



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DEL ETANOL EN EL INCREMENTO DE LA
LIBERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN
MEMBRANAS DE HEPATOCITO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

SURID VIRGEN DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: **DR. ENRIQUE PIÑA GARZA**

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2006



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.

RECONOCIMIENTOS

- A CONACYT, por el apoyo económico a través de la beca número 189674.
- A DGEP, por el apoyo económico complementario.
- A mi tutor: Dr. Enrique Piña Garza, por su orientación e invaluable enseñanzas durante mis estudios de maestría.
- A mi comité tutorial: al Dr. Marco A. Juárez Oropeza y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por sus valiosas aportaciones para la realización de mi tesis.
- A mi jurado: Dra. Marcia Hiriart y Dr. Jesús Aguirre, por sus comentarios a mi trabajo.

A Sara, mi madre, por todo el cariño y apoyo incondicional,

A mis hermanos, por alentarme a continuar,

Al Dr. Piña, mi tutor, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo,

A mis compañeros, Raquel y Antonio, por su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A todas las personas que contribuyeron para que la realización de mi tesis fuera posible.

GRACIAS!

CONTENIDO

| | <u>Pagina</u> |
|---|---------------|
| 1. LISTA DE ABRAVIATURAS | ii |
| 2. RESUMEN | 1 |
| 3. ABSTRACT | 3 |
| <hr/> | |
| 4. INTRODUCCIÓN | |
| I: Química de las ERO. | 4 |
| II: Fuentes de EOR en la célula | 7 |
| III: Mecanismos para descomponer al H ₂ O ₂ | 15 |
| IV: Metabolismo del etanol | 16 |
| V: Etanol y especies de oxígeno reactivas | 18 |
| <hr/> | |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| <hr/> | |
| 6. HIPÓTESIS | 22 |
| <hr/> | |
| 7. OBJETIVOS | 22 |
| <hr/> | |
| 8. MATERIAL Y METODOS | |
| I: Obtención del material biológico | 23 |
| II: Obtención de membranas plasmáticas de hepatocito | 25 |
| III: Procedimientos experimentales | 26 |
| <hr/> | |
| 9. RESULTADOS | 32 |
| <hr/> | |
| 10. DISCUSIÓN | 45 |
| <hr/> | |
| 11.- REFERENCIAS | 51 |
| <hr/> | |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| ADH | Alcohol deshidrogenada |
| AMPc | Adenosin monofosfato cíclico |
| ATP | Adenosintrifosfato |
| CYP2E1 | Citocromo P4502E1 |
| DPI | Difenilidonium |
| EOR | Especies de oxígeno reactivas |
| EtOH | Etanol |
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| GdCl₃ | Cloruro de gadolinio |
| GPX | Glutación peroxidasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| MEOS | Sistema microsomal oxidante del etanol |
| NAD⁺ | Nicotinamín adenín dinucleótido |
| NADH | Nicotinamín adenín dinucleótido reducido |
| NADP⁺ | Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato |
| NADPH | Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido |
| NO[·] | Óxido nítrico |
| Nox | NADPH oxidasa |
| O₂ | Oxígeno molecular |
| O₂^{-·} | Anión superóxido |

| | |
|------------|------------------------------|
| -OH | Radical hidroxilo |
| RE | Retículo endoplásmico |
| SOD | Superóxido dismutasa |

2. RESUMEN

La ingesta de etanol se ha relacionado con un incremento en las especies de oxígeno reactivas (EOR), a través de la activación de la NADPH oxidasa (Nox) de las células de Kupffer. Sin embargo, existen reportes del incremento en las EOR en células endoteliales del sinusoides hepático y en hepatocitos, secundario a la presencia de etanol. En este trabajo exploramos la posible participación del etanol en la generación de EOR a través de la activación de alguna isoforma de la Nox presente en la membrana plasmática del hepatocito. Se purificaron hepatocitos mediante el método de la elutriación y posteriormente se obtuvieron las membranas plasmáticas mediante técnicas de centrifugación diferencial. Los experimentos se realizaron en 2 etapas consecutivas: una etapa de activación y una etapa de catálisis. Durante la etapa de activación, inicialmente se activó al sistema con concentraciones suprafisiológicas de Mn^{2+} [3 mM] y etanol [50 mM] y posteriormente se disminuyó la concentración de Mn^{2+} y se varió la dosis de etanol. Se utilizaron al difenilidonio (DPI) y anticuerpos policlonales dirigidos contra Nox2, Nox1, Rac1 y Rac2 para evidenciar la isoforma de la Nox a través de la cual ocurre el efecto propuesto en nuestra hipótesis. En la etapa de catálisis se incubaron las membranas plasmáticas en presencia del NADPH y se midió la producción de H_2O_2 . Los resultados indican que el etanol induce la activación de una Nox, aditiva a la ocasionada por el Mn^{2+} en concentraciones elevadas. Además se encontró que 50 mM de etanol activa a la Nox en presencia de concentraciones fisiológicas de Mn^{2+} [3 μ M], las cuales no activan al sistema. La producción de H_2O_2 se inhibió por el DPI y por los anticuerpos policlonales dirigidos contra

Nox2 y Rac1. Los hallazgos encontrados indican que el etanol induce la activación de una Nox2 localizada en la membrana plasmática del hepatocito, posiblemente a través de la proteína Rac1.

3. ABSTRACT

Ethanol intake has been related with an increase of reactive oxygen species (ROS) probably by a NADPH oxidase-activation (Nox) of Kupffer cells, despite existing reports that show the increase of ROS in endothelial sinusoidal cells and hepatocytes by ethanol. We decide to explore the possible participation of ethanol in the increase of ROS production by some Nox localized in the plasma membrane of the hepatocyte. We obtained hepatocytes high purity by elutriation, later we obtained the plasma membranes by differential centrifugation. The experiments were made in two consecutive steps: one step of activation and one step of catalysis. Initially, in the activation step, the system was activated by supraphysiologic concentrations of Mn^{2+} [3 mM] and ethanol [50 mM]. Later, we decreased the Mn^{2+} -concentration and we varied the concentration of ethanol, too. We used difenilidonium (DPI) and polyclonal antibodies directed to the C-terminal of Nox2, Nox1, Rac2 and Rac1, and found evidence confirming that the effect is by activation of one Nox, as we had postulated in our hypothesis. In the catalysis step, the plasma membranes was incubated with NADPH and later we determinate H_2O_2 . The results showed that ethanol induced the activation of one Nox, in addition to the activation of the Nox by high concentration of Mn^{2+} . We found that ethanol activates one Nox in presence of physiological concentrations of Mn^{2+} [3 μ M], this concentration was unable to activate the system. We found the concentration of ethanol that activates the system is 50 mM. The results show that the H_2O_2 -generation was inhibited by antibodies directed against Nox2 and Rac1. These findings show the activation of Nox2 by ethanol localized in the plasma membranes of the hepatocyte, possibly mediated by Rac1 protein.

4. INTRODUCCION

QUÍMICA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de organismos aerobios, puesto que la mayor parte de la energía liberada en el metabolismo ocurre en la fase aerobia y es dependiente de la fosforilación oxidativa, un proceso en el cual la energía de la oxidorreducción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial es convertida en ATP. En este proceso, el O_2 sirve como el aceptor final de electrones de la cadena de transporte electrones mitocondrial para ser reducido a H_2O en presencia de H^+ . Sin embargo, durante este proceso, y en otros en los que hay transferencia de electrones, también se forman radicales libres del O_2 como subproductos.

Un radical libre es definido como cualquier átomo o especie molecular capaz de existir en forma independiente con uno o más electrones no apareados. El O_2 presenta una alta afinidad por electrones desapareados como consecuencia de su estructura electrónica, por lo tanto es capaz de aceptar electrones en sus orbitales, siendo reducido el propio O_2 en el proceso, y pudiendo llegar a generar especies de oxígeno reactivas (EOR), llamadas así debido a su mayor reactividad que el O_2 (varias de esas EOR además son radicales libres) (1, 2). Las características químicas y biológicas de las especies de oxígeno reactivas determinan su capacidad de reaccionar con diferentes moléculas en el microambiente en el cual son generadas. Las reacciones de las EOR con las moléculas del microambiente celular son la base del entendimiento de su mecanismo de acción.

La reducción del O_2 por un solo electrón resulta en la formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ya sea por catálisis enzimática, o como subproducto

en el caso de reacciones de transferencia de electrones. La química del $O_2^{\cdot-}$ en solución acuosa y en solventes orgánicos es muy diferente. En contraste a su gran estabilidad en muchos solventes orgánicos, en solución acuosa el $O_2^{\cdot-}$ tiene una vida media muy corta (3). Esta inestabilidad es consecuencia de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , una reacción facilitada por la elevada concentración de H_2O en las propias soluciones acuosas y por concentraciones altas de formas protonadas del $O_2^{\cdot-}$ (HO_2^{\cdot}) en condiciones de pH ácido. Esta reacción de dismutación se lleva a cabo con una constante de velocidad de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7. Como además, la reacción es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), se asegura una vida media muy corta del $O_2^{\cdot-}$ (4)

Por otra parte, el óxido nítrico (NO^{\cdot}) reacciona con $O_2^{\cdot-}$ a una velocidad limitada por difusión y es, por lo tanto, una de las pocas biomoléculas capaz de competir con la SOD por el $O_2^{\cdot-}$ (5). Sin embargo, en la mayoría de sistemas biológicos, en donde las concentraciones de NO^{\cdot} u otras moléculas reactivas similares son muy pequeñas, la generación de $O_2^{\cdot-}$ termina generalmente en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (1,3).

La dismutación de $O_2^{\cdot-}$ explica el origen de la mayoría del H_2O_2 generado en las células eucariotas. Sin embargo, el H_2O_2 también puede ser generado por la reducción directa de 2 electrones del O_2 , un mecanismo de reacción compartido por algunas flavooxidasas (6).

A diferencia del $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 no es un radical libre y es una molécula más estable que el radical libre, pero es una EOR típica. El H_2O_2 es capaz de

difundir a través de las membranas biológicas, mientras que el $O_2^{\cdot-}$ no lo hace (7). El H_2O_2 es un agente oxidante más débil que el $O_2^{\cdot-}$, sin embargo, en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre puede generar al radical hidroxilo ($\cdot OH$), (el más reactivo y tóxico de las EOR) a través de reacción de Fenton (8). En la tabla 1 se muestran las reacciones químicas de las que se generan las EOR más comunes y estudiadas en los sistemas biológicos.

Tabla 1. Reacciones químicas por las que se generan las EOR en los sistemas biológicos.

| Producto | Reacción |
|------------------------------|---|
| Generación de $O_2^{\cdot-}$ | $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$ |
| Generación de H_2O_2 | $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ |
| Generación de $\cdot OH$: | |
| -Reacción de Fenton: | $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ |
| -Reacción de Haber-Weiss: | |
| Weiss: | $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{Cu/Fe} O_2 + \cdot OH + OH^-$ |

$O_2^{\cdot-}$: anión superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; $\cdot OH$: radical hidroxilo.

Existen otras EOR como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el cual es producido en muchos procesos fisiológicos, principalmente por transferencia de energía lumínica del estado de triplete. También por otros procesos biológicos que en los que no interviene la energía lumínica; por ejemplo, los neutrófilos producen ácido hipocloroso (HOCl) y H_2O_2 , y estos pueden reaccionar para generar $^1\text{O}_2$ de acuerdo a la siguiente reacción :



El $^1\text{O}_2$ tiene una vida media muy larga en fase gaseosa, pero en el medio acuoso (como lo es el celular) es descompuesto rápidamente. Sin embargo, el $^1\text{O}_2$ es de utilidad en procesos biológicos y terapéuticos, como en el caso de terapia fotodinámica donde es la especie activa formada. También participa en la patogenia de algunas enfermedades, como la porfiria, una enfermedad caracterizada por el depósito de porfirinas que causa una sobreproducción de $^1\text{O}_2$ cuando la piel es expuesta a la luz solar (9).

FUENTES DE EOR EN LA CÉLULA

En la célula se generan EOR en diferentes sitios, como se menciona a continuación:

a) Mitocondria:

En la membrana interna de la mitocondria está localizada la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En la reacción de oxidorreducción en la que los electrones cedidos desde los complejos I y II a la ubiquinona para reducirla a ubiquinol, el ~1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria en condiciones de reducción se convierte en $\text{O}_2\cdot^-$ (10)

En un adulto normal que consume diariamente 200 litros de O_2 al día y conociendo que más del 95% del O_2 consumido sucede en la respiración mitocondrial, se formarán aproximadamente 4 litros de $O_2^{\cdot-}$ (10). Debido a la elevada concentración de SOD mitocondrial y a su elevado número de recambio ($7 \times 10^9 \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$), las concentraciones intramitocondriales de $O_2^{\cdot-}$ se mantienen en niveles muy bajos (4). A diferencia del H_2O_2 , el $O_2^{\cdot-}$ es incapaz de difundir a través de la membrana mitocondrial hacia el citoplasma, y por lo tanto es incapaz de escapar hacia el citoplasma (7).

