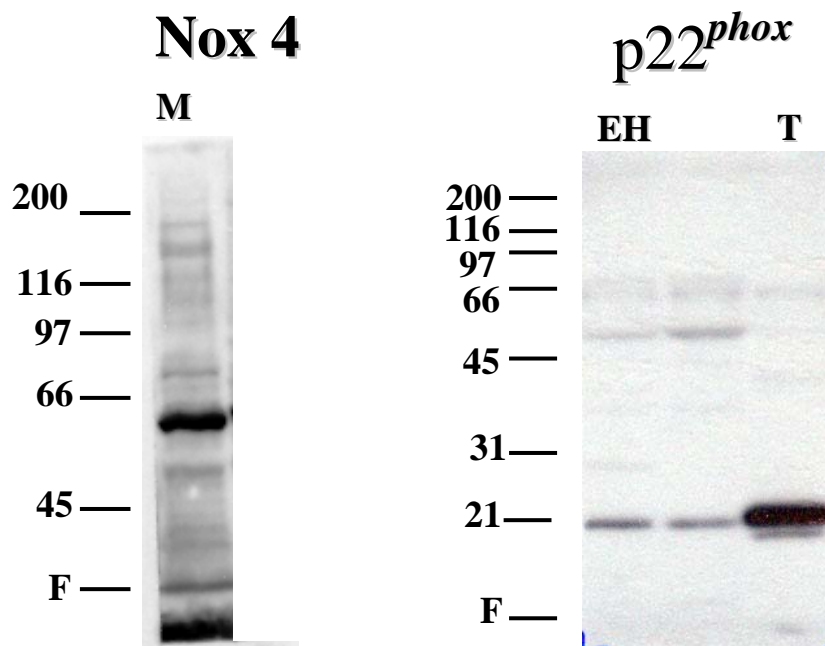


Figura 21. Identificación de Nox 4 y  $p22^{phox}$ , en membrana plasmática de hepatocitos. EH 60  $\mu$ g de proteína, M 60  $\mu$ g de proteína, T 20  $\mu$ g de proteína, HepG2 60 $\mu$ g de proteína, F (frente del gel). Al margen izquierdo de cada gel, se indica el valor de referencia de masa molecular en kDa. Para mas detalles ver Material y Métodos.

De hecho, la literatura reporta al peso molecular ( $\sim$  65 kDa) como una característica común de estas proteínas (Nox 1, Nox 2 [gp91<sup>phox</sup>] y Nox 3)<sup>20</sup>. Podríamos concluir que las proteínas de la familia Nox: Nox 1, Nox 2 (gp91<sup>phox</sup>) y Nox 4, se encuentran presentes en la membrana plasmática del hepatocito, lo cual confirma lo reportado por otros autores a cerca del descubrimiento de RNAm para Nox 1, gp91<sup>phox</sup> y Nox 4 en el hepatocito<sup>52</sup>. En la misma Figura 21 se presenta, en el lado derecho, la imagen de un gel obtenida con el anticuerpo contra la proteína  $p22^{phox}$ , en este gel se aprecia una banda que reacciona con el anticuerpo para  $p22^{phox}$  a la altura de 21 kDa, en el extracto de hepatocitos, en el control positivo (THP-1) y en la muestra de membranas plasmáticas

de hepatocitos, el peso molecular que indica esta banda corresponde al peso molecular reportado para la proteína  $p22^{phox}$  <sup>15,17</sup>.

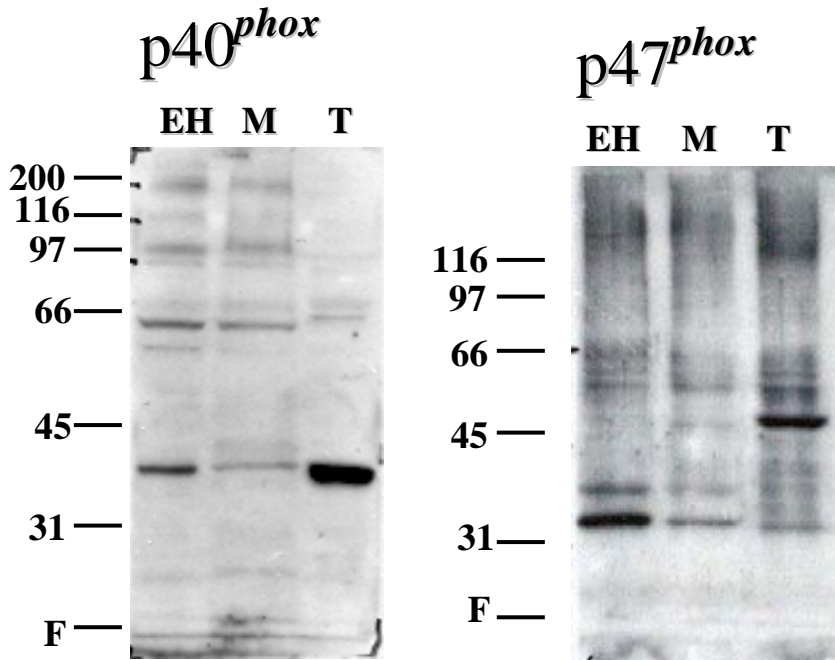


Figura 22. Identificación de  $p40^{phox}$  y  $p47^{phox}$  en membrana plasmática de hepatocitos. EH 60  $\mu$ g de proteína, M 60  $\mu$ g de proteína, T 20  $\mu$ g de proteína, HepG2 60 $\mu$ g de proteína, F (frente del gel). Al margen izquierdo de cada gel, se indica el valor de referencia de masa molecular en kDa. Para más detalles ver Material y Métodos.

En la Figura 22 se presenta del lado derecho e izquierdo, la imagen de los geles obtenidos con los anticuerpos contra las proteínas  $p40^{phox}$  y  $p47^{phox}$  respectivamente. Para la proteína  $p40^{phox}$ , observamos en el carril donde se depositó la muestra del control positivo (THP-1), el extracto de hepatocitos (HE) y de membranas de hepatocitos (MPH) una banda a la altura de 40 kDa aproximadamente, la cual coincide con el peso molecular reportado para  $p40^{phox}$  (39 kDa) <sup>11,15</sup>. Respecto a la identificación de la proteína  $p47^{phox}$  en la membrana plasmática de hepatocitos, se aprecia una banda muy intensa en el control positivo (THP-1), y una banda muy tenue en la muestra de MPH y en el extracto de hepatocitos. El corrimiento de esta banda se encuentra en el

peso molecular reportado para la proteína p47<sup>phox</sup> <sup>11</sup>, de hecho esta proteína ha sido detectada en hepatocitos a nivel de RNAm y de proteína<sup>53</sup>.

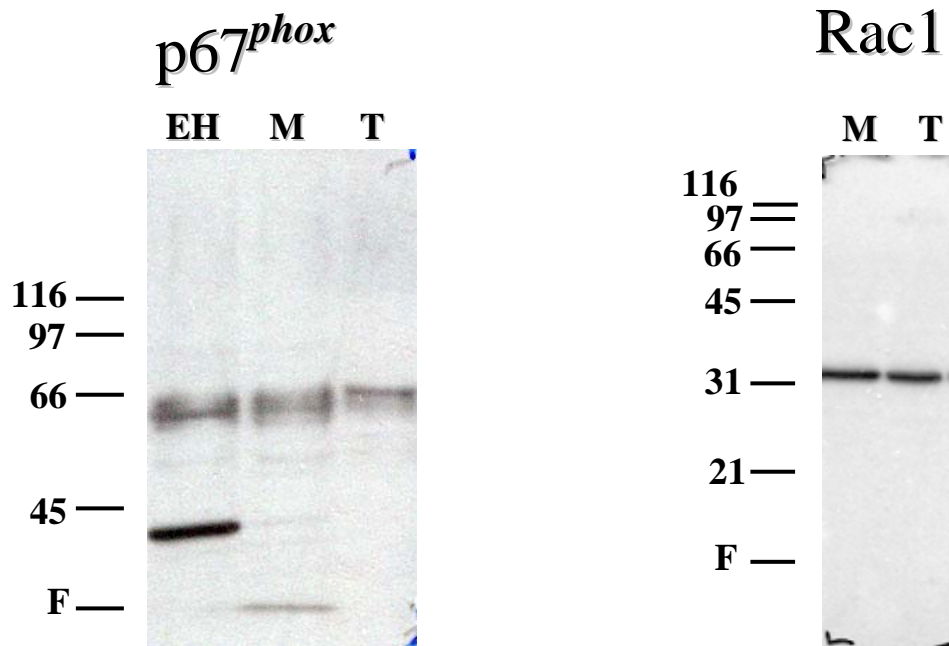


Figura 23. Identificación de p67<sup>phox</sup> y Rac 1 en membrana plasmática de hepatocitos. Extracto de hepatocitos (EH) 60 µg de proteína, MPH (M) 60 µg de proteína, THP-1 (T) 20 µg de proteína, F (frente del gel). Al margen izquierdo de cada gel, se indica el valor de referencia de masa molecular en kDa. Para mas detalles ver Material y Métodos.

Con respecto a la identificación de p67<sup>phox</sup> y Rac1 por medio de anticuerpos, la Figura 23 muestra los geles con las imágenes obtenidas para estas proteínas. En el margen izquierdo, se muestra el resultado obtenido con el uso del anticuerpo contra p67<sup>phox</sup> en donde se observa una banda de 65 kDa aproximadamente en todos los carriles, al respecto, la literatura reporta para esta proteína una masa molecular de 60 kDa<sup>11</sup>. En el lado derecho de la Figura 23, se presenta el gel obtenido con el anticuerpo dirigido contra la proteína Rac 1, en él, observamos tanto en el control positivo como en la muestra de membranas de hepatocitos una banda alrededor de 32 kDa, similar al peso molecular reportado para esta proteína en la literatura.