En años recientes, la participación de las EOR generadas en la mitocondria en procesos de señalización celular ha ganado terreno, particularmente en relación a la regulación de la apoptosis (11). También se ha sugerido la participación de la mitocondria como sensor de O_2 para regular la transcripción de genes mediada por hipoxia (12).

b) Microsomas:

El retículo endoplásmico (RE) es otro organelo intracelular que, a diferencia de la mitocondria, participa primariamente en la biosíntesis de lípidos y proteínas. El retículo endoplásmico liso contiene enzimas que catalizan una serie de reacciones para eliminar drogas liposolubles y muchos otros productos del metabolismo. De estas, las enzimas más estudiadas son la familia del citocromo P-450 y del citocromo b_5 , que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos y reducir el O_2 para generar $O_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 (13, 14). La regulación redox del RE es muy importante en funciones tales como el plegamiento y la secreción de proteínas (15). También se ha sugerido que el $O_2^{\cdot-}$ generado en los microsomas por la NADH oxidorreductasa puede

funcionar como un sensor de O_2 en las células musculares lisas de la arteria pulmonar (16).

c) Peroxisomas:

Los peroxisomas son una fuente muy importante de la producción total de H_2O_2 en la célula (17). Contienen un número de enzimas generadoras de H_2O_2 incluyendo a las siguientes: glicolato oxidasa, D-amino ácido oxidasa, urato oxidasa, L- α -hidroxiácido oxidasa y acil-CoA oxidasa. La catalasa peroxisomal utiliza el H_2O_2 generado por estas oxidasas para oxidar a otros sustratos mediante reacciones de peroxidación (18). Estos tipos de reacciones oxidativas son particularmente importantes en el hígado y el riñón, en los cuales los peroxisomas eliminan una variedad muy importante de agentes tóxicos (incluyendo el etanol) que pasan del tracto digestivo a la circulación sanguínea, y de ésta al tejido.

d) Enzimas solubles:

Algunas enzimas solubles tales como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la aldehído oxidasa, la dihidroorotato deshidrogenasa y la triptofano dioxigenasa pueden generar EOR durante su ciclo catalítico (3).

La generación de $O_2^{\cdot -}$ por la xantina oxidasa es la más estudiada. En este caso para que el $O_2^{\cdot -}$ pueda ser formado, son necesarios 2 eventos fundamentales: primero, la producción de la hipoxantina a partir del AMP, la cual funciona como sustrato de la xantina oxidasa. El segundo evento es la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa consecuencia de proteólisis parcial después de la exposición tisular a hipoxia, lo cual obliga a la enzima a utilizar el O_2 como oxidante, en lugar del NAD^+ . Como resultado de

esta conversión la enzima genera $O_2^{\cdot-}$ en vez de NADH como resultado de la oxidación de la hipoxantina (19).

e) Oxidasas asociadas a la membrana plasmática:

Estas enzimas han sido consideradas como una fuente muy importante en la producción de EOR estimulada por factores de crecimiento y/o citocinas. La oxidasa asociada a membrana plasmática mejor estudiada ha sido la NADPH oxidasa de células fagocíticas, la cual es una enzima que cataliza la producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir del O_2 y el NADPH, de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta enzima ha sido mejor estudiada en células implicadas en la respuesta inmune innata (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) (20). En células fagocíticas la NADPH oxidasa tiene la función de generar $O_2^{\cdot-}$ y otras EOR durante el “estallido respiratorio” para eliminar a los microorganismos que entren en contacto con el huésped (21).

La NADPH oxidasa de células fagocíticas, ahora también llamada Nox2, es un complejo enzimático constituido tanto por proteínas integrales de membrana como por proteínas del citosol (22). El componente central de la enzima es una proteína integral de membrana plasmática llamada gp91^{phox}, asociada a una proteína de 22 kDa llamada p22, las cuales constituyen el citocromo *b*₅₅₈. Dicho citocromo es la unidad catalítica de la enzima (23), la cual se encuentra en reposo o en estado inactivo. Al ocurrir la fagocitosis el proceso activa a la unidad catalítica mediante la incorporación de las

subunidades citosólicas que llegan a integrarse a la membrana para constituir el complejo activo (22, 23).

Los componentes citosólicos de la enzima de células fagocíticas son proteínas de menor peso molecular que han sido llamadas $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$ en alusión a su peso molecular en kDa; además el complejo NADPH oxidasa posee una proteína G monomérica del tipo Rac1 o Rac2. La proteína $p47^{phox}$ es la subunidad responsable de unirse al citocromo b_{558} durante la activación enzimática, además de ser la responsable de transportar y anclar a las proteínas $p67^{phox}$ - $p40^{phox}$ al citocromo b_{558} durante el proceso de activación de la oxidasa (24,25). La proteína $p67^{phox}$ interactúa con la proteína Rac1 o Rac2 y el citocromo b_{558} , además puede regular la actividad catalítica de la enzima (26). Con los estudios en sistemas libres de células se ha determinado que $p40^{phox}$ no es requerida para la activación de la NADPH oxidasa, sin embargo, se han observado efectos tanto estimulantes como inhibitorios en sistemas celulares completos (27).

Las proteínas Rac se requieren para la actividad de la enzima de fagocitos. Sin embargo, se considera que Rac solo participa como una molécula adaptadora que se asocia a la proteína $p67^{phox}$ y le otorga la orientación correcta para regular al citocromo b_{558} (28). En la figura 1 se muestra un modelo activado de la Nox2.

A pesar de que el modelo de NADPH oxidasa en células fagocíticas ha sido el mejor y más ampliamente estudiado y caracterizado, se logró la detección de cantidades pequeñas de EOR en varios tipos celulares diferentes a los fagocitos. Los niveles detectados de EOR en células no fagocíticas son más bajos que en neutrófilos activados. Esta producción baja frecuentemente

fue atribuida a la respiración mitocondrial. Sin embargo, el uso de inhibidores indicó que la fuente real podría ser una flavoproteína similar a gp91^{phox} (Nox2) (22).

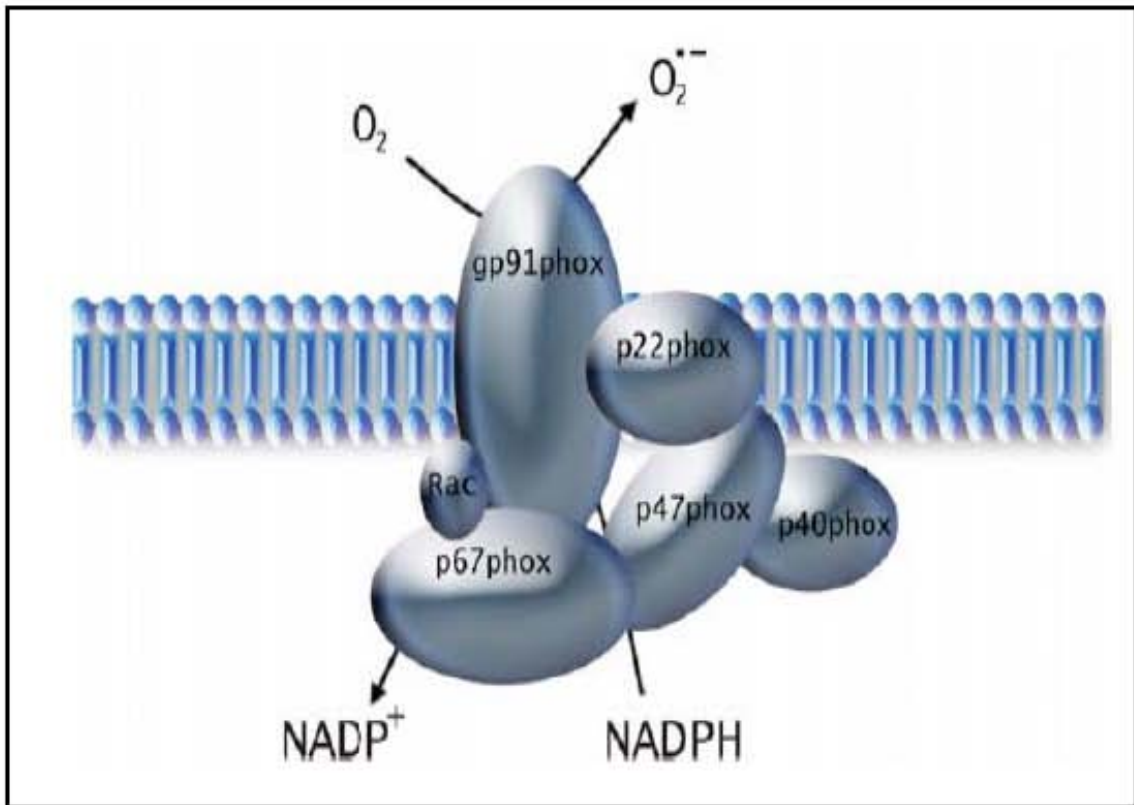


Figura 1. Esquema de la Nox2 activada.

La NADPH oxidasa de células fagocíticas (Nox2) esta constituida por las proteínas integrales de membrana gp91 y p22, además de las proteínas citosólicas p47, p67, p40 y Rac. Las cuales se asocian a las proteínas gp91 y p22 para formar el complejo enzimático activo. El dominio de unión al NADPH esta localizado en el lado interno de la membrana plasmática, mientras que la generación del O₂^{•-} se produce en la cara extracelular de la membrana plasmática (Tomado de Ray M y Shah AM, 2005).

Ahora se sabe que las NADPH oxidasas están distribuidas ampliamente en células no fagocíticas de diferentes órganos, de tal manera que ahora es necesario considerar a las NADPH oxidasas como una familia de oxidasas a las que se denomina genéricamente Nox, con papeles variados dentro de la

fisiología celular. Actualmente se conocen siete miembros de la familia Nox, todas homólogas a Nox2 (22).

Las enzimas Nox se clasifican en 3 grupos de acuerdo a la presencia de otros dominios adicionales al dominio gp91^{phox}. Las Nox1, Nox3 y Nox4 son similares a la Nox2. Contienen los centros de transferencia de electrones que se requieren para el paso de electrones del NADPH hacia el O₂, para generar O₂^{•-} (21,22). La Nox5 posee dominios similares a la Nox2 pero también posee un dominio similar a calmodulina en el N-terminal de la proteína, el cual cuenta con 4 sitios de fijación de calcio. Finalmente, las Duox 1 y 2 son 2 miembros de la familia de las Nox, denominadas así porque cuentan con los mismos dominios de Nox5, pero se les adiciona un dominio similar a peroxidasa en el N-terminal, en la cara extracelular de la membrana plasmática (22).

De los homólogos a la Nox2 sólo se conocen proteínas reguladoras para la Nox1. Dichas proteínas son llamadas: organizador de Nox1 (NOXO1) y activador de Nox1 (NOXA1). Dichas proteínas son estructural y funcionalmente homólogas a p47^{phox} y p67^{phox} respectivamente (22). Para la Nox5 se sabe que es activada por calcio (21). Hasta ahora, las proteínas reguladoras para la Nox3, Nox4 y las Duox 1 y 2 no han sido descritas. En la tabla 2 se muestra un resumen de la información disponible sobre los homólogos a Nox2, su localización y lo que se conoce de su fisiología.

Tabla 2. Localización y función de los miembros de la familia de NADPH

oxidasa en células de mamíferos. Nótese la diversidad tisular y funcional de esta familia de enzimas.

| Tipo | Localización | Función | Referencia. |
|-----------------------------------|---|--|---|
| Nox1 | Colon, próstata, células musculares lisas. | Inmunidad en colon, proliferación celular, tumorogénesis. | Suh YA y cols (1999) (29), Kawahara T y cols (2005) (30), (Krause KH (2004) (31). |
| Nox2 (gp91^{phox}) | Células fagocíticas. | Respuesta celular inmune (estallido respiratorio) | Segal AW y cols (1981) (20), Babior BM (2004) (21). |
| Nox3 | Tejidos fetales | Morfogénesis de la otoconia, equilibrio y propiocepción. | Kikuchi H y cols (2000)(32), Cheng G y cols (2001) (33), Paffenholz R y cols (2004) (34). |
| Nox4 | Corteza renal, osteoclastos, ojo, corazón, páncreas, placenta, testículo, astrocitos, fibroblastos, células musculares lisas. | Sensor de O ₂ , eritropoyesis por hipoxia, respuesta inmune glomerular, reabsorción de hueso, transducción de señales por insulina. | Shiose A (2001) (35), Geiszt M (2000) (36), Varma SD (1990) (37), Gorin Y (2004) (38), Yang S (2001)(39), Lassegue B (2001) (40), Ago T (2004) (41), Cucoranu I (2005) (42), Krieger-Brauer HI (1992) (43), Krieger-Brauer HI (1997) (44), Mahadev K (2004) (45). |
| Nox5 | Espermatozoides próstata, linfocitos T y B. | Capacitación espermática, proliferación celular e inhibición de apoptosis. | Banfi B (2001) (46), Banfi B (2004) (47), Baker M (2004) (48), Brar SS (2003) (49). |
| Duox1 y 2 | Tirocitos, glándulas exócrinas y mucosas. | Biosíntesis de hormona tiroidea, inmunidad de las vías aéreas. | Lacroix (2001) (50), De Deken X (2002) (51), Ameziane-El-Hassani R (2005) (52), Moreno JC (2002) (53), Geiszt M (2003). (54), Forteza R (2005) (55), Schwarzer C (2004) (56). |

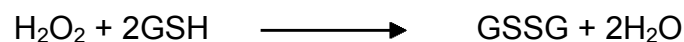
MECANISMOS PARA DESCOMPONER AL H₂O₂

En la célula existen una serie de mecanismos enzimáticos para transformar al H₂O₂ en compuestos inocuos para la célula y evitar la generación de otras EOR más agresivas. Las 2 enzimas principales que descomponen el H₂O₂ son (7):

Catalasa: es una enzima antioxidante que se encuentra en el citoplasma y en los peroxisomas de todas las células del organismo, pero el hígado es el órgano que contiene la mayor cantidad de catalasa (7). Esta enzima cataliza la reacción siguiente con una K_{cat} / K_M de 4×10^7 (57):

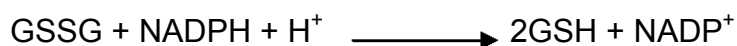


Glutación peroxidasa: (GPX) se trata de una familia de enzimas formadas por cuatro subunidades, cada una con un átomo de selenio (Se) en forma de selenocisteína en su sitio catalítico, transforman H₂O₂ en H₂O al oxidar moléculas de glutación reducido (GSH) de acuerdo a la siguiente reacción (8):



El glutación es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina, el cual contiene un grupo tiol (SH) en forma reducida en su residuo de cisteína. Cuando el grupo tiol es oxidado da origen a un puente disulfuro entre las dos moléculas de glutación (GSSG) (7,8). La forma activa del glutación, la que

puede reducir al H₂O₂ en la reacción de la glutatión peroxidasa, es la reducida (GSH). Por su parte la enzima glutatión reductasa es la encargada de regenerar al glutatión reducido a partir del glutatión oxidado, por medio de NADPH como donador de electrones por medio de la siguiente reacción:



El glutatión es la principal molécula encargada de regular la concentración de H₂O₂ en los organismos superiores, el cual se encuentra en todos los tejidos (8).

METABOLISMO DEL ETANOL

El etanol es una molécula pequeña soluble en agua, la cual es absorbida rápidamente por el tracto gastrointestinal. Después de la ingesta de etanol, en ayuno, se alcanza el pico máximo de alcohol en sangre a los 30 minutos. La presencia de bolo alimenticio en el tubo digestivo retarda la absorción del alcohol. Se distribuye rápidamente en los tejidos, alcanzando niveles similares a los existentes en sangre (58). La concentración de etanol que se alcanza en sangre después de una intoxicación aguda está en el rango de 50 mM (59).

Cerca del 90% del alcohol consumido es oxidado en el hígado. La mayoría del resto es excretado a través de los pulmones y la orina. A las concentraciones alcanzadas usualmente en sangre, la velocidad de oxidación sigue una cinética de orden cero, es decir, la oxidación es independiente del tiempo y la concentración de alcohol. Un adulto típico (70 kg) puede

metabolizar 7 a 10 g de etanol (150-200 mmoles) por hora, el equivalente aproximado del alcohol contenido en 300 ml de cerveza o 100 ml de vino (59).

El etanol es metabolizado en el hígado por 3 vías:

1.- Alcohol deshidrogenasa (ADH): es la responsable de la oxidación de la mayoría del etanol ingerido. Se expresa principalmente en el hígado, aunque existen otros tejidos, incluyendo la mucosa gástrica, que expresan a la ADH y contribuyen a la oxidación (60). Sin embargo, en el varón, una cantidad significativa de etanol puede ser metabolizada por la ADH del estómago, en cambio la mujer presenta niveles menores de la enzima en el estómago. Este fenómeno contribuye a explicar las diferencias observadas en las concentraciones de etanol en sangre relacionadas en el sexo del individuo (58, 60).

2.- Sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS): este sistema es inducido por la ingesta crónica de etanol. La enzima clave del sistema es el citocromo P4502E1 (CYP2E1), el cual incrementa su expresión de 4 a 10 veces en individuos que ingirieron crónicamente alcohol (60). A concentraciones cercanas a 22 mmol/L, el MEOS contribuye poco al metabolismo del etanol. Sin embargo, cuando se ingiere cantidades muy grandes de etanol, el sistema de la ADH llega a ser saturado por depleción de su cofactor, el NAD^+ . Cuando la concentración de etanol se incrementa por arriba de 25 mmol/L, se observa un incremento de la actividad del MEOS, pues este no requiere NAD^+ , sino NADPH (58). El metabolismo del etanol, vía del MEOS, genera EOR lo que sugiere que este sistema puede contribuir a la lesión hepática por etanol. Como ocurre con la ADH, la oxidación de etanol por el MEOS ocurre principalmente en el hígado, sin embargo, existen sitios

adicionales con expresión del CYP2E1, incluyendo a las células de Kupffer (58).

3.- Catalasa: se ha considerado que no es fundamental para el metabolismo *in vivo* del etanol, pues su inhibición no produce alteración en la oxidación del etanol (61).

4.- Sintetasa de etil ésteres de ácidos grasos (FAEE): se trata de una vía no oxidativa catalizada por esta enzima, la cual lleva a la formación de etil ésteres de ácidos grasos. Se han encontrado concentraciones muy altas de la FAEE en órganos susceptibles a los efectos tóxicos del etanol, incluyendo el hígado (62).

ETANOL Y LAS ESPECIES DE OXIGENENO REACTIVAS EN EL HÍGADO

Se sabe que la ingesta de etanol incrementa la poza de EOR en el hígado, lo cual se asocia a la aparición de lesión hepática por la ingesta elevada y crónica del etanol. El estudio de la participación de las EOR en la lesión hepática inducida por etanol se origina de la observación de que en la administración de dosis de etanol de 5 g / kg incrementa los marcadores de lipoperoxidación hepática (producción de molandialdehído), además de observarse un incremento del 40% en la actividad de la SOD, lo que sugirió que existe un incremento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ (63). Sin embargo no existe consenso en cuál es la fuente de dichas EOR.

Existe la propuesta de que el responsable del incremento en las EOR con la ingesta de etanol es el CYP2E1 (64), ya que la actividad del CYP2E1 genera $O_2^{\cdot-}$ al metabolizar al etanol (65). Sin embargo, en ratones “knockout” a los que se les eliminó el gen que codifica para el CYP2E1 y que fueron

intoxicados con etanol se observa incremento en las EOR y desarrollaron lesiones hepáticas similares a la de los ratones control (66).

Algunos autores proponen que la fuente del incremento en las EOR producida por la ingesta de etanol son las células de Kupffer, pues existen reportes en los que la eliminación de dichas células con cloruro de gadolinio ($GdCl_3$) impide la lesión hepática por etanol, lo que sugiere su participación fundamental en el incremento de las EOR y la aparición de la lesión (67). Se sabe que el etanol incrementa la permeabilidad de las células intestinales, lo que resulta en mayor permeabilidad para las endotoxinas de las bacterias intestinales (68). De tal manera que se sugiere que la permeabilidad incrementada de las endotoxinas (constituidas por lipopolisacáridos) activa a las células de Kupffer y produce lesión hepática por etanol, pues el tratamiento con antibiótico de ratas tratadas con etanol impide la lesión hepática por etanol (67). Se sugiere que esta lesión es producida por un incremento de EOR, secundaria a la activación de la NADPH oxidasa de las células de Kupffer por los lipopolisacáridos. Existen reportes de que la eliminación por knockout de una de las proteínas reguladoras de la NADPH oxidasa (la proteína p47) lleva a que no se incrementen las EOR y no se desarrolle lesión hepática por etanol (69).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trabajos recientes muestran que no solo las células de Kupffer incrementan su producción de EOR en presencia de etanol, pues está reportado que en el hígado perfundido con 50 mM de etanol se incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ por medio de las células endoteliales del sinusoides hepático (70).

En el 2005 Guerra y colaboradores demostraron que existe un sistema generador de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de una NADPH oxidasa, localizado en la membrana plasmática del hepatocito de rata. Este sistema utiliza NADPH como sustrato (K_m de 44 μM), se inhibe por DPI ($1 \times 10^{-5} M$) y el producto de la activada catalítica es el $O_2^{\cdot-}$ (71). Además existe información sobre el incremento en la generación de radical hidroxilo ($\cdot OH$) en hepatocitos aislados de rata, cuando estos se incuban en presencia de etanol a una concentración de 50 mM (72).

Los antecedentes mencionados son parte de una búsqueda constante para tratar de explicar los fenómenos moleculares que conducen al incremento de EOR y la lesión del hígado, secundaria a la ingesta moderada de etanol. Por este motivo decidimos explorar la participación de los hepatocitos en este problema, pues es de suma importancia definir la contribución de la población celular más abundante en el hígado, hasta ahora relegada a un segundo plano, en el incremento de las EOR por etanol. Además, es indispensable definir el sitio de la célula y el mecanismo por el cual ocurre el incremento en las EOR relacionado con la ingesta de etanol. Ahora bien, es inevitable referirse a la generación de EOR y no pensar en estudiar a la enzima especializada en

generarlas, por ello es que nuestro trabajo está dirigido precisamente a explorar la participación del etanol sobre la actividad de la NADPH oxidasa, pues los antecedentes indican que la Nox puede jugar un papel fundamental en este fenómeno.

6. HIPÓTESIS

El etanol incrementa la producción de EOR en el hepatocito de rata, a través de estimular la actividad de una NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática del hepatocito.

7. OBJETIVOS.

- Caracterizar el sistema para encontrar las condiciones óptimas para la actividad de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática del hepatocito *in vitro*.
- Determinar el efecto del etanol sobre la producción de EOR en el sistema de NADPH oxidasa de la membrana plasmática del hepatocito.
- Determinar qué isoforma de la familia de las NADPH oxidasas interviene en el incremento de la producción de EOR en la membrana plasmática del hepatocito por la estimulación con etanol.

8. MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Se utilizaron ratas macho de cepa Wistar de 120-150 g de peso. Alimentadas *ad libitum* con alimento NIH-31:18-4 (Zeigler Bros Inc.USA). Mantenido durante 1 semana con temperatura controlada de 20°C, colocadas por parejas en jaulas grandes con lecho elaborado con maderas duras y libre de patógenos, alquitranes y aflatoxinas (P. J. Murphy, USA).

Reactivos

Los reactivos NaCl, KCL, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , MgCl_2 , CaCl_2 y MnCl_2 se obtuvieron de J.T.Baker (Edo.de Méx). La colagenenas tipo IV, el MES (2-[N-ácido morfolino]etanolsulfónico), el etanol, el difenilidonio (DPI), el MOPS (3-[N-ácido morfolino]propanosulfónico), el FAD, el NADPH y el ácido tricloroacético se obtuvieron de SIGMA Chem (St. Louis, Mo.). La NaN_3 fue obtenida de Hycel de México (Jalisco, Méx). El cocktail de inhibidores de proteasa se obtuvo de MP Biomedicals Inc (Solon, Ohio).

Se utilizaron anticuerpos IgG policlonales específicos, de suero de conejo, dirigidos contra el C-terminal de Nox2, Nox1, Rac2 y Rac1, los cuales fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca).

Aislamiento de células hepáticas

Bajo anestesia por inhalación con éter, se aislaron las células hepáticas por el método de Barry y Friend (73), modificado por Guinzberg (74), el cual consiste en la perfusión del hígado, a través de la vena porta, con solución Ringer-Krebs-Bicarbonato (NaCl 120 mM, KCL 5.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 12 mM); adicionado con colagenasa tipo IV a una relación p/v 1:1 (20 mg en 20 ml), a pH de 7.4 y a 37 °C, con lo que se digiere el estroma hepático en un tiempo aproximado de 10 minutos. Se obtienen las células hepáticas aisladas. La muestra celular fue sometida a la prueba de exclusión con azul de tripano para evaluar la viabilidad celular. Los experimentos solo se realizaron con una viabilidad superior al 90%.

Separación de hepatocitos por elutriación

Una vez aisladas las células hepáticas se resuspendieron en solución Ringer-Krebs y se centrifugaron a 50 rpm por 1 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 40 ml de solución Ringer-Krebs. Se tomaron 10 ml de la muestra resuspendida y se sometió al proceso de elutriación a 800 rpm y una velocidad de flujo de 30 ml/min . Se recolectó un volumen de 90 ml en 3 min (30 ml por min). La muestra se centrifugó a 50 rpm por 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de solución Ringer-Krebs. El precipitado se ha enriquecido con hepatocitos. Se realiza la prueba de exclusión con azul de tripano para definir viabilidad. Los reportes existentes en la literatura internacional indican que con el proceso de elutriación se obtiene una pureza celular arriba del 90 a 100% de hepatocitos

(75, 76). Sin la elutriación se obtiene el 80% de hepatocitos con una contaminación del 20% de otros tipos celulares. Los resultados fueron confirmados por estudio histológico (datos no mostrados).