En este último grupo de figuras (de la 20 a la 23), se muestran los resultados obtenidos de los estudios encaminados a la identificación de los distintos componentes proteicos que conforman el sistema de NADPH oxidasa en el fagocito y su probable localización en la membrana plasmática del hepatocito, de estos datos se concluye que la proteína Nox 2 (gp91<sup>phox</sup>), así como las distintas proteínas *phox* (p22, p67, p47, p40) y la proteína Rac 1, se encuentran presentes en la membrana plasmática del hepatocito. De igual forma, estos datos señalan la existencia de las isoformas Nox 1 y Nox 4 en la membrana plasmática de las células parenquimatosas del hígado.

## DISCUSIÓN

Con base a los objetivos específicos planteados en este trabajo, el desarrollo experimental del mismo mostró los siguientes hallazgos: a) la existencia de un sistema generador de  $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2$  dependiente de la oxidación de NADPH, el cual se encuentra localizado en la membrana plasmática del hepatocito; b) la producción de  $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2$  por este sistema puede ser regulado por la adrenalina; c) la isoforma Nox 2 es la responsable de la producción de  $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2$  en la membrana plasmática del hepatocito estimulada por la adrenalina; d) la isoforma de Nox 2 está presente como un complejo proteico ensamblado en la membrana plasmática; e) en este complejo proteico las proteínas reguladoras ya están presentes en la membrana del hepatocito. Estos resultados cumplen con el objetivo general e hipótesis establecidos en este trabajo y cuya posible explicación se presenta a continuación.

El  $H_2O_2$  es el producto de la dismutación espontánea del  $O_2^{\bullet-}$  (Figura 9) el cual se forma a nivel de la membrana plasmática del hepatocito y cuya síntesis depende estrictamente del NADPH y no del NADH (Figura 10). La producción de  $H_2O_2$  estimulada por el  $Mn^{2+}$  vía la oxidación del NADPH observada en adipocitos<sup>65</sup> y neutrófilos<sup>66</sup> también fue observada en este trabajo a concentraciones similares, se sugiere que este efecto está mediado por la activación directa del  $Mn^{2+}$  sobre una proteína G<sup>66</sup>. En este trabajo, el  $Mn^{2+}$  es suficiente para demostrar una actividad catalítica de la Nox y puede ser equivalente a la activación de Nox con esteres de forbol<sup>77</sup> o con ácido araquidónico<sup>78</sup>.

Los resultados obtenidos con la sustitución del  $Mn^{2+}$  por el  $GTP\gamma S$  fue uno de los experimentos clave de este trabajo, ya que nos permitió visualizar la producción de ROS como un proceso de señalización celular, para el cual contamos con el ligando apropiado, un receptor, GTP y una respuesta. El  $GTP\gamma S$  mantiene activada a la proteína

G, sin embargo, es insuficiente para incrementar la actividad de la Nox, a menos que se añada adrenalina (Figura 12), cuando esto sucede, la respuesta de activación es proporcional a la dosis de la hormona (Figura 13), lo que nos sugiere que una proteína G activada, ocasiona finalmente la activación de la subunidad catalítica de alguna isoforma de Nox. Sabemos que las proteínas G están presentes en la membrana plasmática y que se acoplan a receptores hormonales, entre otros, con receptores adrenérgicos. Llama la atención, que la producción de ROS con 3mM de  $Mn^{2+}$  es sensible a la presencia de adrenalina  $10^{-6}$  M (Figura 12) y que la adrenalina por sí sola no activa a la Nox. De acuerdo con la literatura, una proteína G activada sería el intermediario entre el receptor adrenérgico y el citocromo  $b_{558}$ . En este trabajo se encontró que la proteína  $G\alpha_{13}$  participa en la generación de  $H_2O_2$  (Figura 19), la cual podría ser la responsable de activar a la proteína de la familia Rho, la proteína Rac como lo sugiere la literatura<sup>74-76</sup> y por lo tanto mediar entre el receptor activado y la activación del complejo NADPH oxidasa. Varios reportes en la literatura mencionan que en neutrófilos, la proteína Rac es el principal candidato para regular la actividad de la NADPH oxidasa<sup>79</sup>. En este tipo de células se ha demostrado que Rac 2 se une directamente al citocromo  $b_{558}$  de una manera dependiente de GTP<sup>80</sup>. Se sugiere que la incorporación de Rac al complejo *phox* destruye la interacción establecida entre  $p67^{phox}$  y  $p40^{phox}$ <sup>81</sup>, lo que acarrea un cambio conformacional en  $p67^{phox}$  y por lo tanto, su disociación con  $p47^{phox}$ , condición que le permite a  $p67^{phox}$  unirse directamente a  $gp91^{phox}$  e iniciar del flujo de electrones hacia el oxígeno<sup>82</sup>. Esta situación podría presentarse en el sistema Nox 2 del hepatocito, con la salvedad de que en el hepatocito el complejo *phox* ya se encuentra presente y solo se espera a que la proteína Rac 1 sea activada.



Con el uso de antagonistas seleccionados para los receptores de adrenalina, identificamos los receptores adrenérgicos involucrados en la respuesta descrita. La respuesta de mayor importancia cuantitativa fue la de la activación de la Nox mediada por la estimulación de los receptores  $\alpha_1$  (Figura 15). De similar importancia es el efecto inhibitorio de la NADPH oxidasa mostrado por la estimulación de el receptor  $\beta$ ; de hecho los hallazgos de acciones opuestas al mismo estímulo es una observación común en el estudio de la respuesta fisiológica a la activación de receptores.

La información obtenida sobre la caracterización funcional del sistema generador de  $H_2O_2$  estimulado por adrenalina en la membrana plasmática del hepatocito (Figuras 13,14 y 15), así como la inhibición de este efecto, ocasionado por la presencia del anticuerpo contra Nox 2 (Figura 16) sugieren la participación de una Nox 2 como la enzima responsable de la síntesis del peróxido de hidrógeno en el hepatocito. Esta sugerencia adquiere relevancia, cuando se observan los datos obtenidos por medio de la técnica de Western blot, en donde se detecta la presencia de esta isoenzima en la membrana plasmática del hepatocito (Figura 20). De igual forma, la inhibición de la formación de  $H_2O_2$  en MPH estimulada por adrenalina observada cuando las membranas plasmáticas son incubadas en presencia de los anticuerpos contra las proteínas p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> (Figura 17) y de la proteína Rac (Figura 18) sugirieren la participación de este conjunto de proteínas en la síntesis de  $H_2O_2$  en MPH y cuya presencia fue revelada por las técnicas inmunológicas (Figuras 21,22 y 23). A diferencia de lo que sucede en los fagocitos, en donde el estado activado de gp91<sup>phox</sup> se caracteriza por la migración y el ensamble de proteínas citosólicas, en el hepatocito, estos componentes proteicos necesarios para la oxidación del NADPH se encuentran ya presentes en la membrana plasmática en espera de la señal adrenérgica que induzca los arreglos necesarios para la activación de esta NADPH oxidasa. En consecuencia se

propone que en el hepatocito, el sistema generador de  $H_2O_2$  para que responda a la adrenalina debe estar conformado por una isoforma de gp91<sup>phox</sup> y por las subunidades reguladoras p22, p67, p47 y Rac 1 de manera pre-ensamblada, en espera de ser activado por su agonista. Al respecto, Li *et al*<sup>83</sup>, mencionan que en cultivo de células endoteliales no estimuladas, una porción importante del sistema de NADPH oxidasa se encuentra como complejo totalmente preensamblado y localizado en el espacio perinuclear, asociado al citoesqueleto, atribuyéndole a esta oxidasa una actividad constitutiva. Cabe señalar que se sabe muy poco sobre los eventos de ensamblaje del sistema NADPH oxidasa en células no fagocíticas. Por otro lado, los estudios de funcionalidad no son concluyentes sobre la participación de las proteínas Nox 1 y Nox 4 (Figura 16), así como p40<sup>phox</sup> (Figura 17), en la síntesis de  $H_2O_2$  estimulada por adrenalina, sin embargo, los estudios inmunológicos indican la presencia de estas isoformas de Nox en las MPH (Figuras 20, 21 y 22).

De acuerdo a los datos mostrados en este trabajo, la producción de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  podrían ser considerados como los efectores de un proceso de señalización ocasionado por la adrenalina y reconocidos como los ya existentes, tales como el AMPc, el  $IP_3$  y el  $Ca^{2+}$ . En la actualidad hay varios reportes que sugieren al  $H_2O_2$  como segundo mensajero<sup>4,10,11,84</sup>. Si bien, el  $H_2O_2$  es generado por las enzimas xantina oxidasa y la óxido nítrico sintetasa, así como en el citocromo P450 y en la mitocondria, no hay alguna evidencia convincente que relacione a estos con la activación de un receptor de superficie. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, se presenta en la Figura 21 un esquema hipotético para el arreglo molecular del sistema generador de  $O_2^{\bullet-}$  y en su momento  $H_2O_2$  a nivel de membrana plasmática del hepatocito, regulado por receptores adrenérgicos ( $\alpha_1, \beta$ ).

Se concluye en este trabajo que en el hígado de rata, la generación de ROS por la activación adrenérgica de una isoforma de Nox 2 parece ser un caso adicional al esquema generalizado de respuesta biológica en los diferentes tejidos y que involucra tres constituyentes que interactúan sucesivamente: una hormona o receptor susceptible a estimulación, una proteína perteneciente al grupo de la familia G que puede ser activada y una isoforma de Nox que genera un efector.