Obtención de membranas plasmáticas de hepatocito

Los hepatocitos se sometieron a un proceso de lisado celular por choque osmótico con un amortiguador hipotónico (amortiguador de lisis), el cual consistió en MES (2-[N-ácido morfolino]etanosulfónico) (20 mM), a pH de 6.0, MgCl₂ (2 mM), CaCl₂ (1 mM), KCL (5 mM). El lisado celular se llevo a cabo en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas (kit de inhibidores de proteasas, MP biomedical Inc), el cual contiene 40 mg de AEBSF, 100 µg de leupeptina, 100 µg de pepstatina A y 500 mg de EDTA-Na para disolverse en 10 ml de agua. Se utiliza 1 ml de cocktail por cada 100 ml de amortiguador de lisis. Se favoreció la lisis celular con agitación vigorosa por 5 min.

El lisado celular fue procesado tal como se indica en la figura 2. El precipitado final se resuspendió en 3 ml de amortiguador de activación y se etiquetó como membranas plasmáticas de hepatocito, listas para realizar el experimento.

Para corroborar el enriquecimiento de las membranas plasmáticas en la muestra se ensayaron las actividades catalíticas de enzimas localizadas exclusivamente en cada uno de las siguientes membranas presentes en la célula: para monitorear la membrana mitocondrial se usó la succinato deshidrogenasa (77), para las membranas microsomales a la glucosa 6-fosfatasa (78) y para la membrana plasmática a la 5'nucleotidasa (79). Los resultados se muestran en la tabla 3 (ver sección de resultados) de lo que se

puede concluir que el procedimiento empleado efectivamente nos condujo a la obtención de membranas plasmáticas prácticamente puras.

Activación de la NADPH oxidasa

Las membranas de células hepáticas suspendidas en amortiguador de activación no mostraron actividad catalítica al añadir FAD y NADPH. Se consideró que la probable NADPH oxidasa presente en las membranas utilizadas se mantuviera inactiva de manera similar a como se mantiene inactiva la Nox2 en ausencia de fagocitosis. Se decidió buscar un procedimiento de activación de alguna manera equivalente a la de la fagocitosis. Para ello se adaptó la estrategia de activación de una NADPH oxidasa de adipocitos humanos (44) y el hecho de que a concentraciones suprafisiológicas de manganeso se activa a las proteína G (80), posiblemente asociadas a alguna isoforma de la Nox ubicada en las membranas de las células hepáticas. Efectivamente se encontró que el siguiente amortiguador de activación: MOPS (3-[N-ácido morfolino] propanolsulfónico) (30 mM) a pH de 7.4, NaCl (120 mM), CaCl₂ (1.4 mM) y NaHCO₃ (10 mM), suplementado con 3 mM de MnCl₂ activa una isoforma de la Nox que, en una etapa catalítica posterior, genera H₂O₂ a partir de NADPH y O₂. Por lo tanto, el sistema estudiado en esta tesis requiere ser realizado sucesivamente en 2 etapas, una de activación y una de catálisis.

En experimentos independientes de esta tesis, pero efectuados en el laboratorio donde se realizó la misma, se encontraron las condiciones óptimas para formar la máxima cantidad de H₂O₂ en función del tiempo de incubación (71). Para fines prácticos, la etapa de activación se realizó empleando 20 µg

de proteína proveniente de las membranas plasmáticas de hepatocito que se incubaron a 37°C por 2 minutos en un volumen final de 1 ml del amortiguador de activación anotado y suplementado con 3 mM de MnCl₂. Al finalizar los 2 min de incubación las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min, se eliminó rápida y cuidadosamente el sobrenadante cuidando de no perturbar el precipitado, el cual se resuspendió en 540 µl de amortiguador de catálisis (ver siguiente inciso). En experimentos previos del laboratorio se encontró que el ATP, empleado a concentraciones de 1 mM, no modifica la etapa de activación de la enzima ni la de catálisis.

En los distintos experimentos de esta tesis la etapa de activación se realizó de la manera descrita, excepto que en el amortiguador de activación se modificaron las concentraciones de Mn²⁺, adicionando etanol, DPI y diferentes anticuerpos, como se indica para cada experimento.

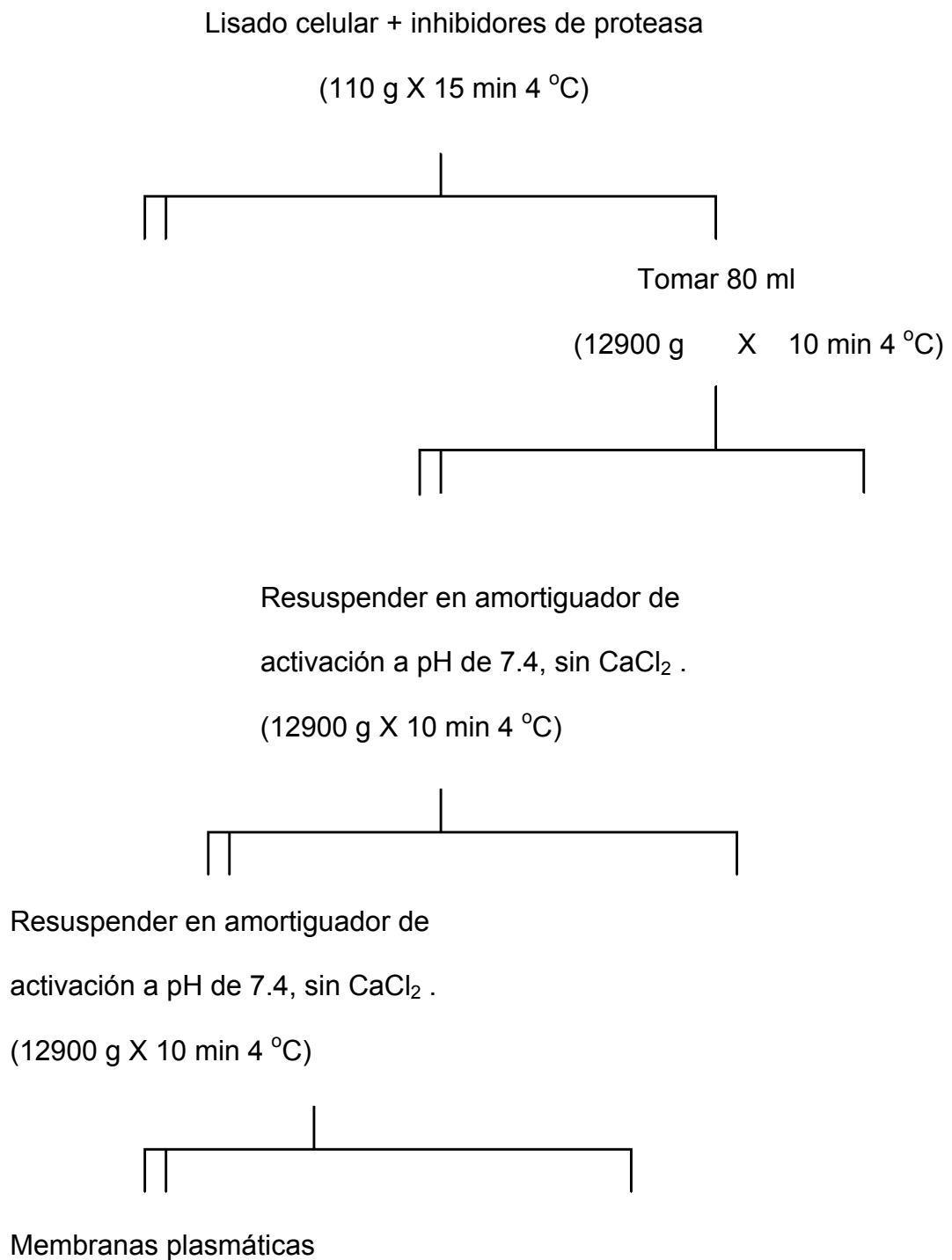


Figura 2. Se muestra el procedimiento por el cual se obtuvieron las membranas plasmáticas de hepatocito.

Etapa de catálisis

El amortiguador de catálisis tiene los siguientes componentes: MES (3-[N-ácido morfolino]etanolsulfónico) a pH de 6, NaCl (120 mM), KH_2PO_4 (1.2 mM), NaN_3 (1 mM) y FAD (100 μM). Las muestras se incubaron a 37 °C y la reacción se inició con 60 μl de NADPH a una concentración de 2.5 mM, con lo que se alcanzó una concentración final en el amortiguador de catálisis de 250 μM . A los 4 minutos de incubación la reacción se paró con 400 μl de ácido tricloroacético 1.5 M y después de mezclar la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se toman 970 μl del sobrenadante.

Posteriormente se toman 970 μl del sobrenadante y se realiza la determinación de H_2O_2 de acuerdo con la técnica de Fioravanti, la cual consiste en la oxidación del hierro (forma ferrosa) por el H_2O_2 , en un medio ácido, para después combinarse con el ión tiocianato y generar al ferritiocianato, el cual le confiere una coloración roja al medio que se hace más intensa cuando aumenta la concentración de H_2O_2 , permitiendo determinar la cantidad de H_2O_2 presente en el medio al hacer una comparación con nuestra curva estándar de H_2O_2 (81). Para ello se le agregan al sobrenadante obtenido 200 μl de sulfato ferroso [10 mM] y 100 μl de tiocianato de potasio [2.5 M], posteriormente se lee en el espectrofotómetro a 480 nm con luz blanca.

Recuérdese que en esta etapa el FAD (-280 mV) acepta un par de electrones y se los cede al citocromo b_{558} (-245 mV) (unidad catalítica de la NADPH oxidasa), para que finalmente éste se los ceda al O_2 (0.83 mV) para generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ (82).

En experimentos previos del laboratorio se encontraron las condiciones adecuadas para la etapa de catálisis, entre las que destacan, el pH ácido de la reacción (6.0), el requerimiento absoluto para el NADPH, así como la

concentración para obtener la velocidad máxima de la reacción, la necesidad de suplementar el amortiguador de catálisis con FAD (sin el suplemento la actividad enzimática es del 5 a 6% de la máxima) y las concentraciones que se tienen que añadir, y el hecho de que el NADH (ensayado hasta la concentración 1 mM) no es usado como sustrato por el sistema (71). En la tabla 3 se resume la composición de los amortiguadores utilizados, además de los tiempos de incubación, de centrifugación y método para parar la reacción.

Procedimiento estadístico

Los resultados se representan como la media \pm error estándar (ES). Se utilizó el procedimiento de análisis de varianza (ANOVA) para realizar el análisis de los datos para todos los casos, considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. Se utilizó la prueba de Duncan para realizar las comparaciones múltiples de medias cuando existió diferencia estadística significativa en el ANOVA. Se utilizó el programa estadístico SPSS 10 para Windows.

| Lisis | Activación | Catálisis |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • MES(2-N[ácido morfolino] etano-sulfónico) 20 mM, a pH de 6.0 • MgCl₂: 2 mM • CaCl₂: 1 mM • KCl: 5 mM. • Adicionado con el cocktail de inhibidores de proteasas (AEBSF, leupeptina, pepstatina y EDTA-Na: 1 ml por cada 100 ml de amortiguador) | <ul style="list-style-type: none"> • MOPS (3-N[ácido morfolino] propano-sulfónico) 30 mM, a pH de 7.4 • NaCl: 120 mM • NaHCO₃: 10 mM • Se adiciona Mn²⁺ a la concentración indicada para cada experimento. • Incuba 2 min a 37 °C. • Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. • Resuspender el precipitado en amortiguador de catálisis. | <ul style="list-style-type: none"> • MES (3-[N-ácido morfolino] etano-sulfónico: 30 mM, a pH de 6.0 • NaCl: 120 mM • KH₂PO₄: 1.2 mM • NaN₃: 1mM • FAD: 100 µM. • Se adiciona NADPH: 250 µM. • Incubar 4 min a 37 °C. • Parar reacción con ácido tricloroacético: 1.5 M. • Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. • Determinar H₂O₂ en el sobrenadante. |

Tabla 3. Tabla comparativa de la composición de los amortiguadores en cada etapa del proceso experimental descrito anteriormente. Además se incluyen los tiempos de incubación y procedimiento para detener la reacción.

9. RESULTADOS

La información sobre el grado de contaminación de las membranas empleadas en este experimento, preparadas de acuerdo con el procedimiento detallado en la figura 2, se incluyen en la tabla 4. Los resultados indican que las actividades enzimáticas de la succinato deshidrogenasa y la glucosa 6-fosfatasa casi desaparecen de la muestra denominada “membranas plasmáticas de hepatocito”. Comparativamente se incrementa la actividad específica de la enzima localizada en la membrana plasmática de la célula, esto es, la 5'nucleotidasa. En conclusión, el proceso diseñado para la preparación de membranas plasmáticas de hepatocito efectivamente permite su enriquecimiento.