## PERSPECTIVAS

Se considera que el  $O_2^{\bullet-}$  y producto de dismutación, el  $H_2O_2$  sintetizado por la NADPH oxidasa en tejidos no fagocíticos está involucrado en procesos de señalización intra e intercelular más que en las respuestas de tipo inmune. En la actualidad, se sabe muy poco sobre el mecanismo por el cual el  $H_2O_2$  es generado en respuesta al estímulo de un receptor en células no fagocíticas, así como de las moléculas sobre las cuales actúa para propagar la señal y sobretodo, del mecanismo que controla oportunamente la remoción de  $H_2O_2$  en la célula. De ahí que la respuesta fisiológica o patológica de la Nox, podría inicialmente ser entendida a través de los siguientes puntos:

- Investigar si el sistema de NADPH oxidasa del hepatocito responde a alguna otra hormona, o bien, estudiar la posible interrelación que exista entre otras hormonas sobre la regulación de la actividad de esta oxidasa.
- Dilucidar el arreglo estructural de las proteínas que conforman la isoforma de Nox 2 en la membrana plasmática del hepatocito.
- Explorar los mecanismos de ensamblaje del complejo proteico de la isoforma de Nox 2 del hepatocito.
- Estudiar el papel metabólico del  $H_2O_2$  en el hepatocito en respuesta a la adrenalina.
- Investigar los factores que regulen la expresión de los genes que conforman el complejo proteico de la Nox del hepatocito.
- Estudiar el papel que juegan algunas moléculas del sistema antioxidante como el glutatión y las peroxidasas, en la remoción del  $H_2O_2$  en la célula.

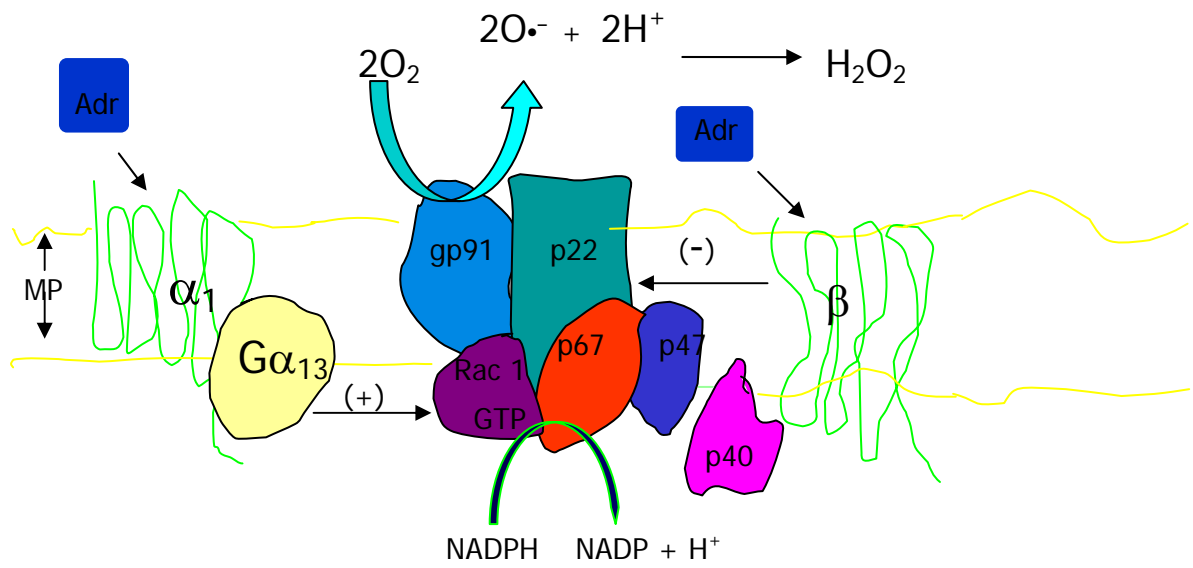


Figura 21. Nox 2 de hepatocito regulada por receptores adrenérgicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell B. and Gutteridge MCJ. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>a</sup> ed. N.Y. USA: Oxford University Press, Inc., 1999: p1-35.
2. Segal, WA. How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol* 2005; 23:197-223.
3. Thannickal JV, Fanburg LB. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L1005-L1028.
4. Rhee SG. Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31: 53-59.
5. Forman HJ, Torres M, Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 2002; 234/235: 49–62.
6. Czyzyk-Krzeska FM. Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Resp Physiol* 1997; 110: 99-11.
7. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313:17–29.
8. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999; 342:481-496.
9. Ray R, Shah MA. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci* 2005; 119:217–226.
10. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:S211–S215.
11. Cross RA, Segal WA. The NADPH oxidase of professional phagocytes prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004;1657:1-22.
12. Lambeth JD. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181-189.

13. Babior MB. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:42-47.
14. Babior MB. NADPH oxidase: An update. *Blood* 1999; 93:1464-1476.
15. Groemping Y, Rittinger K. Activation assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005; 386:401– 416.
16. Bokoch MG, Knaus GU. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 502-508.
17. Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b<sub>558</sub>. *Biochemistry* 1995; 34:16753–16757.
18. Dinauer MC, Pierce EA, Erickson RW, Muhlebach TJ, Messner H, Orkin SH, Seger RA, Curnutte JT. Point mutation in the cytoplasmatic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11231–11235.
19. Wallach TM, Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91 *phox*, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation *in vitro*. *Biochem J* 1997; 321:583–585.
20. Vignais PV, The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1428–1459.
21. Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 2003; 19:271–277.
22. Kami K, Takeya R, Sumimoto H, Kohda D. Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67phox, Grb2 and Pex13p. *EMBO J* 2002; 21:4268–4276.
23. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 338:677– 686.

24. Bokoch MG, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 2002; 100:2692-2696.
25. Hordijk LP. Regulation of NADPH oxidases the role of Rac proteins. *Circ Res* 2006; 98:453–462.
26. Werner E. GTPase and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 2004; 117:143-153.
27. Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. Novel homologs of gp91<sup>phox</sup>. *TIBS* 2000; 25:459–461.
28. Geiszt M, Leto LT. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004; 279:51715–51718.
29. Lambeth JD. Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:11-17.
30. Griendling KK, Ushio-Fukai M. NADH/NADPH oxidase and vascular function. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7:301–307.
31. Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91<sup>phox</sup> in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol* 2003; 171:299-306.
32. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase 3 constitutively produces superoxide in a p22<sup>phox</sup>–dependent manner: Its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* 2005; 280:23328–23339.
33. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, *et al.* The NAD(P)H oxidase homolog Nox 4 modulates insulin-stimulated generation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal traduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24:1844-1854.



34. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986; 137:3295-3298.
35. Suh Y, Arnold RS, Lassegue B. et al. Cell transformation by the superoxide generating oxidase Mox 1. *Nature* 1999; 40:79-82.
36. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51:794-798.
37. Crawford D, Zbinden I, Amstad P, Cerutti P. Oxidant stress induces the proto-oncogenes *c-fos* and *c-myc* in mouse epidermal cells. *Oncogene* 1988; 3:27-32.
38. Burdon R. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad Biol Med* 1995; 18:775-794.
39. Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Pra I, Rossi F.  $\beta$ -Amyloid activates the  $O_2^-$  forming NADPH oxidase in microglia, monocytes and neutrophils. *J Biol Chem* 1999; 274:15493-15499.
40. Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 273:5-9.
41. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. *Am J Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R277-R297.
42. Li J, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by Angiotensin II. *J Biol Chem* 2003; 278:12094-12100.
43. Li W, Miller JF, Zhang JH, et al.  $H_2O_2$ -induced  $O_2^{\bullet-}$  production by non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 2001; 276:29251-29256.

44. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35:297-306.
45. Wheeler DM, Kono H, Yin M, *et al.* The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Rad Biol Med* 2001; 31:1544-1549.
46. Kono H, Rusyn I, Uesugi T. *et al.* Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G1005-G1012.
47. Minicis S, Bataller R, Brenner AD. NADPH oxidase in liver: Defensive, offensive, or fibrogenic?. *Gastroenterology* 2006; 131:227–275.
48. Castrejon-Sosa M, Villalobos-Molina R, Guinzberg P, Piña E. Adrenalina (via  $\alpha_{1B}$ -adrenoreceptors) and ethanol stimulate  $OH \cdot$  radical production in isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 2002; 71:2469 –2474.
49. Roberts SM, DeMott RP, James RC. Adrenérgic modulation of hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 1997; 29:329-353.
50. Metha JL, Li D. Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells. *Free Rad Bio Med* 2001; 30:148-153.
51. Bleeke T, Zhang H, Madamanchi N, Patterson C, Faber EJ. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ Res* 2004; 94:37-45.
52. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Beck-Grether S. Involvement of NADPH oxidase isoforms and serc family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280:27179–27194.

53. Reinehr R, Becker S, Braun J, Eberle A, Grether-Beck S, Häußinger D. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281:23150–23166.
54. Pepperl DJ, Regan JW. The adrenergic receptors, *CRC Handbook of receptors and channels: Vol. 1. G-Protein Coupled Receptors*. Peroutka SJ (ed). CRC Press Inc., 1993; 45-78.
55. Lomasney JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG. Molecular biology of adrenergic receptors: implications for receptor classification and structure-function relationships. *Biochem Biophys Acta* 1991b; 1095:127-139.
56. Fain JN, García-Sainz JA. Role phosphatidylinositol turnover in alpha1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha2 effects of atecholamines. *Life Sci* 1980; 26:1183-1194.
57. Guerra GR. 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 de licenciatura). México (DF) México: FMVZ-UNAM, 2004.
58. Berry MN, Friend DS. Isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1969; 43:506–520.
59. Guinzberg R, Laguna I, Zentella A, Guzman R, Piña E. effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J* 1987; 245:593–599.
60. Davies R, Cain K, Edwards RE, Snowden RT, Legg RF, Nel GE. The preparation of highly enriched fractions of binucleated rat hepatocytes by centrifugal elutriation and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 1990; 190:266–270.

61. Wanson JC, Bernaert D, Penasse W, Mosselmans R, Bannash P. Separation in distinct subpopulations by elutriation of liver cells following exposure of rats to N-nitrosomorpholine. *Cancer Res* 1980; 40:459–471.
62. Touster O. Isolation of rat liver plasma membranes. *J Cell Biol.* 1970; 47: 604 – 628.
63. Kinf TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Meth Enzymol* 1967; 10:322–331.
64. Morré J. Isolation of Golgi apparatus. *Meth Enzymol.* 1971; 22:131-141.
65. Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrana-bound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system that is activated by insulina via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 1992; 89:1006–1013.
66. Curnutte TJ, Karnovsky LM, Babior MB. Manganese-dependent NADPH oxidation by granulocyte paricles. *J Clin Inv* 1976; 57;1059-1067.
67. Minelli A, Allegrucci C, Rosati R, Mezzasoma I. Regulation of agonist-receptor binding by G proteins and divalent cations in spermatozoa solubilized A1 adenosine receptors. *Mol Gen Metab* 1998; 63:183-190.
68. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
69. Fioravanti CF, Reisig JM. Mitochondrial hydrogen peroxide formation and fumarato reductase of *hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 1990; 76:457–463.
70. Allen RC. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: A kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 1986: 133:449– 493.
71. Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989

72. Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Nomenclature supplement adrenoreceptors. *Trend Pharmacol Sci* 2001; 12: 1 -146.
73. Rossby SP, Cornett LE. Steady state levels of hepatic alpha- and beta 2-adrenergic receptors and gene transcripts during development of the male rat. *J Cell Physiol* 1991; 147: 55 – 61.
74. Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S. Receptor-dependent RhoA Activation in G<sub>12/13</sub>-deficient cells. *J Biol Chem* 2003;278: 28743 – 28749.
75. Hur Eun-Mi, Kyong-Tai K. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 2004; 14: 397 – 405.
76. Patel TB. Single Transmembrane Spanning Heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 371 – 385.
77. Takeya R, Ueno N, Kami K, *et al.* Novel human homologues of p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> participate in activation of superoxide-production NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003; 278:25234-25246.
78. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:677-689.
79. Diebold BA, Fowel B, Lu J, Dinauer MC, Bokoch GM. Antagonist cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004; 279:28136-28142.
80. Quinn TM, Gauss AK. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 2004; 76:760-781.
81. Vergnaud S, Paclet MH, El BJ, *et al.* Complementation of NADPH oxidase in 67-phox-deficiente CGD patients: p67.phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* 2000; 267:1059-1067.

82. DeLeo FR, Ulman KV, Davis AR, *et al.* Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67<sup>phox</sup> and flavocytochrome b to a common functional domain in p47<sup>phox</sup>. *J Biol Chem* 1996; 271:17013-17020.
83. Li Jian-Mei, Shah MA. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:19952–19960.
84. Stone RJ, Yang Suping. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:243-270.

## Adrenaline stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in liver via NADPH oxidase

ANTONIO DÍAZ-CRUZ<sup>1</sup>, RAQUEL GUINZBERG<sup>2</sup>, RUY GUERRA<sup>1</sup>, MAGDALENA VILCHIS<sup>2</sup>, DANIEL CARRASCO<sup>3</sup>, FRANCISCO J. GARCÍA-VÁZQUEZ<sup>3</sup>, & ENRIQUE PIÑA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico, <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, UNAM, P.O. Box 70159, Mexico City, Mexico, and <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Pathology, National Institute of Pediatrics (INP), Ministry of Health, Mexico City, Mexico

Accepted by Professor N. Taniguchi

(Received 24 November 2006; in revised form 15 January 2007)

### Abstract

It is known that adrenaline promotes hydroxyl radical generation in isolated rat hepatocytes. The aim of this work was to investigate a potential role of NADPH oxidase (Nox) isoforms for an oxidative stress signal in response to adrenaline in hepatocytes. Enriched plasma membranes from isolated rat liver cells were prepared for this purpose. These membranes showed catalytic activity of Nox isoforms, probably Nox 2 based on its complete inhibition with specific antibodies. NADPH was oxidized to convert O<sub>2</sub> into superoxide radical, later transformed into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This enzymatic activity requires previous activation with either 3 mM Mn<sup>2+</sup> or guanosine 5'-0-(3-thiotriphosphate) (GTPγS) plus adrenaline. Experimental conditions for activation and catalytic steps were set up: ATP was not required; S<sub>0.5</sub> for NADPH was 44 μM; S<sub>0.5</sub> for FAD was 8 μM; NADH up to 1 mM was not substrate, and diphenylpicrylhydrazyl was inhibitory. Activation with GTPγS plus adrenaline was dose- and Ca<sup>2+</sup>-dependent and proceeded through α<sub>1</sub>-adrenergic receptors (AR), whereas β-AR stimulation resulted in inhibition of Nox activity. These results lead us to propose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as additional transduction signal for adrenaline response in hepatic cells.

**Keywords:** Adrenergic receptors, adrenaline, hydrogen peroxide, liver cell membranes, NADPH oxidase (Nox), ROS signaling

**Abbreviations:** AR, adrenergic receptors; DPI, diphenylpicrylhydrazyl; EHCPM, enriched hepatic-cell plasma membranes; Glc 6-Pase, glucose 6-phosphatase; GPCR, G protein-coupled receptors; GTPγS, guanosine 5'-0-(3-thiotriphosphate); Nox, NADPH oxidase; ROS, reactive oxygen species; SuccDH, succinate dehydrogenase

### Introduction

Generation of reactive oxygen species (ROS) in phagocytes as its microbe-killing mechanism involved a catalytic subunit gp91<sup>phox</sup>, a stabilizer subunit p22<sup>phox</sup>, and some modular proteins including p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, and the small GTPase Rac [1]. Catalytic subunit gp91<sup>phox</sup>, also known as NADPH oxidase 2 (Nox 2), is embedded in phagosome membrane, FAD and NADPH binding sites are located in its cytoplasmic domain. In resting

phagocytes, Nox 2 is dormant but becomes activated during phagocytosis to produce the superoxide radical, which by dismutation generates hydrogen peroxide [2,3]. Identification of ROS-generating oxidases in non-phagocytic cells, as well as increased information available in genome databases, led to the discovery of proteins with the homology with specific structural regions of gp91<sup>phox</sup>, then grouped into Nox family [4–6]. For mammals, there are currently seven members of the family: Nox 1 through Nox 5, and

Correspondence: A. Díaz-Cruz, Department of Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UNAM, P. O. Box 70159, 04510 México DF, México. Tel: 52 55 5622 5906. Fax: 52 55 5622 5907. E-mail: adc@servidor.unam.mx

the dual oxidases Duox 1 and Duox 2 [3]. Function and expression regulation of these proteins in non-phagocytic cells are under study. Initial evidence of the presence of NADPH oxidase in liver was published in 2001 and deals with the presence of Nox 4 and 5 isoforms in human fetal liver [7]. A recent report showed that isolated rat hepatocytes cultured for 24 h expressed mRNAs of Nox 1, Nox 2 (gp91<sup>phox</sup>), Nox 4, Duox 1, and Duox 2, as well as the regulatory subunit p47<sup>phox</sup>; in addition, gp91<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> were also identified at the protein level [8]. In such experiments, activation of NADPH oxidase isoforms was associated with CD95 ligand-induced apoptosis in rat hepatocytes [8]. Once the presence of mRNA for several Nox and the existence of gp91<sup>phox</sup> in hepatic cells were demonstrated, it was decided in the present study to look for the identification of a catalytic activity for NADPH oxidase isoforms in these cells. In previous studies, it has been shown that adrenaline promotes, in a concentration-dependent manner via the activation of  $\alpha_{1B}$  adrenoceptors, hydroxyl radical production in rat hepatocytes [9]. Therefore, the initial goal of this study was to investigate the role of Nox isoforms from liver cells in generate ROS, and then to prove a potential activation of these isoforms through the stimulation of G protein-coupled receptor (GPCR) responding to adrenaline.

## Materials and methods

### Materials

MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid], MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, MOPS [4-morpholinepropanesulfonic acid], GTP $\gamma$ S, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, FAD, NADPH, trichloroacetic acid, collagenase, diphenyleneiodonium chloride (DPI), adrenaline, ATP, NADH, cytochrome *c*, prazosin, yohimbine, rauwolfscine, propranolol and bovine serum albumin were obtained from Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA; protease inhibitor cocktail from MP Biochemicals, Inc. Solon, OH, USA; antibodies against Nox 1, Nox 2, and Nox 4 proteins {Nox 1 (H-75): sc-25545, gp91-phox, (K-15): sc-5826, and Nox-4 (N-15): sc 21860} from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

### Cell isolation

All animal experiments were conducted according to the Federal Guidelines for the Care and Use of Animals (NOM 062-Z00-1999, Ministry of Agriculture, Mexico) and the study protocol was approved by the Institutional Committee of the National Autonomous University of Mexico's (UNAM's) Faculty of Medicine. Male Wistar rats of 200–250 g body weight fed *ad libitum* and with free access to water were used. Hepatic cells were isolated by collagenase digestion in 10 mM glucose dissolved in Ca<sup>2+</sup>-free Ringer Krebs

bicarbonate, pH 7.4 [10], and viability was determined by trypan blue exclusion; experiments were performed when >90% of cells excluded the dye. *In vivo* treatment with GdCl<sub>3</sub> was followed with some animals to prepare isolated hepatocytes deprived of Kupffer cells, the resident hepatic macrophages [11]. In our research group's previous experiments, this was verified by commercial mouse monoclonal antibody (Serotec, Oxford, UK), which specifically recognizes a membrane glycoprotein in leukocytes [12].

### Hepatic-cell plasma membrane preparation

Isolated hepatic cells from a liver maintained in 10 ml of Ca<sup>2+</sup>-free Ringer Krebs bicarbonate, pH 7.4, were supplemented with 1 ml protease inhibitor cocktail and homogenized in a Teflon-glass Potter Elvehem homogenizer during 2 min at 4°C and then mixed with 100 ml of lysis buffer (containing 20 mM MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid], pH 5.8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 5 mM KCl) at 4°C. Cell lysis was completed by vigorous mechanical shaking during 5 min. The lysate was subjected to the protocol summarized in Figure 1, and the corresponding results are reviewed in the Results section.