Tabla 4: Determinación de enzimas marcadoras para precisar la contaminación por las membranas plasmáticas de otros organelos.

| Enzima | Lisado celular | Membranas plasmáticas de hepatocito |
|---|-----------------------|--|
| 5'nucleotidasa (nmol Pi / mg prot / min). | 67.0 | 191.0 |
| Glucosa 6-fosfatasa (nmol Pi / mg prot / min). | 9.0 | 0.0 |
| Succinato deshidrogenasa (nmol / mg prot / min) | 10.0 | 0.4 |

La ausencia de actividad en las determinaciones para la glucosa 6-fosfatasa y la succinato deshidrogenasa demuestra que no existe contaminación por retículo endoplásmico y mitocondrias respectivamente.

Inicialmente se incubaron las membranas plasmáticas de todas las células obtenidas por disgregación del hígado en presencia del amortiguador de activación enriquecido con $MnCl_2$ [3 mM] y se determinó la producción de H_2O_2 . Una vez obtenida la activación de las isoformas de la Nox se incluyó al etanol a concentraciones de 50 mM equivalentes a las detectadas en sangre en individuos intoxicados con alcohol, en el amortiguador de activación. Los resultados indican que es indispensable la presencia de manganeso para que se incrementen las EOR por etanol, pues no se encontró un incremento significativo en las membranas incubadas con etanol en ausencia de Mn^{2+} .

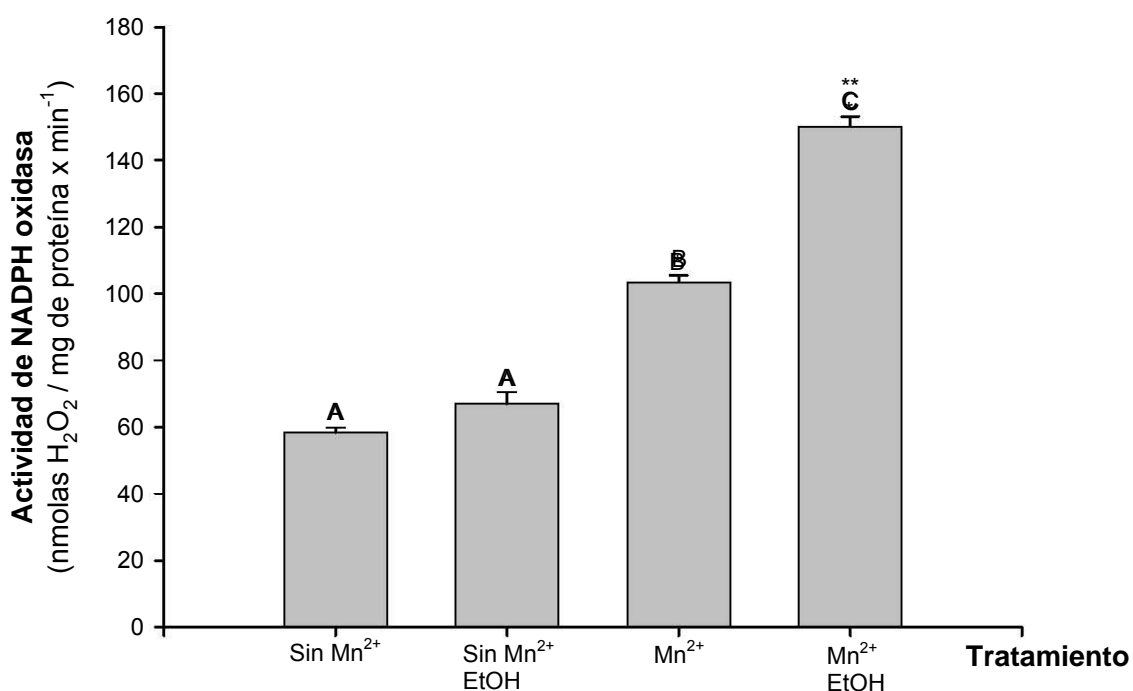


Figura 3. Generación de H_2O_2 en las membranas plasmáticas de células hepáticas muestran un incremento con respecto a su actividad basal cuando son activadas por Mn^{2+} [3 mM] en la presencia de etanol [50 mM]. *: $p < 0.05$ vs control sin Mn^{2+} ; **: $p < 0.05$ vs Mn^{2+} . El análisis estadístico se realizó por ANOVA. Se representa media \pm ES. $n = 3$.

Una vez demostrado el efecto del etanol nos planteamos 2 preguntas, primero las membranas plasmáticas obtenidas por el aislamiento del total de las células hepáticas contenían las membranas plasmáticas de diferentes tipos de células (Kupffer, endoteliales y hepatocitos) (83) por lo que se decidió realizar el proceso de elutriación para lograr la separación de los distintos tipos celulares y disponer de información confiable para cada uno de ellos. El análisis histológico de las muestras obtenidas por elutriación muestra que se obtiene una pureza celular para los hepatocitos de más del 90% (datos no mostrados).

Entonces decidimos medir la actividad del sistema en membranas plasmáticas de las células de Kupffer, en las células endoteliales y en los hepatocitos (todos los tipos celulares fueron obtenidos por elutriación). De acuerdo a los reportes de la literatura, una manera artificial de activar a la Nox es a través de concentraciones elevadas de Mn^{2+} (84), por lo que incubaron en presencia de altas concentraciones de Mn^{2+} [3 mM] y se midió la producción de H_2O_2 . Los resultados muestran que el manganeso (a la concentración utilizada) activa al sistema generador de H_2O_2 en los 3 tipos celulares que se exploraron. Los resultados también muestran que las membranas plasmáticas de las células de Kupffer y las endoteliales tienen una mayor actividad específica que las membranas plasmáticas de los hepatocitos, esto es, producen más H_2O_2 (fig.4).

Si comparamos la figura 3 (membranas plasmáticas de todos los tipos celulares) con la figura 4, se observa que la cantidad de H_2O_2 generado es muy similar, seguramente porque la mayoría de membranas incubadas son de

hepatocitos, lo que indica que una proporción muy importante de EOR generadas en el hígado será responsabilidad particular de los hepatocitos.

Posteriormente, habiendo comprobado la activación y la actividad de la isoforma de la NADPH oxidasa del sistema en la membrana plasmática del hepatocito, decidimos explorar y corroborar el efecto del etanol sobre la producción de EOR descrito previamente. Se incubaron a las membranas plasmáticas de hepatocito con etanol [50 mM] en presencia de Mn^{2+} [3 mM] y se midió la producción de H_2O_2 . Los resultados indican un incremento en la generación de H_2O_2 en las membranas incubadas con etanol mas Mn^{2+} en comparación de los controles (ver figura 5). En comparación con los resultados mostrados en la figura 3, las membranas de hepatocitos generan una cantidad muy similar al conjunto de membranas plasmáticas de todos los tipos celulares, además que el incremento de H_2O_2 por el etanol es muy similar, sugiriendo que las membranas de hepatocito son las responsables de dicho incremento. En ausencia de manganeso el etanol no incrementó la producción de H_2O_2 .

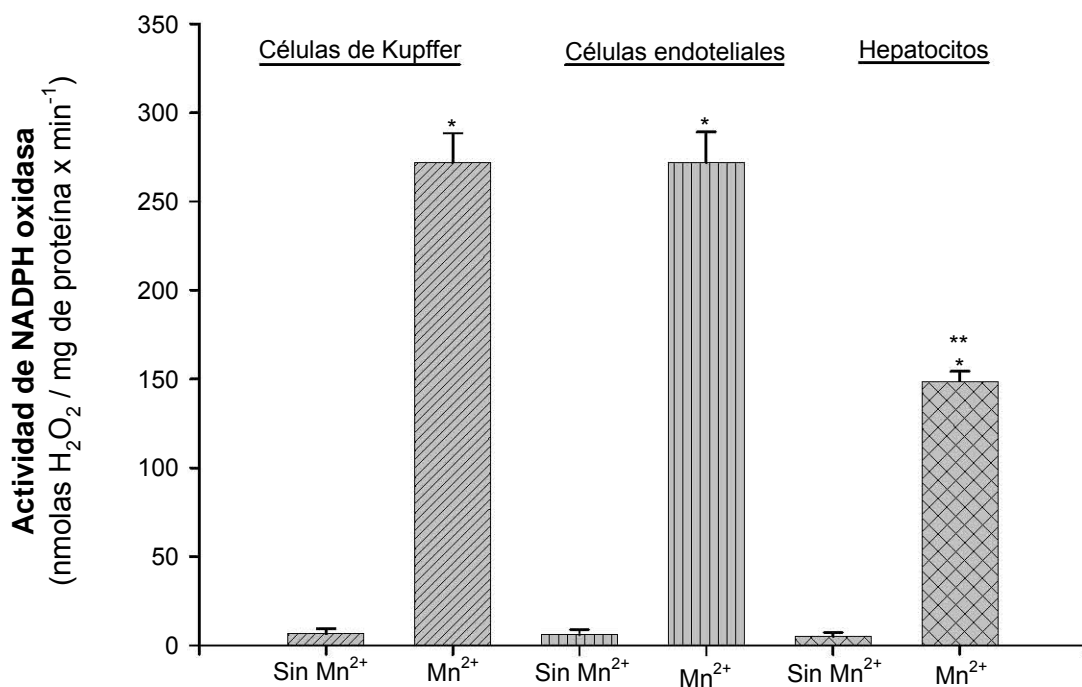


Figura 4. Activación con Mn²⁺ [3 mM] del sistema de la NADPH oxidasa en los 3 tipos celulares estudiados. *: p < 0.01 vs su control respectivo sin Mn²⁺; **: p < 0.05 vs membranas plasmáticas de células de Kupffer y membranas plasmáticas de células endoteliales activadas con Mn²⁺. El análisis se realizó por ANDEVA. Los datos se refieren a la media ± ES. n = 4.

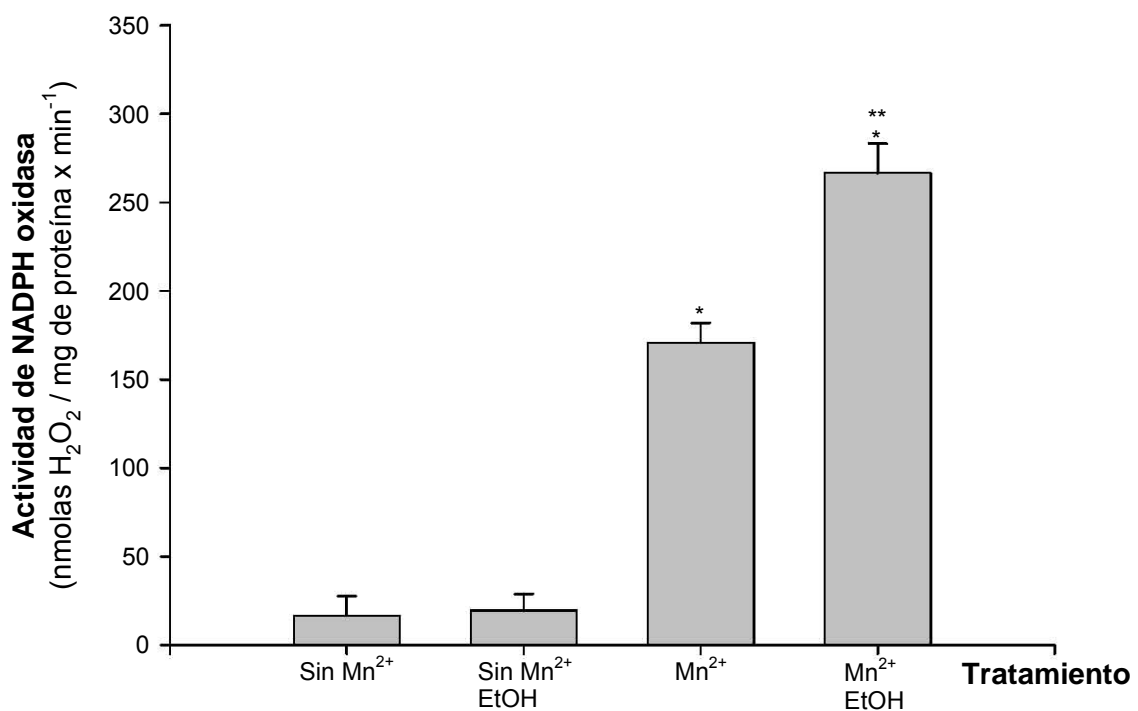


Figura 5. Producción de H₂O₂ en las membranas plasmáticas en preparaciones enriquecidas con hepatocitos por medio de la elutriación e incubadas con etanol [50 mM] y Mn²⁺ [3 mM]. *: p < 0.05 vs control sin Mn²⁺; **: p < 0.05 vs control con Mn²⁺. Se representan los valores promedio ± ES. n = 4.

Después de demostrar que los hepatocitos pueden ser responsables de sintetizar H_2O_2 vía las isoformas de Nox, tratamos de resolver un segundo problema del sistema: el uso de una concentración muy elevada de Mn^{2+} [3 mM], para activar a la enzima. Considérese que la concentración fisiológica de Mn^{2+} en el hígado está en el rango micromolar (81). En primer lugar decidimos realizar una curva dosis-respuesta y explorar algún efecto activador a concentraciones inferiores del catión.

Los resultados muestran que a concentraciones dentro del rango fisiológico de Mn [3×10^{-6} M] no existe activación del sistema. Como el etanol demostró un efecto activador en el sistema de la Nox, el siguiente experimento consistió en añadirlo al amortiguador de activación en presencia de concentraciones crecientes de Mn^{2+} . Los resultados indican que se suman los efectos activadores del Mn^{2+} y el etanol (fig. 6). Pero en las membranas incubadas con el etanol [50 mM] y en presencia de Mn^{2+} [3×10^{-6} M] existe un incremento significativo en la activación del sistema con respecto a los valores en ausencia de etanol. A concentraciones más elevadas de Mn^{2+} , más alejadas del rango fisiológico, también existe un incremento en la producción de H_2O_2 por acción del etanol. Los resultados se muestran en la figura 6.

A continuación decidimos explorar la respuesta de activación del sistema al mantener una concentración baja de Mn^{2+} [3 μM], de por sí solo inefectiva para lograr la activación de la Nox, en presencia de concentraciones variables de etanol. Los resultados muestran que el etanol presenta una constante de activación para este sistema de aproximadamente 25 mM. Recuerde que las concentraciones de etanol que se alcanzan en sangre durante una actividad social en la cual un individuo ha ingerido 3 bebidas alcohólicas están en valores

cercanos a 20 mM (61). Además se encontró que el sistema no se activa más al elevar la concentración de etanol arriba de 50 mM. Los resultados se muestran en la figura 7.

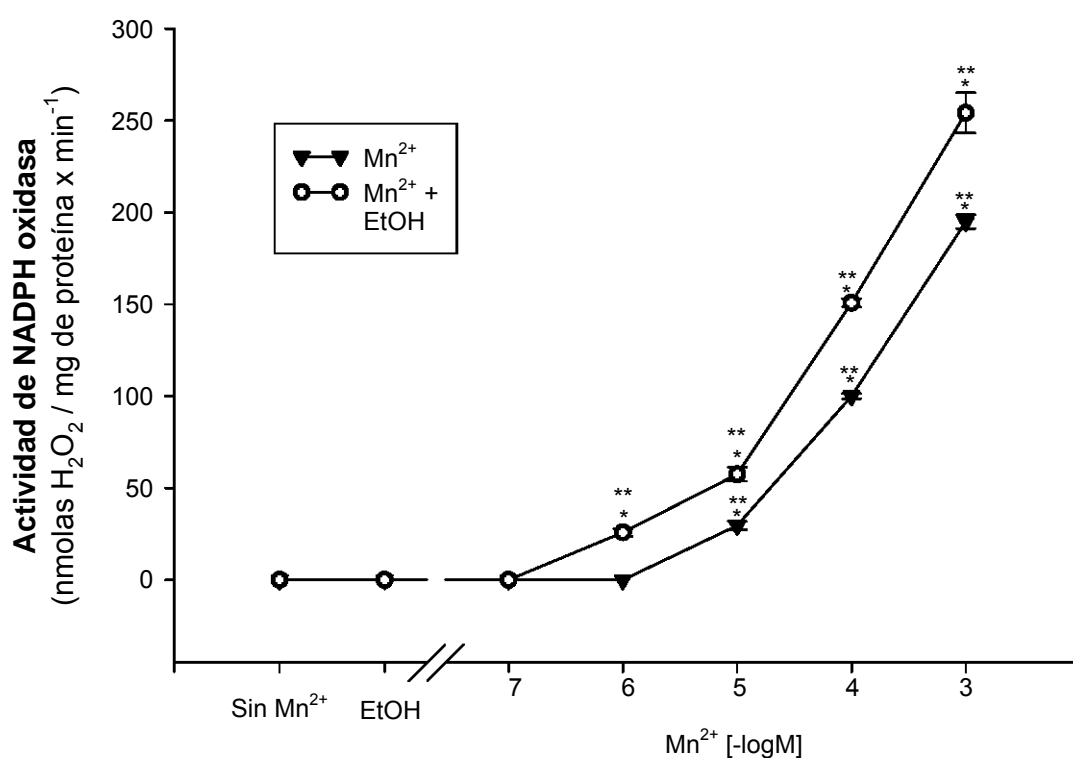


Figura 6. Producción de H₂O₂ en las membranas plasmáticas de hepatocito activadas con concentraciones crecientes de Mn²⁺ y una concentración fija de etanol [50 mM]. *: p < 0.05 vs control sin Mn²⁺; **: p < 0.05 vs Mn²⁺ [3 X 10⁻⁶ M]. Se representa el valor promedio ± ES. n = 4.

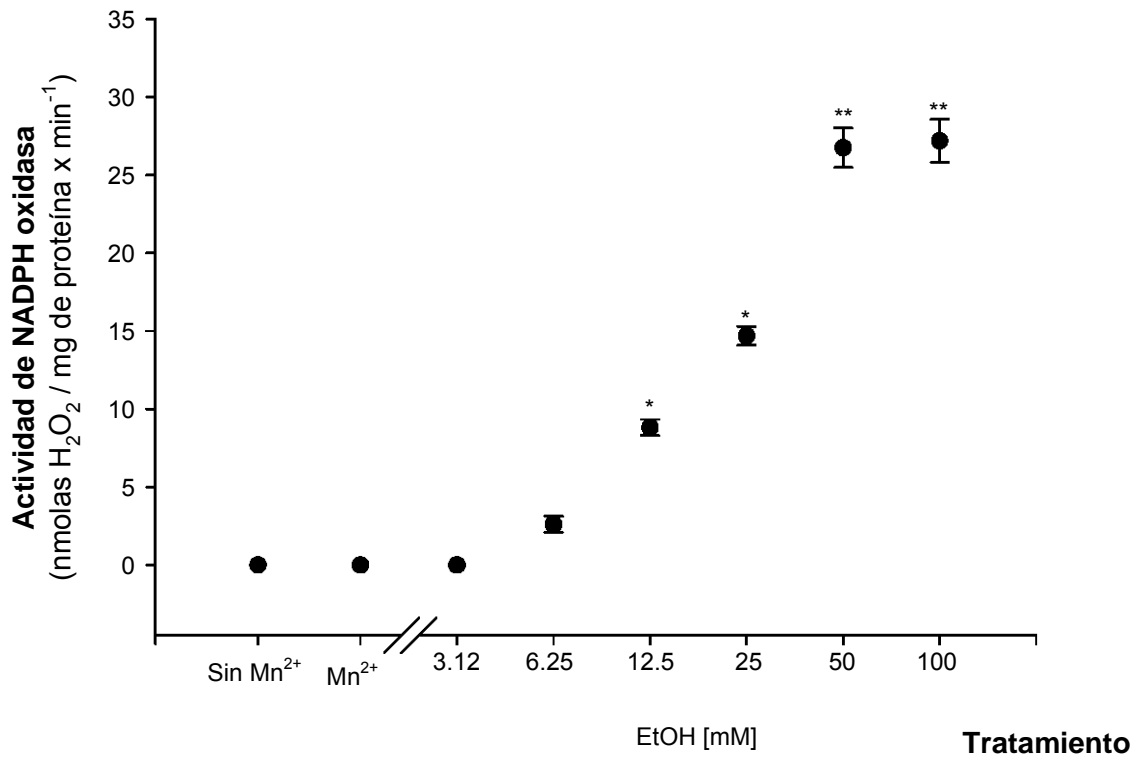


Figura 7. Producción de H₂O₂ en las membranas plasmáticas de hepatocitos, incubadas a concentraciones crecientes de etanol, en presencia de manganeso [3 X 10⁻⁶ M]. *: p < 0.05 vs control con Mn²⁺; **: p < 0.01 vs control con Mn²⁺. El análisis estadístico utilizado fue ANDEVA. Se representa el valor promedio ± ES. n = 4.

Los siguientes experimentos se diseñaron para obtener evidencia adicional de que la generación de H_2O_2 estimulada por la acción del etanol fuera consecuencia de una mayor activación de alguna isoforma latente o inactiva de la NADPH oxidasa, que al activarse promoverá una mayor actividad catalítica. En ese sentido decidimos utilizar primero un inhibidor inespecífico de flavoproteínas llamado difenilidonio (DPI), el cual bloquea la actividad catalítica de las Nox al unirse al sitio de unión al FAD y evitar el traspaso de electrones del NADPH hacia el O_2 evitando la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$.

El experimento se realizó activando al sistema con etanol [50 mM] más manganeso [3×10^{-6} M] y se incubó en el amortiguador de activación en presencia de DPI [1×10^{-5} M]. Posteriormente se midió la producción de H_2O_2 . Los resultados mostraron la inhibición en la producción de H_2O_2 por el DPI, lo que aporta evidencia adicional sobre la participación de una Nox en la generación de EOR por etanol. Los resultados se muestran en la figura 8.

El uso de anticuerpos específicos para identificar proteínas es un recurso usado con enorme frecuencia en la investigación bioquímica. Por medio de esta estrategia se decidió explorar cual isoforma de la Nox es la que se activa por la mezcla de 3 μM de Mn^{2+} y 50 mM de etanol y está involucrada en la generación de EOR en la membrana plasmática de hepatocitos. Además, decidimos explorar la eventual participación de proteínas G monoméricas ya que uno de los componentes de Nox2 es una proteína Rac (20,23). Para ello se decidió utilizar anticuerpos policlonales dirigidos contra el C-terminal Nox2, Nox1, Rac1 y Rac2 (Sta Cruz, Biotechnology), pues existen antecedentes de la expresión de Nox1, Nox2 y Nox4 en el hepatocitos; sin embargo, en antecedentes del laboratorio donde se realizó la tesis indican que

solo los anticuerpos dirigidos contra Nox1 y Nox2 modifican la producción de EOR en las membranas plasmáticas de hepatocito estimuladas con epinefrina, mientras que con los anticuerpos dirigidos contra Nox4 no modifican la actividad.

Los resultados muestran la inhibición en la producción de H_2O_2 de las membranas plasmáticas secundaria a la activación con etanol [50 mM] más Mn^{2+} [3×10^{-6} M] cuando son incubadas con el anticuerpo dirigido contra la Nox2 y la Rac1. Con el anticuerpo dirigido contra Nox1 y Rac2 no se demostró inhibición significativa. Estos resultados aportan la evidencia importante de que el etanol activa a una Nox2 localizada en la membrana plasmática del hepatocito de la rata, posiblemente a través de la proteína Rac1. Los resultados se muestran en la figura 9.

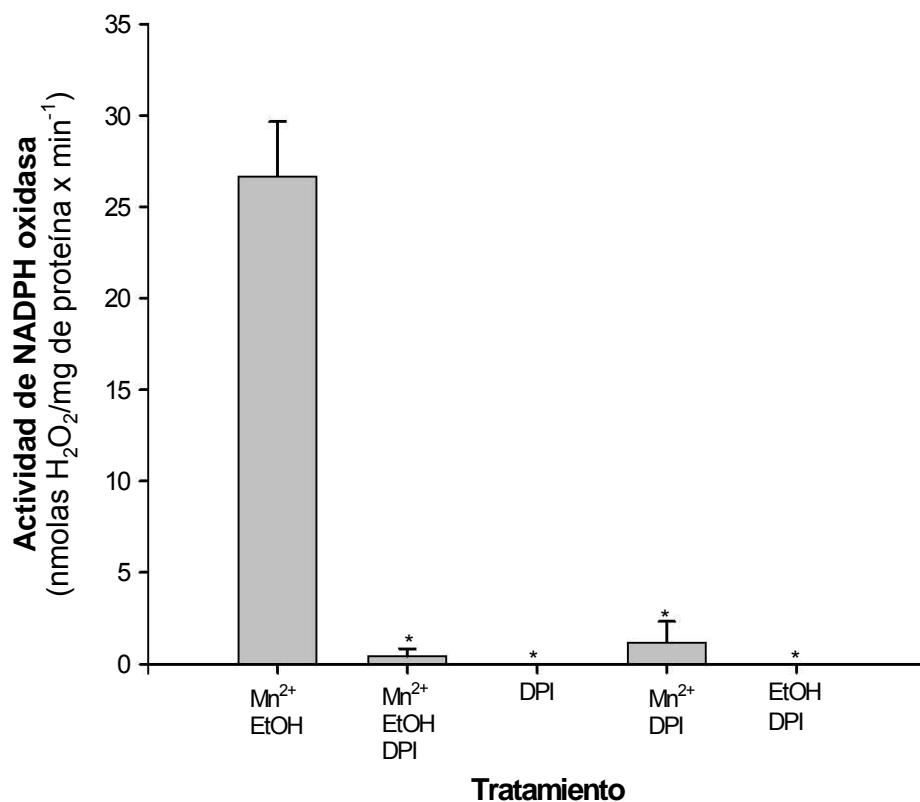


Figura 8. Producción de H₂O₂ en las membranas plasmáticas de hepatocito incubadas con etanol [50 mM] más manganeso [3X10⁻⁶M] en presencia de DPI [1X10⁻⁵M]. *: p < 0.01 vs Mn²⁺ + EtOH. El análisis estadístico se realizó por ANDEVA. Se representa el valor promedio ± ES. n = 3.