### Activation of Nox from enriched hepatic-cell plasma membranes

Enriched hepatic-cell plasma membranes (EHCPM, precipitate 3 in Figure 1) showed scarce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

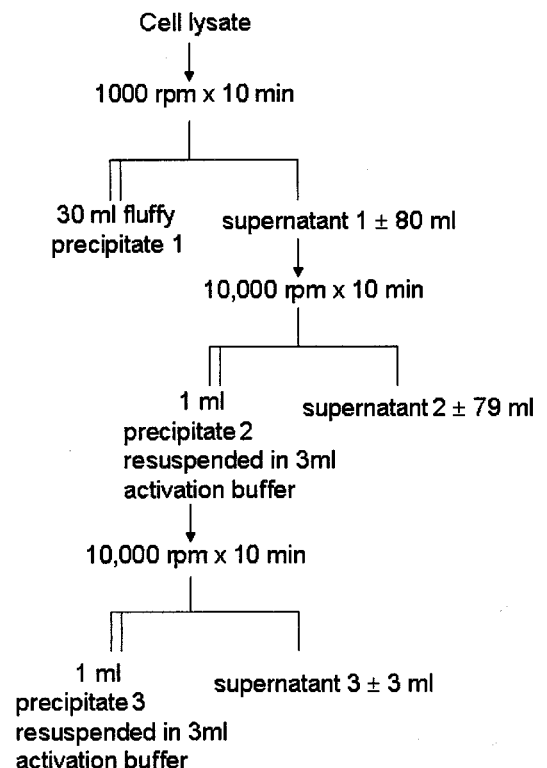


Figure 1. Summarized protocol to prepare enriched hepatic cell plasma membranes from isolated rat liver cells.



generation in the presence of NADPH, in a similar manner to that of phagocytes in the absence of phagocytosis. Activation of a dormant Nox enzyme in this preparation appears desirable. After several assays, the following regular protocol to activate the enzyme was adopted: EHCPM (20 µg protein) were resuspended in up to 1 ml of activation buffer (containing 120 mM NaCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 1.4 mM CaCl<sub>2</sub> dissolved in 30 mM [4-morpholinepropanesulfonic acid] (MOPS) adjusted to pH 7.4) and incubated for 2 min at 37°C with 3 mM MnCl<sub>2</sub>. In order to study further important aspects of hepatic Nox activation, experiments were conducted using different concentrations of Mn<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> in the activation buffer, to which one or more of the following reactants including GTPγS, ATP, commercial antibodies against Nox isoforms, diphenyleneiodonium chloride (DPI, a non-specific Nox inhibitor), adrenaline, and selective antagonists for particular AR, were added, maintaining the final volume constant. The activation step ended with centrifugation at 10,000 rpm during 5 min, the supernatant was discarded, and the pellet was the enzyme source for the Nox-isoform catalytic step.

#### Enzymatic assay

Immediately after activation, membranes were resuspended in 540 µl of catalysis buffer (containing 120 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>, and 100 µM FAD dissolved in 20 mM MES, pH 6.0) at 37°C. Enzymatic reactions were started by addition of 60 µl of 0.25 mM NADPH dissolved in catalysis buffer and were terminated after 4 min at 37°C by adding 1.5 M trichloroacetic acid. Samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant was used to quantitate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described by Fioravanti [13]. In selected experiments addition of trichloroacetic acid was omitted and the enzymatic activity was determined by measuring the disappearance of NADPH at 340 nm. Furthermore, to prove that superoxide radical was formed prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferricytochrome *c* was included in the incubation

mixture before the addition of NADPH to trap the generated superoxide radical and to prevent its conversion into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as suggested by Allen [14].

#### Other assays

Succinate dehydrogenase (SuccDH) catalytic activity in liver fractions was measured as described by Scott et al. [15], and glucose-6-phosphatase and 5' nucleotidase activity in the same liver fractions was measured as detailed by Aronson and Touster [16]. Protein concentration was determined with the Bradford method [17].

#### Statistical analysis

Values are expressed as means ± standard error (SE). Student *t*-test was applied to assess intergroup differences.

## Results

#### Identification of NADPH oxidase activity

In preliminary experiments, a low but measurable activity consuming NADPH and forming H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was detected in the supernatant of the cell lysate obtained after 10 min of centrifugation at 1000 rpm as outlined in Figure 1. The procedure presented in Figure 1 was followed to enrich the fraction containing plasmatic-cell membranes, and data on the presence of characteristic enzymes located in sub-cellular membranes [16] are included in the table. Comparing precipitate 3 with lysate data, it can be observed that 5' nucleotidase activity, an index of cell-plasma membrane, increased its specific activity and there was a 25% recovery (Table I). Contrariwise, SuccDH from mitochondrial membrane and glucose 6 phosphatase from endoplasmic reticulum decreased their specific activity, and their recovery was 5% or even less in the same fraction identified as precipitate 3 (Table I). Therefore, despite a low yield of plasma membranes we decided to use precipitate 3 as a source of Nox

Table I. Specific and total activity of marker enzymes in sub-cellular membranes recovered from protocol in Figure 1.

Fraction	Specific activity*			Total activity†		
	5' nucleotidase	Glc 6-Pase	SuccDH	5' nucleotidase	Glc 6-Pase	SuccDH
Cell lysate	246.0 ± 6.0	0.119 ± 0.015	0.042 ± 0.009	11.7 ± 0.26 (100)‡	6.0 ± 0.06 (100)	2.20 ± 0.40 (100)
Precipate 1	165.0 ± 1.0	0.078 ± 0.008	0.008 ± 0.001	4.8 ± 0.08 (41)	6.3 ± 0.45 (105)	0.40 ± 0.08 (18)
Supernatant 1	62.0 ± 4.0	0.056 ± 0.009	0.008 ± 0.001	1.0 ± 0.10 (9)	2.1 ± 0.70 (35)	0.24 ± 0.07 (11)
Precipitate 2	196.0 ± 8.0	0.124 ± 0.019	0.015 ± 0.004	0.05 ± 0.02 (5)	0.7 ± 0.20 (12)	0.03 ± 0.01 (1)
Supernatant 2	62.0 ± 4.0	0.0	0.017 ± 0.003	0.9 ± 0.06 (1)	0.0 (-)	0.10 ± 0.02 (5)
Precipitate 3	3454.0 ± 50.0	0.07 ± 0.009	0.006 ± 0.001	3.0 ± 0.08 (26)	0.3 ± 0.05 (5)	0.06 ± 0.03 (3)
Supernatant 3	65.0 ± 4.0	0.0	0.0	0.03 ± 0.01 (3)	0.0 (-)	0.0 (-)

\* In µmoles/mg prot × min<sup>-1</sup>; † in µmoles/min per total fraction; ‡ in parenthesis values in per cent, assuming 100 in cell lysate and the relative recovery of total activity in other fractions. Values are means ± standard error (SE) of three independent experiments.

isoforms. This protocol was simple, fast, and reproducible. The activation procedure as described in Materials and Methods was inspired by the activation of Nox enzyme from human adipocytes [18]; in particular, 3 mM  $MnCl_2$  was included in the activation buffer, which potentiated the effects of GTP in some systems [19,20]. Thereafter, aliquots containing 20  $\mu$ g of protein from plasma membranes were incubated for 2 min at 37°C in the activation buffer. Samples were spun at 10,000 rpm for 5 min, the supernatant was eliminated, and the precipitate was resuspended in catalysis buffer to measure enzymatic activity. Conditions for measuring enzymatic activity were established: pH for activation and catalysis steps, linear dependency for protein concentration, and times for measuring activation and catalysis within the linear section of the curve (Figure 2). ATP (1 mM) decreased the herein reported generation of  $H_2O_2$  (Figure 2), probably by chelating  $Mn^{2+}$  ions required for the activation step (Figure 3).

Of paramount relevance is the fact that activation of the system and the enzymatic activity of Nox isoforms were observed in isolated hepatic cells that had been devoided of Kupffer cells by treatment with  $GdCl_3$ , i.e. the resident hepatic macrophages are not mainly involved in the measured enzymatic activity, as indicated in further experiments of this work in which 0.5  $V_{max}$  were quite similar in hepatic cell samples in the presence or absence of Kupffer cells.

#### *Further characterization of the system*

Increasing  $Mn^{2+}$  concentrations for the activation step in Nox catalytic activity is shown in Figure 3A. Results suggest that Nox isoform activation is directly related with the logarithm of  $Mn^{2+}$  supraphysiologic concentrations employed, which is observed by an increase in catalytic activity measured as  $H_2O_2$  generation. In this work, 3 mM of  $Mn^{2+}$  was used for to activate the system, as described in other cases [18–20]. The first product of NADPH oxidase is the superoxide radical instead of  $H_2O_2$ ; to assess this in hepatic Nox isoforms, we conducted an experiment (Figure 3B), i.e. increasing ferricytochrome *c* concentrations were added to the complete incubation mixture prior to addition of the substrate, thus reacting with generated superoxide and avoiding  $H_2O_2$  formation. At the end of the reaction (4 min incubation with NADPH), the  $H_2O_2$  amount was compared with and without cytochrome *c*. As observed in Figure 3B, cytochrome *c* ( $Fe^{3+}$ ) reacted with the superoxide radical, and this avoiding  $H_2O_2$  synthesis. In another set of experiments, we conducted NADPH disappearance at 340 nm, finding that the oxidized NADPH was approximately equal to the  $H_2O_2$  formed. The results obtained on modifying NADPH, NADH, and FAD concentrations in our

experimental system are presented in Figure 4A and B.  $Mn^{2+}$ -activated Nox isoenzyme activity demonstrated a classic Michaelis kinetics on raising NADPH and FAD concentrations. NADPH is indispensable for registering enzymatic activity; the required concentration for obtaining 0.5  $V_{max}$  falls within the range of 44  $\mu$ M this value changed to 69  $\mu$ M in membranes prepared from rats previously treated with  $GdCl_3$ , (Figure 4A), thus emphasizing the idea of the impossibility of Kupffer cells as enzyme source for the herein reported experiments. In experiments reported in this work, we utilized a final concentration of 250  $\mu$ M NADPH. In the absence of FAD, we obtained a basal activity of approximately 6% of the maximum activity recorded on modifying FAD concentration in the catalytic buffer. The concentration required for obtaining 0.5  $V_{max}$  was 8  $\mu$ M, and we added a final concentration of 100  $\mu$ M during the remainder of this work (Figure 4B). NADH assayed up to concentrations of 1 mM was not employed as the substrate of this  $H_2O_2$ -generating system (Figure 4A). It has been consistently reported that DPI is a Nox inhibitor [21]; when it was added during the activation stage to concentrations of  $1 \times 10^{-6}$  M, it inhibited  $H_2O_2$  generation by 50%, the inhibition greater at greater DPI concentrations.