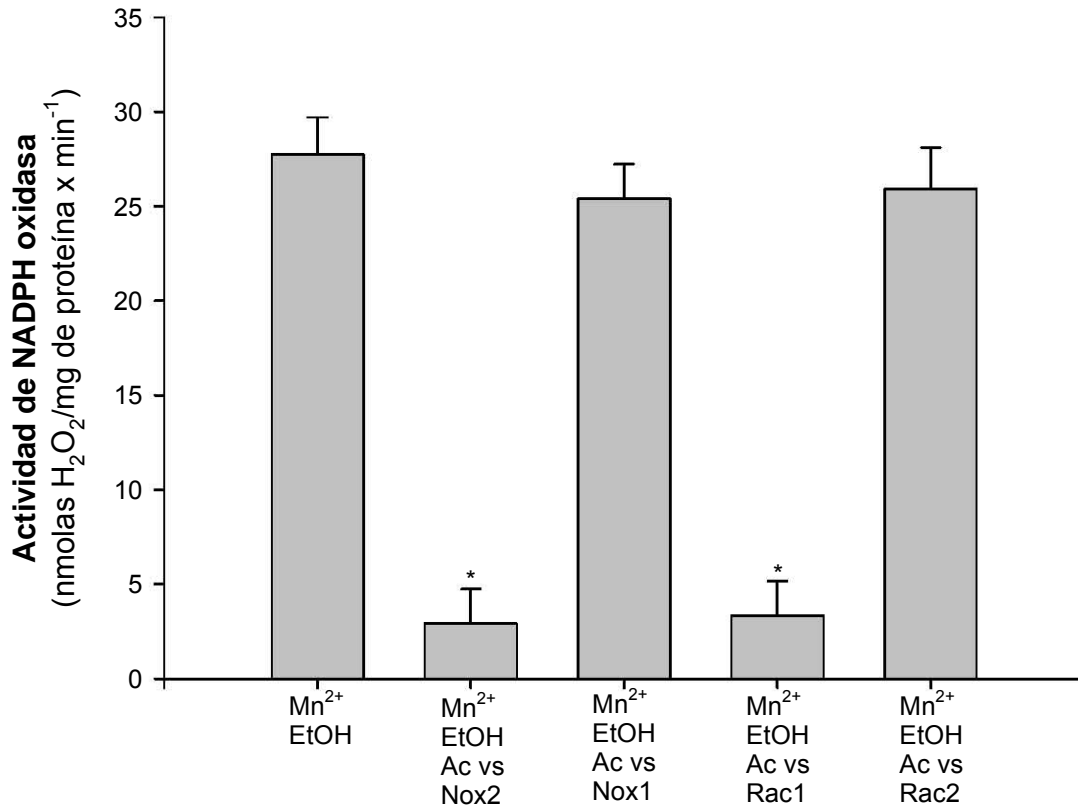


Figura 9. Participación de la Nox2 y la Rac1 en la producción de H₂O₂ en las membranas plasmáticas de hepatocito. Las concentraciones de etanol y Mn²⁺ utilizadas fueron 50 mM y 3 X 10⁻⁶ M, respectivamente. La dilución de todos los anticuerpos utilizados fue de 1:400. *: p< 0.01 vs Mn²⁺ + EtOH. El análisis se realiza por ANDEVA. Se representa el valor promedio ± ES. n = 3.

10. DISCUSIÓN

La existencia de antecedentes en literatura internacional sobre la participación de la NADPH oxidasa (Nox) en el incremento de las EOR relacionado con el consumo de etanol (69,70, 72) nos condujo a plantear una posible participación directa del etanol sobre la actividad de alguna isoforma de Nox, localizada en la membrana plasmática del hepatocito y el consecuente incremento en la producción de EOR.

La naturaleza estructural del hígado, constituido por varios tipos celulares, capaces de generar EOR, plantea el reto de obtener muestras de hepatocitos altamente purificados, ya que en reportes de trabajos anteriores en las que se determina la producción de EOR en hepatocitos, la producción determinada en dichos reportes se realizó en muestras contaminadas con 20% o más de otras células hepáticas (72). A diferencia de lo mencionado anteriormente, en esta tesis se consiguió obtener muestras de hepatocitos con una pureza mayor al 95%, lo que aporta una alta confiabilidad de que la producción de EOR determinada es responsabilidad de los hepatocitos y sólo una proporción muy pequeña de otros tipos celulares.

Ahora bien, la obtención de membranas plasmáticas con una contaminación mínima por otros organelos generadores de EOR, comprobada por la determinación de la actividad enzimática de la 5'nucleotidasa, la cual nos indica un enriquecimiento de las membranas plasmáticas, y por la mínima actividad de la glucosa 6-fosfatasa y la succinato deshidrogenasa, señalan que la producción de EOR determinadas en nuestra muestra son realmente generadas por la membrana plasmática del hepatocito, con una confiabilidad muy elevada.

La metodología empleada en este trabajo aporta 2 ventajas con respecto a trabajos previos en los que se determinó de producción de EOR en hígado: primero, permite determinar la generación de H_2O_2 en un tipo celular específico, en nuestro caso nos referimos a los hepatocitos, pues los trabajos previos se realizaron con la presencia de todos los tipos celulares presentes en el hígado, por lo que la participación de cada tipo celular no queda completamente clara; y segunda, esta metodología nos permite hacer la determinación en un tipo de organelo celular específico por medio del cual se producen las EOR. Sin embargo, no se debe de pasar por alto que al tratarse de un estudio *in vitro*, la participación de otros organelos celulares en la producción de EOR secundarias a la presencia de etanol no debe descartarse como una respuesta en el contexto celular global.

Inicialmente se logró la activación del sistema artificialmente con concentraciones suprafisiológicas de Mn^{2+} basados en los reportes existentes para la activación artificial de la Nox en adipocitos (43) y en células hepáticas (71). La producción de EOR de las membranas plasmáticas de células de Kupffer, de células endoteliales y en los hepatocitos activadas con concentraciones muy elevadas de Mn^{2+} muestran que los 3 tipos de membranas plasmáticas poseen sistemas generadores de $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, a pesar de que la producción de EOR por miligramo de proteína sea significativamente mayor en las membranas plasmáticas de células de Kupffer y de células endoteliales activadas artificialmente con Mn^{2+} , si consideramos que del total de células del hígado el 80% son hepatocitos, y el resto 20% se distribuye entre los otros tipos celulares, se puede considerar que en este

sistema, las membranas plasmáticas de los hepatocitos generan una cantidad muy importante de EOR en el órgano integro.

Si consideramos que concentraciones sumamente elevadas utilizadas para la activación del sistema no se encuentran en ningún tipo celular hace difícil tratar de traspolar el efecto del Mn^{2+} a los procesos celulares fisiológicos, pero el hallazgo de que el etanol estimula la activación de la Nox sólo en presencia de concentraciones fisiológicas de Mn^{2+} coloca a este catión divalente como un elemento que puede ser sumamente importante para la función de algunos tipos de Nox, posiblemente a través de la estabilización de algunas proteínas (80). Además, que el Mn^{2+} , a bajas concentraciones, por sí mismo no estimule la producción de EOR en la membrana plasmática, y solo en presencia de etanol confirma que el etanol realmente estimula la producción de las EOR en los hepatocitos de rata.

En la literatura actual no existen antecedentes sobre la activación directa de la Nox por el etanol, ni la utilización de concentraciones fisiológicas de Mn^{2+} para la activación de las Nox en ningún tejido, pero si existen reportes de que el etanol induce la expresión de algunas de las proteínas de alguna Nox en los alvéolos pulmonares (85), abriendo la posibilidad de que los dos fenómenos mencionados sean parte de una respuesta integral de la célula a la presencia de etanol. Sin embargo, a pesar de que no existen trabajos de la existencia de alguna Nox en el hígado, la existencia de datos del laboratorio en donde se realizó esta tesis y la inhibición de la producción de EOR, estimulada por el etanol, con el uso de inhibidores inespecíficos y por el uso de anticuerpos contra la Nox2 nos muestra que en el hepatocito realmente existe una Nox2 que puede ser estimulada por el etanol.

La existencia de reportes en la literatura sobre la activación de proteínas G monoméricas de la familia Rho (86, 87), al que pertenecen las proteínas Rac, la participación de las proteínas Rac en la regulación de la Nox2 de células fagocíticas (21, 22) y la inhibición de la generación de EOR por la Nox2 localizada en el hepatocito, a través de anticuerpos contra Rac1, sugiere que el efecto del etanol posiblemente esté mediado a través de la activación de la proteína Rac1 y no directamente sobre la unidad catalítica de la Nox2. En la figura 10 se esquematiza la propuesta de la estimulación de la Nox2 por el etanol.

Por otro lado, en las células fagocíticas cuando se encuentran en su estado inactivo, las proteínas reguladoras de la Nox2 se encuentran localizadas en el citosol, y al ser activada la enzima migran y se anclan a la membrana plasmática (21). En nuestro sistema, la inhibición de la actividad de la Nox2 por anticuerpos dirigidos contra Rac1 indica que posiblemente las proteínas reguladoras de la Nox2 se encuentren localizadas en la membrana plasmática, lo cual difiere de todos los modelos de Nox2 en los cuales todas las proteínas reguladoras son de localización citosólica. Sin embargo, en esta tesis no se exploró la participación de otras proteínas reguladoras, lo que hace necesaria la exploración sobre la participación y localización de las otras proteínas reguladoras en la activación de la Nox2 por el etanol. Otra posibilidad que puede explicar la inhibición de la estimulación de Nox2 por etanol al usar anticuerpos de Rac1 es que el complejo enzimático de la Nox2 se ensambla durante el proceso de obtención de las membranas plasmáticas y se mantiene inactiva hasta que es activado por el etanol.

En conclusión, los resultados confirman que el etanol estimula la actividad de la Nox2, posiblemente a través de la proteína Rac1, localizada en la membrana plasmática de hepatocito de la rata. Además de que dicha actividad es estimulada a concentraciones relativamente bajas de etanol, similares a las alcanzadas con el consumo del alcohol contenido en 3 bebidas ingeridas en una reunión social (12 a 25 mM). Los datos reportados en esta tesis confirman la hipótesis propuesta al inicio del proyecto; sin embargo, aún cuando los resultados de la tesis son un hallazgo potencialmente importante para contribuir a una explicación más completa y detallada sobre la participación de las EOR en la fisiología hepática y en la fisiopatología de la lesión hepática por etanol, la naturaleza del trabajo nos obliga a realizar estudios más detallados para poder definir la participación de las EOR generadas por la Nox2 estimulada por el etanol y poder asignarle su papel en la patología de la enfermedad hepática por etanol.

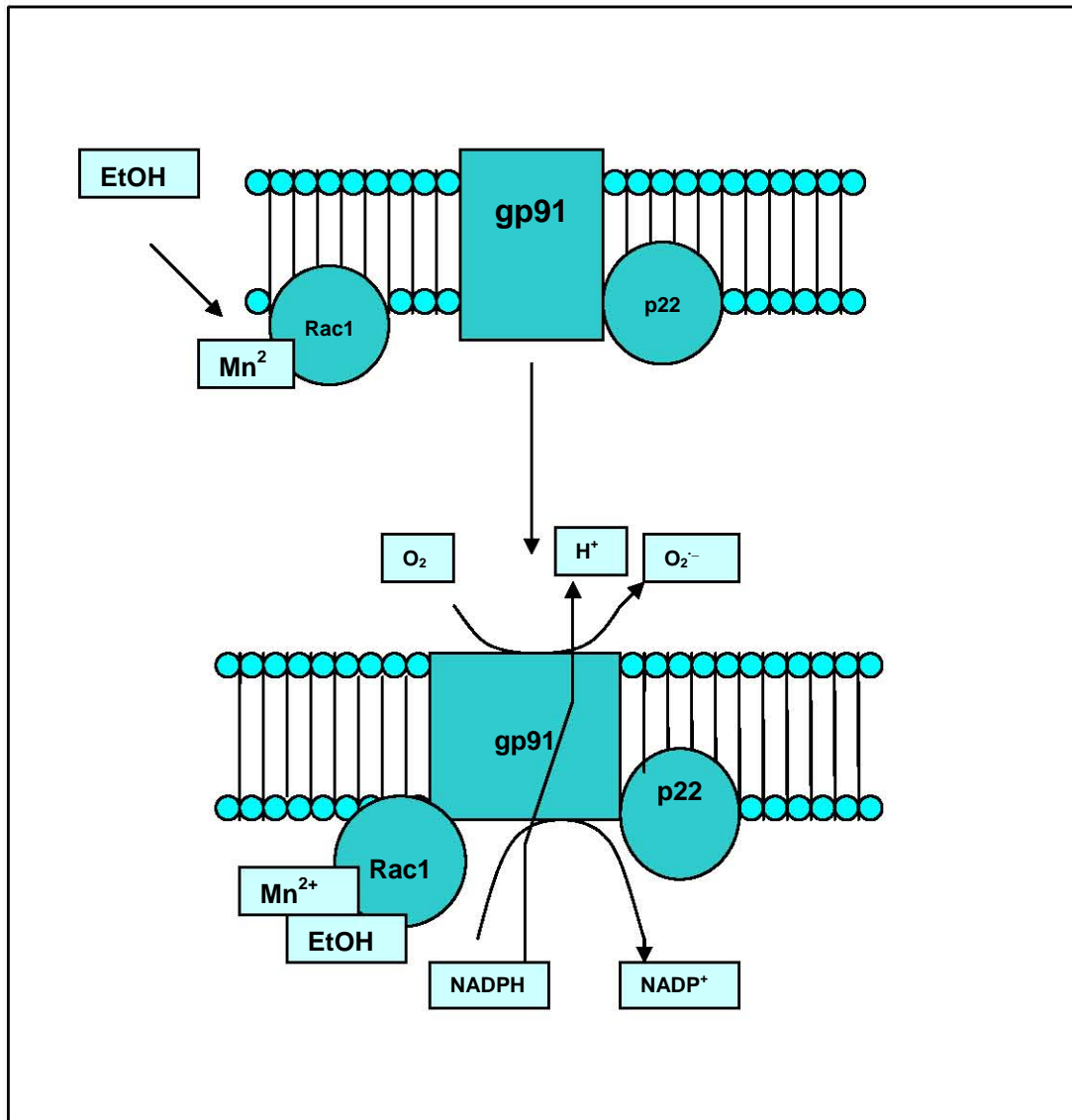


Figura 10. Esquema hipotético de estimulación de Nox2 por el etanol.