#### *Adrenergic receptors and Nox activity*

During the activation stage of the system with  $MnCl_2$ , we added adrenaline and additionally substituted the supraphysiologic concentration of  $Mn^{2+}$  with the GTP analog,  $GTP\gamma S$ , which maintains protein G activation. Results demonstrated that activation of the system with  $Mn^{2+}$  elevated enzymatic activity, and that this catalytic activity rose even more on adding adrenaline, while activation of the system with  $GTP\gamma S$  did not increase enzymatic activity but was elevated on additionally adding adrenaline (Figure 5). The experiment was repeated, eliminating  $Mn^{2+}$  from the activation buffer and adding  $GTP\gamma S$ , supplemented or not, with increasing concentrations of adrenaline. Basal enzymatic activity rose proportionally to the adrenaline concentration employed in the experiment (Figure 6). Subsequently and by use of antagonists selected for each of the participating AR sub-types, we investigated the receptor involved in the studied response. We utilized prazosin to inhibit  $\alpha_1$ -ARs, yohimbine, and rauwolscine to inhibit  $\alpha_2$ -ARs, and propranolol to inhibit  $\beta$ -ARs [22]. The procedure we employed comprised stimulating the system by supplementing the activation buffer with  $GTP\gamma S$ , adrenaline, and a cocktail with three selective AR antagonists to inhibit two adrenoreceptor sub-types; thus in each case, only the AR sub-type to which no antagonist was added could be activated with adrenaline. The receptor cited in Figure 7 is that which was not inhibited and that in case of being activated could

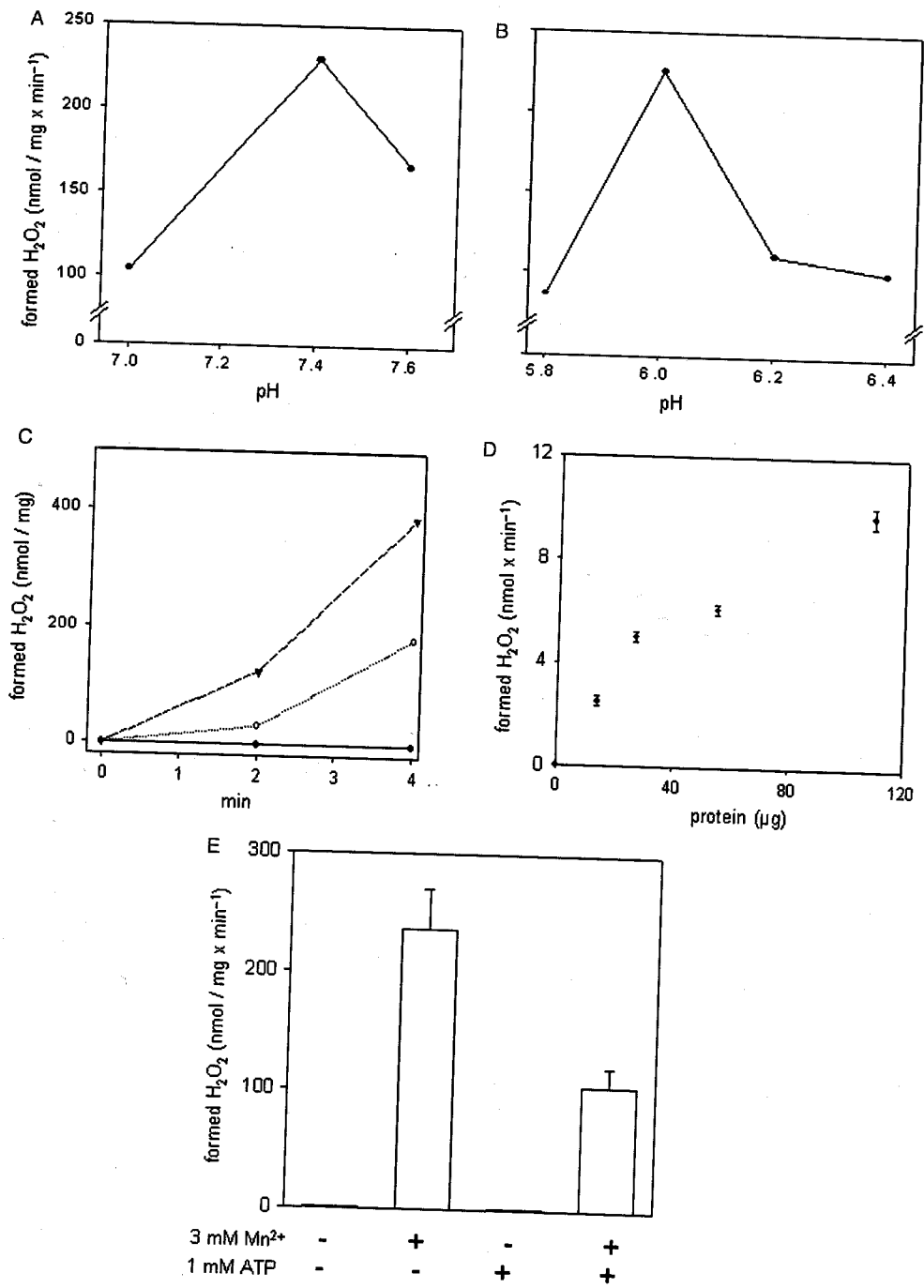


Figure 2. Basic experimental conditions to generate  $H_2O_2$  by an NADPH oxidase present in plasma membranes (fraction 3, Figure 1), prepared from isolate rat hepatocytes. In all cases, generation  $H_2O_2$  was used to detect the enzymatic activity, maintaining identical experimental conditions for the experiments in each panel in which one single variable was tested. A. pH activation: activation time 25 min, catalysis time 10 min, protein concentration 100 µg, catalysis buffer pH 7.4. B. pH catalysis: identical conditions as in A but activation buffer pH 6.0. C. Enzymatic reaction as a function of time: activation buffer pH 7.4, catalysis buffer pH 6.0, protein concentration per sample 10 µg, formation of  $H_2O_2$  as a function of time after 0 min (●), 1 min (○), or 2 min (▼) of activation. D. protein concentration dependency of the reaction: activation time 2 min, catalysis time 4 min, activation buffer pH 7.4, catalysis buffer pH 6.0. E. Effect of ATP: identical conditions as in D but using 20 µg of membrane protein per experimental tube,  $Mn^{2+}$  and ATP were included to the activation step. Typical experiments performed in duplicate are present in panels A, B, and C. Average of duplicate experiments repeated three times are presented in panels D and E.

respond to the presence of adrenaline. With the procedure employed, maximum response to adrenaline was observed on stimulating the  $\alpha_1$ -ARs. On the other hand, it is interesting that ARs  $\alpha_1$ ,  $\alpha_{2A}$ , and  $\alpha_{2B}$ , on remaining inhibited, afforded an observation of

inhibition in  $H_2O_2$  synthesis by NADPH (Figure 7); this inhibition disappeared with the addition of propranolol. Both data suggest that activation of AR  $\beta$  produces Nox isoform activity inhibition and a lower generation of  $H_2O_2$ , nearly 60%, in relation to the

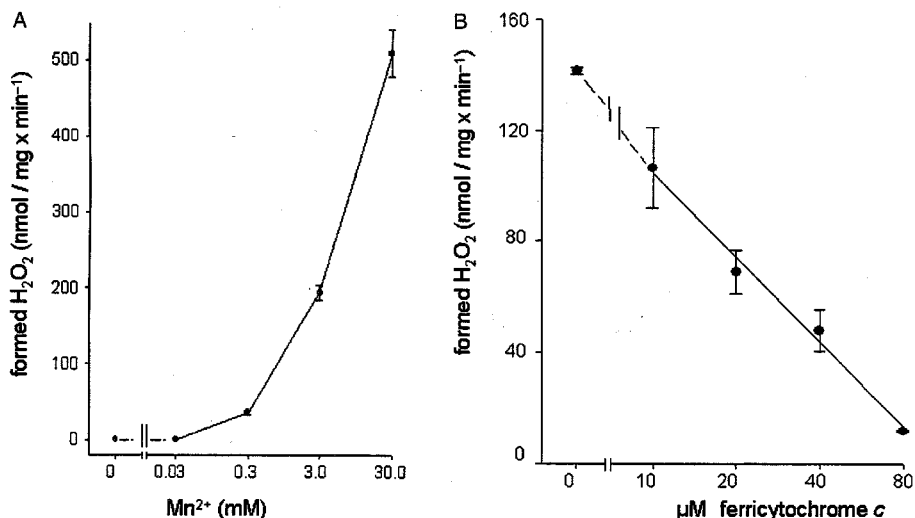


Figure 3. A: NADPH oxidase (Nox) isoform enzymatic activity of enriched hepatic-cell plasma membrane (EHCPM) previously activated with increasing concentrations of Mn<sup>2+</sup> as indicated in the figure, added to the activation buffer. B: Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by EHCPM previously activated with 3 mM Mn<sup>2+</sup> in the presence of increasing concentration of ferricytochrome *c* as indicated in the figure, and added to the catalysis buffer. Values are means  $\pm$  standard error (SE) of three independent experiments.

basal activity (Figure 7). Figure 6 also depicts the dose-response curve of the  $\alpha_1$  receptor to adrenaline in the presence of selected antagonists for ARs  $\alpha_2$  and  $\beta$ . The response is very similar to that obtained in the absence of the selected antagonists, indicating an abundance of AR  $\alpha_1$  in the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from NADPH in rat-hepatocyte plasmatic membranes, and that AR  $\beta$ -mediated inhibition in Nox isoform activity was solely observed on maintaining AR  $\alpha_1$  inactive. An initial attempt to identify a Nox isoform responsible for the described enzymatic reaction was conducted using commercial antibodies against Nox 1, Nox 2, and Nox 4 proteins. Results in Figure 8 suggest that Nox 2 is the main catalytic isoform present in liver exhibiting NADPH oxidase activity under the experimental conditions detailed in this work. Additional experiments are required to interpret the results obtained for Nox 1 and Nox 4 (Figure 8), as

well as to identify in liver samples the presence of other Nox 2 activity-associated proteins in phagocytes, such as p22<sup>phox</sup>, Rac, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, and p67<sup>phox</sup>. Finally, we found that the effect of 1  $\mu$ M adrenaline on  $\alpha_1$ -ARs promoting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis is partially dependent on Ca<sup>2+</sup>: on eliminating CaCl<sub>2</sub> from the activation buffer, the response was 60% less than in the presence of the cation. In addition, the effect of 1  $\mu$ M of adrenaline was completely blocked by the addition of 10  $\mu$ M DPI during the activation stage.

## Discussion

In this work, we reported on the enzymatic system present in the EHCPM whose functional capacity based on information available for phagocytes [3] corresponds to that of Nox isoforms. These findings increase information on the presence of mRNAs for

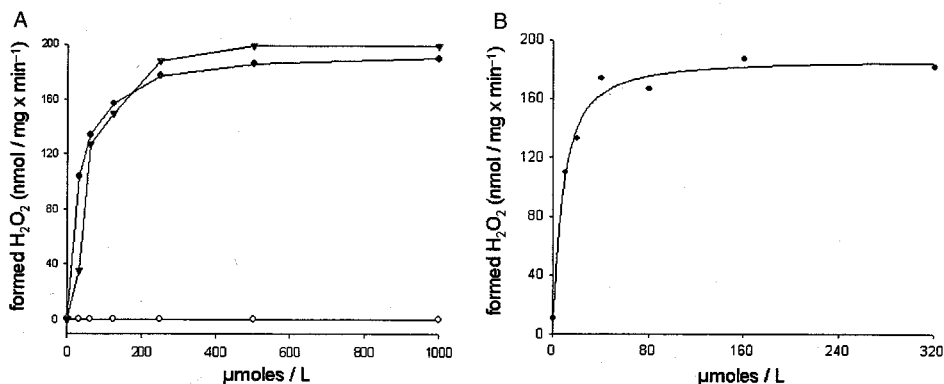


Figure 4. Nox isoform enzymatic activity of EHCPM previously activated with 3 mM Mn<sup>2+</sup> as a function of increasing concentrations of NADPH in fraction prepared from control (●) or GdCl<sub>3</sub> treated rats (▼), and NADH (○) in panel A, and FAD in B. Data in the figures are representative of three independent experiments with very similar results.

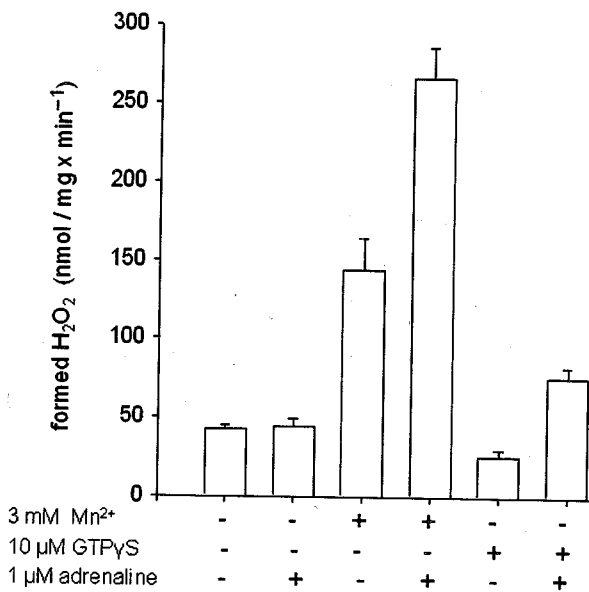


Figure 5. Effect of 1 μM adrenaline on Nox isoform enzymatic activity from EHCPM previously activated with either Mn<sup>2+</sup> or GTPγS as indicated in the figure. Values are means ± standard error (SE) of three independent experiments.

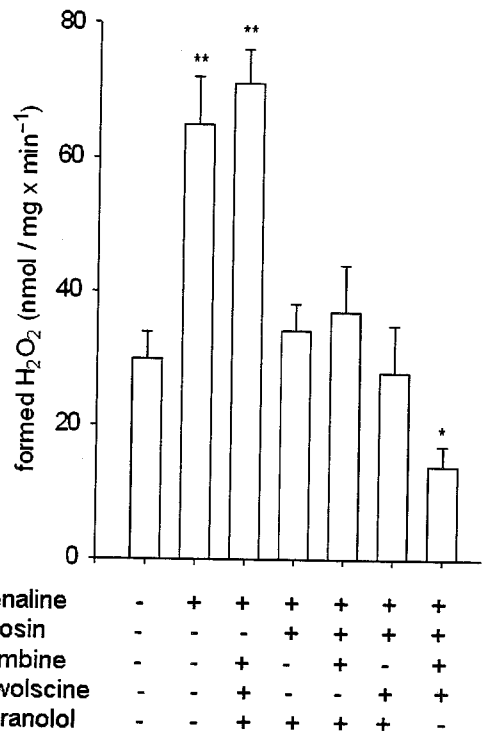


Figure 7. Effect of four adrenergic receptor (AR) selective antagonists on Nox isoform enzymatic activity from EHCPM previously activated with 10 μM GTPγS. Adrenaline was used at a final concentration of 1 μM. Antagonists indicated in the figure were used at a final concentration of 0.1 μM. Values are means ± standard error (SE) of three independent experiments. Statistically different values comparing results with basal values: \*P < 0.05; \*\*P < 0.001.

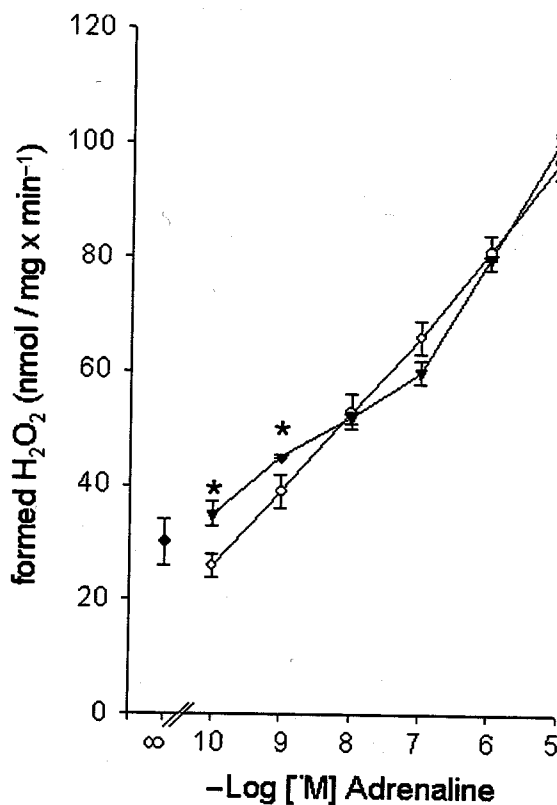


Figure 6. Dose response of increasing concentrations of adrenaline on Nox isoform enzymatic activity from EHCPM previously activated with 10 μM guanosine 5'-0-(3-thiotriphosphate) (GTPγS). Adrenaline alone (○), and adrenaline plus 0.1 μM of the following adrenergic receptor (AR) antagonists: yohimbine; rauwolscine, and propranolol (▼). Values are means ± standard error (SE) of three independent experiments. Statistically different values comparing results of adrenaline alone vs. adrenaline plus AR antagonists: \*P < 0.05.

Nox 4 and 5 isoforms in human fetal liver [7] and for Nox 1, Nox 2, and Nox 4 in cultured rat hepatocytes [8]; in these cell cultures, Nox 2 and p47<sup>phox</sup> were also identified by Western blots assays [8]. According to our findings, the liver NADPH oxidase system is dormant and requires an activation stage, and the greatest specific activity was obtained in enriched plasmatic membranes (Figure 1). Enzymatic activity increases with exogenous FAD (Figure 4B) and is inhibited by DPI (see Results), which suggests the presence of a flavoprotein in the exchange of electrons within NADPH—that disappears on following the spectrophotometric reaction—and the molecular oxygen from which the superoxide radical is formed that can be bound by ferricytochrome c (Figure 3B), or that can even react with H<sub>2</sub>O to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NADPH was not substituted by NADH (Figure 4A). The reaction disappears on heating the protein; this possesses an optimal pH of 7.4 for the activation stage and of 6.0 for the catalytic stage; it is time-linear (Figure 2) and persists on eliminating *in vivo* rat liver Kupffer cells (Figure 4A).

Basal Nox activity in the absence of activation can be the response to the moderate stress state in which rats are found and that perhaps corresponds to a part of *in vivo* Nox activity regulation. On taking

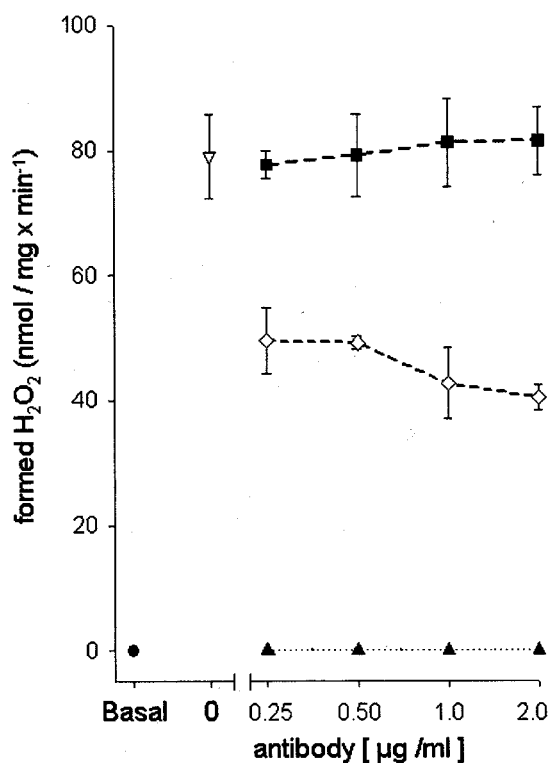


Figure 8. Effect of commercial antibodies prepared against particular NADPH oxidase (Nox) isoforms (Nox 1  $\diamond$ --- $\diamond$ , Nox 2  $\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$  and Nox 4  $\blacksquare$ --- $\blacksquare$ ) on NADPH oxidase enzymatic activity present in EHCPM activated with  $10\ \mu\text{M}$  (GTP $\gamma$ S) and a cocktail of  $1\ \mu\text{M}$  adrenaline plus  $0.1\ \mu\text{M}$  of the following antagonist: yohimbine; rauwolfscine, and propranolol. Values are means  $\pm$  standard error (SE) of three independent experiments.

conditions in rat management to the extreme, basal activity reached nearly zero. With these basal values, the strength of this work was oriented toward reviewing the NADPH oxidase *in vitro* activation present in EHCPM. Use of a supraphysiologic concentration of  $\text{Mn}^{2+}$  or the addition of GTP $\gamma$  S allows us to suggest that the initial activity of some G protein occasions the later activation of the catalytic subunit of some Nox isoform. This is supported by previous work in phagocyte cells: Rac-2 can directly bind with cytochrome  $b_{558}$ , comprising Nox 2 and  $p22^{\text{phox}}$  in a GTP-dependent manner [23], and recent work has shown that cytosol-recruited Rac GTPases play a central role in regulating ROS production and other neutrophil functions [23–25]. In liver cells, it might be argued that G proteins are already present in the plasma membranes and are coupled with hormonal receptors, among others, with adrenergic receptors. In the case of  $\text{Mn}^{2+}$ , G protein activation is sufficient to demonstrate catalytic activity and can be equivalent to the activation of other Nox with phorbol esters [26] or with arachidonic acid [3]. It is noteworthy that Nox activation with  $3\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  is sensitive to the presence of  $10^{-6}\ \text{M}$  adrenaline (Figure 5), which permits us to suppose that the

activated protein G is interacting on the one hand with the hormone-receiving AR, and on the other with the cytochrome  $b_{558}$  that responds by increasing its activity.

GTP $\gamma$ S reminds the G protein physiological activator, but on impeding its hydrolysis protein G remains switched on. Treatment of EHCPM with GTP $\gamma$ S is insufficient for increasing the Nox isoform's catalytic activity unless adrenaline is added (Figure 5); for its part, adrenaline alone does not activate Nox. It is important to underscore that the activation response is proportional to the adrenaline dose utilized (Figure 6). With the use of inhibitors selected for each AR, we were able to identify the receptors involved in the described response. The response that is most important quantitatively was that of the activation of a Nox isoform by means of  $\alpha_1$  receptors (Figure 7). Note that this is the most abundant of rat hepatocytes [27] and the one that is bound to the  $G_{q/11}$  protein [28]. Coincidentally, the response to the  $\alpha_1$  receptor stimulus elevates the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [28], and adrenaline-mediated activation of the hepatic Nox isoform is sensitive to changes in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (see Results). In experiments employing adrenaline doses within the range of  $10^{-10}$ – $10^{-9}\ \text{M}$  and in which adrenergic antagonists were added, a greater statistically significant response was observed, in comparison with experiments in which these agonists are absent (Figure 6). This greater response in the presence of adrenergic antagonists can be due to propranolol's inhibitory action on adrenaline-stimulated  $\beta$  receptors, thus avoiding the reported inhibitory effect of activated  $\beta$ -ARs on Nox catalytic activity (Figure 7). Based on initial experimental evidence, complete NADPH oxidase enzymatic activity inhibition in the presence of an antibody prepared against  $gp91^{\text{phox}}$  (Figure 8) lead us to suggest that the isoform mainly involved in the adrenergic agonist response is the Nox 2 isoform.

Alpha $_1$ -mediated adrenaline receptor action on hepatic Nox isoform activation and ROS generation can be of physiologic importance for one or more of the following complementary reasons. According to data produced in this work and at least for liver, it is proposed to consider the superoxide radical and  $\text{H}_2\text{O}_2$  as other physiological transduction signals for adrenaline that can be added to those existing at present, such as cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$ . Although to date the target on which the previously mentioned adrenaline intermediation-formed ROS can act is unknown, evidence is growing that in general these ROS function as signal transducers. Otherwise, adrenaline-mediated ROS production might cast some light on the striking potentiation in hepatotoxicity when co-treatment of chemicals ( $\text{CCl}_4$ , acetaminophen, and methylphenidate) with certain adrenergic agonist drugs is performed [9,29]. A greater pool of adrenaline

action-associated ROS might underlie the hepatotoxic potentiation in cells in which homeostasis is already compromised by the independent effect of the toxic compound itself. In addition, the reported Kupffer-cell activation by environmental stress, which may subsequently sensitize hepatocytes to xenobiotics [30], should contribute to enhance hepatotoxicity. The fact of finding opposing actions to a same stimulus, such as adrenaline, by means of the activation of different ARs, stimulation mediated by  $\alpha_1$ , and inhibition by  $\beta$  (Figure 7), is a common observation on studying physiological responses to receptor activations. While we must delve more deeply into the finding, the results illustrate the fact that AR  $\alpha$  must be inactive in order to manifest AR  $\beta$  inhibitory action (Figure 6). The generation of ROS reported herein by the activation of a Nox isoform in an adrenaline-mediated process appears to be one additional case of the most generalized biological response schema that includes different tissues and involves three constituents that interact successively: a hormone or cytokine receptor susceptible to stimulation; a member of the G protein family that can be activated, and a Nox isoform that responds to the generation of ROS.

### Acknowledgements

We are grateful Mrs Alejandra Palomares for her secretarial contribution, to Rafael Villalobos-Molina for stimulating discussion and for careful reading of the manuscript, and to Maggie Brunner, MA, for her advice on improving the manuscript. We gratefully acknowledge financial support from CONACyT, México, grant 45003-M and IN202106-2 from DGAPA, UNAM.

### References

- [1] Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:342–344.
- [2] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42–47.
- [3] Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:677–686.
- [4] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181–189.
- [5] Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004;279:51715–51718.
- [6] Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: Not just for leukocytes anymore!. *Trends Biochem Sci* 2003;28:502–508.
- [7] Cheng G, Cao Z, Xu X, Van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91<sup>phox</sup>: Cloning and tissue expression of Nox 3, Nox 4, and Nox 5. *Gene* 2001;269:131–140.
- [8] Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:27179–27194.
- [9] Castrejón-Sosa M, Villalobos-Molina R, Guinzberg R, Piña E. Adrenaline (via  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors) and ethanol stimulate OH<sup>-</sup> radical production in isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 2002;71:2469–2474.
- [10] Guinzberg R, Laguna I, Zentella A, Guzmán R, Piña E. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J* 1987;245:371–374.
- [11] Knecht KT, Adachi Y, Bradford BU, Iimuro Y, Kadiiska M, Qun-Hui X, Thurman RG. Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: Inhibition by destruction of Kupffer cells. *Mol Pharmacol* 1995;47:1028–1034.
- [12] Barclay AN, Jackson DI, Willis AC, Williams AF. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leukocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH<sub>2</sub> terminus. *EMBO J* 1987;6:1259–1264.
- [13] Fioravanti CF, Reisig JM. Mitochondrial hydrogen peroxide formation and fumarate reductase of *hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 1990;76:457–463.
- [14] Allen RC. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: A kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 1986;133:449–493.
- [15] Scott DM, Storey BT, Lee CP. L-3-glycerol phosphate oxidation with energy coupling in submitochondrial particles from skeletal muscle mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83:641–648.
- [16] Aronson NN Jr, Touster O. Isolation of rat liver plasma membranes fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol* 1974;31:90–102.
- [17] Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- [18] Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 1992;89:1006–1013.
- [19] Mattera R, Codina J, Sekura RD, Birnbaumer L. The interaction of nucleotides with pertussis toxin: Direct evidence for a nucleotide binding site on the toxin regulating the rate of ADP-ribosylation of N<sub>i</sub>, the inhibitory regulatory component of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1986;261:11173–11179.
- [20] Krieger-Brauer HI, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in human adipocyte plasma membranes in mediated by G $\alpha_{i2}$ . *J Biol Chem* 1997;272:10135–10143.
- [21] Riganti C, Gazzno E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. Diphenyleiiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem* 2004;279:47726–47731.
- [22] Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Nomenclature supplement adrenoceptors. *Trend Pharmacol Sci* 2001;12:1–146.
- [23] Diebold BA, Fowler B, Lu J, Dinanier MC, Bokoch GM. Antagonist cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004;279:28136–28142.
- [24] Yamauchi A, Marchal CC, Molitoris J, Pech N, Knaus U, Towe J, Atkinson SJ, Dinanier MC. Rac GTPase isoform-specific regulation of NADPH oxidase and chemotaxis in murine neutrophils *in vivo*. *J Biol Chem* 2005;280:953–964.
- [25] Kim C, Dinanier MC. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47<sup>phox</sup> and p57<sup>phox</sup> and can be rescued by exogenous arachidonic acid. *J Leukoc Biol* 2006;79:223–234.
- [26] Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003;278:25234–25246.

- [27] Rossby SP, Cornett LE. Steady state levels of hepatic alpha and beta 2-adrenergic receptors and gene transcripts during development of the male rat. *J Cell Physiol* 1991;147:55-61.
- [28] Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Agonist interaction with alpha-adrenergic receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4: S14-S18.
- [29] Roberts SM, DeMott RP, James RC. Adrenergic modulation of hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 1997;29:329-353.
- [30] Panuganti SD, Khan FD, Svensson CK. Enhanced xenobiotic-induced hepatotoxicity and Kupffer cell activation by restrain-induced stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318: 26-34.