El Mn²⁺ posiblemente estabiliza a la proteína Rac1, para que el etanol logre la activación de dicha proteína y se logre la estimulación de la subunidad catalítica gp91, posiblemente a través de la interacción de p67 y las otras subunidades reguladoras de la Nox2, sin embargo no se esquematizan por no haber sido explorada su participación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Halliwell B (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. New York. Oxford University Press. p: 22-85.
- 2.- Valko M, Izakovic M, Mazur MR, Rhodes CJ y Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Biol Cell Biochem*. 266: 37-56.
- 3.- Fridovich I (1999). Fundamental aspect of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Ann N Y Acad Sci*. 893: 13-18.
- 4.- Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- 5.- Huie RE y Padmaja S (1993). The reaction of NO· with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199.
- 6.- Massey V (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem* 269: 22459-22462.
- 7.- Stone JR y Yang S (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants and REDOX signaling*. 8 (3,4): 244-262.
- 8.- Nordberg J y Arnér ESJ (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med* 31 (11): 1287-1312.
- 9.- Pryor AW, Houk KN, Foote CF, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL y Davies KJ (2006). Free radical biology and medicine: It's a gas man!. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Article in press.
- 10.- Rojkind M, Domínguez-Rosales JA, Nieto N y Greenwel P (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 59: 1872-1891.
- 11.- Cai J y Jones DP (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273: 11401-11404.
- 12.- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC y Schumacker PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11715-11720.
- 13.- Schepetkin IA (1999). Lucigenin as a substrate of microsomal NADPH oxidoreductases. *Biochemistry* 64(1): 25-32.
- 14.- Orellana M y Guajardo V (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile* 132: 85-94.

- 15.- Bader M, Muse W, Ballou DP, Gassner C y Bardwell JC (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* 98: 217-227.
- 16.- Mohazzab KM y Wolin MS (1994). Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO₂ sensor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 267: L823-L831.
- 17.- Boveris A, Oshino N y Chance B (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.
- 18.- Tolbert NE y Essner E (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* 91: 271-283.
- 19.- Li C y Jackson RM (2002). Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282. C227-C241.
- 20.- Segal AW, Garcia R, Goldstone H, Cross AR y Jones OT (1981). Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J* 196 (1): 363-367.
- 21.- Babior BM (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16(1): 42-47.
- 22.- Lambeth DJ (2004). Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Immunology* 4:181-189.
- 23.- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA y Elbim C (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp* 53 (3): 199-206.
- 24.- De Leo FR, Ulman KV, Davis AR, Jutila KL y Quinn MT (1996). Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem* 271(29): 17013-17020.
- 25.- de Mendez I, Homayounpour N y Leto TL (1997). Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation.. *Mol Cell Biol* 17(4): 2177-2185.
- 26.- Nisimoto Y, Ogawa H, Miyako K y Tamura M (2004). Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex.. *Biochemistry* 43(29): 9567-9575.
- 27.- Kuribayashi F, Nuno H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T y Sumimoto H (2002). The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 21(23): 6312-6320.

- 28.- Bokoch GM y Diebold GA (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100: 2692-2696.
- 29.- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Cheng AB, Griendling KK y Lambeth JD (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401(6748): 79-82.
- 30.- Kawahara T, Kohjima M, Kawano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H y Rokutan K (2005). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(2): C450-C457.
- 31.- Krause KH (2004). Tissue distribution and putative physiological function of Nox family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57: S28-S29.
- 32.- Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H y Fukumoto M (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254(1-2): 237-243.
- 33.- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG y Lambeth JD (2001). Homologs of gp91^{phox}: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269 (1-2):131-140.
- 34.- Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W y Bergstrom DE (2004). Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18(5): 486-491.
- 35.- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y y Sumimoto H (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase kidney. *J Biol Chem* 276(2): 1417-1423.
- 36.- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P y Leto TL (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8010-8014.
- 37.- Varma SD y Devamanoharan PS (1990). Excretion of hydrogen peroxide in human urine *Free Radic Res Commun*. 8(2): 73-78.
- 38.- Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG y Abboud HE (2004). Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 38(Pt 1): 231-239.
- 39.- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W y Key L (2001). A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem* 276(8): 5452-5458.

- 40.- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD y Griending KK (2001). Novel gp91 (phox) homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88(9): 888-894.
- 41.- Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H y Lida M (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109(2): 227-233.
- 42.- Cucoranu I, Clempus R, Dilelova A, Phelan PJ, Ariyam S, Dikalov S y Sorescu D (2005). NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 97(9): 900-907.
- 43.- Krieger-Brauer HI y Kather H (1992). Human cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 89(3): 1006-1013.
- 44.- Krieger-Brauer HI, Medda PK y Kather H (1997). Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membrane is mediated by G_α₁₂. *J Biol Chem* 272(15): 10135-10143.
- 45.- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD y Goldstein BJ (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 24(5): 1844-1854.
- 46.- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N y Krause KH (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276(40): 37594-37601.
- 47.- Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH y Cox JA (2004). Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279(18): 18583-18591.
- 48.- Baker M y Aitken RG (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 216(1-2): 47-54.
- 49.- Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Aturrock AB, Quinn MT, Lambeth JD y Hoidal JR (2003). NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2): C353-C369.

- 50.- Lacroix L, Nocera M, Mian C, Caillou B, Virion A, Dupuy C, Filetti S, Bidart JM y Schlumberger M (2001). Expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase flavoprotein. DUOX genes and proteins in human papillary and follicular thyroid carcinomas. *Thyroid* 11(11): 1017-1023.
- 51.- De Deken X, Wang D, Dumont JE y Miot F (2002). Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* 273(2): 187-196.
- 52.- Ameziane-El-Hassani R (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem* 280(34): 30346-30354.
- 53.- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotseburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T y Ris-Stalpers C (2002). Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347(2): 95-102.
- 54.-Geiszt M, Witta j, Baffi J, Lekstrom K y Leto TL (2003). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J* 17(11): 1502-1504.
- 55.- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R y Conner GE (2005). Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(5): 462-469.
- 56.- Schwarzer C, Machen TE, Illek B y Fischer H (2004). NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 279(35): 36454-36461.
- 57.- Stryer L (2003). *Bioquímica*. Revérte Méx. 5ta ed. p:506.
- 58.- Katzung BG (2004). *Basic and Clinical Pharmacology*. McGraw Hill. 9th ed. p: 367-378.
- 59.- Piña E, Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA y Zentella M (2003). ¿Es tóxico el etanol? *Mensaje Bioquímico*. México UNAM p: 121-146.
- 60.- Lieber CS (2002). Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nut* 20:395-430.
- 61.- Zentella M y Piña E (1987). Metabolitos del etanol. *Mensaje Bioquímico*. UNAM. p: 10: 143-175.
- 62.- Best CA y Laposata M (2003). Fatty acids ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Front Biosci* 8: e202-220.

- 63.- Valenzuela A, Fernandez N, Fernandez V, Ugarte G y Videla LA (1980). Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and on the activity of enzymes related to peroxide metabolism in rat liver. *FEBS letters* 111(1): 111-113
- 64.- Cederbaum AI, Wu D, Mari M y Bai J (2001). CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HEP G2 cells. *Free Rad Biol Med* 31:1539-1543.
- 65.- Dicker E y Cederbaum AI (1998). Increased oxygen radical-dependent inactivation of metabolic enzymes by liver microsomes after chronic ethanol consumption. *FASEB J* 2:2901-2906.
- 66.- Kono H, Bradford BU, Yin M, Sulik KK, Koop DR, Peters JM, González FG, McDonald T, Dikaliva A, Kadiiska MB, Mason RP y Thurman RG (1999). CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol* 277: G1259-G1267.
- 67.-Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK y Thuerman RG (1994). Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20:453-460.
- 68.- Arai M (1986). Effect of ethanol on the intestinal uptake of endotoxin (abstract). *Nippon Shokakibyō Grakkai Zasshi* 83:1060.
- 69.- Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal HB, Bradford BU, Holland SM y Thurman RG (2000). NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 106:867-872.
- 70.- Hasegawa T, Kikuyama M, Sakurai K, Kambayashi Y, Adachi M, Saniabadi AR, Kuwano H y Nakano M (2002). Mechanism of superoxide anion production by hepatic sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells during short-term ethanol perfusion in the rat. *Liver* 22:321-329.
- 71.- Guerra GR (2005). Identificación de un sistema de membrana plasmática de células hepáticas regulado por receptores adrenérgicos que genera especies reactivas de oxígeno. Méxido. UNAM FMVZ.
- 72.- Castrejón-Sosa M, Villalobos-Molina R, Guinzberg R y Piña E (2002). Adrenaline (via α_{1B} -adrenoceptors) and ethanol stimulate $\text{OH}\cdot$ radical production in isolated rat hepatocytes. *Life Science* 71: 2469-2474.

- 73.- Friend AS y Berry MN (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Biol Chem* 43: 506-512.
- 74.- Guinzberg R, Laguna I, Zentella A, Guzman R y Piña E (1987). Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J* 245:371-374.
- 75.- Davies R, Cain K, Edwards RE, Snowden RT, Legg RF y Nel GE (1990). The preparation of highly enriched fractions of binucleated rat hepatocytes by centrifugal elutriation and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 190: 266-270.
- 76.- Wanson JC, Bernaert D, Penasse W, Mosselmans R y Bannasch P (1980). Separation in distinct subpopulations by elutriation of liver cells following exposure of rats to N-nitrosomorpholine. *Cancer Res* 40:459-471.
- 77.- Kinf TE (1967). Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Meth Enzymol* 10: 322-331.
- 78.- Morré J (1971). Isolation of Golgi apparatus. *Meth Enzymol* 22: 131-141.
- 79.- Touster O (1970). Isolation of rat liver plasma membranes. *J Cell Biol* 47: 604-628.
- 80.- Minelli A, Allegrucci C, Rosati R y Mezzasoma I (1998). Regulation of agonist-receptor binding by G proteins and divalent cations in spermatozoa solubilized A1 adenosine receptors. *Mol Gen Metabol* 63: 183-190.
- 81.- Fioravanti CF y Reisig JM (1990). Mitochondrial hydrogen peroxide formation and fumarate reductase of *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 76(4): 457-463.
- 82.- Jones RD, Hancock JT y Morice AH (2000). NADPH oxidase: an universal oxygen sensor?. *Free Radical Biology and Medicine* 29(5):416-424
- 83.- Geneser F (2003). *Histology*. McGraw-Hill. 3th ed. p:236-247
- 84.- Wente RS, Villalba M, Schramm VL y Rosen OM (1990). Mn²⁺-binding properties of a recombinant protein-tyrosine kinase derived from the human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2805-2809.
- 85.- Polikandriotis JA, Rupnow HM, Elms SC, Clempus ER, Campbell DJ, Sutliff RL, Brown LA, Guidot DM y Hart CM (2006). Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(3): 314-319 (abstract).

86.- Slate JS, Cook AC, Seiz JL, Malinowski SA, Stagliano BA y Stubbs CD (2003). Effects of ethanol on protein kinase C α activity induced by association with Rho GTPases. *Biochemistry* 42: 12105-12114.

87.- Yong Q, Luo J, Leonard SS, Harris GK y Shi X (2002). Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by cdc42 are essential for ethanol-induced *in vitro* angiogenesis. *J Biol Chem* 277: 16189-16197.

