

## BM-12

LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS  $\alpha_{1B}$  Y  $\beta_3$ , VÍA UNA ENZIMA NADPH OXIDASA PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL ESTADO REDOX EN EL HÍGADO DE RATA

Guerra-García Ruy, Guinzberg-Perrusquía Raquel, Piña-Garza Enrique.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70159, C.P. 04510 México D.F. Fax: 56162419. e-mail: epgarza@servidor.unam.mx.

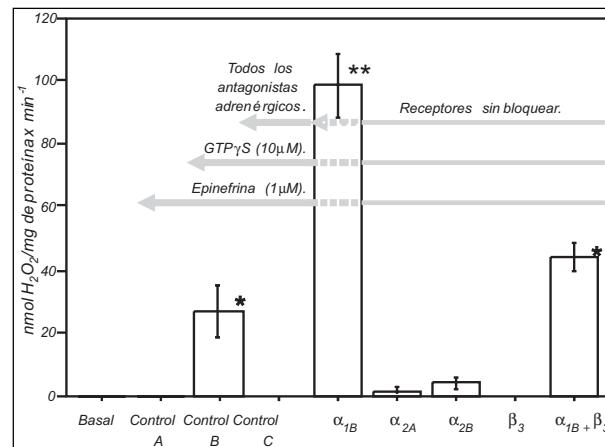
**Palabras clave:** Receptores adrenérgicos  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_3$ , GTP, NADPH oxidasa.

**Introducción:** La primera enzima NADPH oxidasa (Nox) descrita fue la presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, llamada Nox 2.<sup>1</sup> Esta enzima está constituida por dos subunidades transmembranales: gp91 y p22, y tres subunidades citoplásmicas: p47, p67 y p40. En el momento en que el neutrófilo reconoce a un patógeno se produce el ensamble de las subunidades citoplásmicas con las transmembranales vía una GTPasa y por medio de la gp91 se traslocan los electrones del NADPH al oxígeno, para formar especies reactivas de oxígeno (ROS) y destruir al agente invasor.<sup>2</sup> Hasta el momento se han descrito siete proteínas homologas a la gp91 del fagocito (gp91<sup>Nox</sup>) presentes en la mayoría de los órganos y sistemas de humano y murino, en donde desempeñan funciones tales como señalización, crecimiento y diferenciación celular y regulación de la expresión génica por medio de citocinas, factores de crecimiento y hormonas como activadores o inhibidores del sistema.<sup>3</sup>

**Metodología:** Se utilizaron ratas ♂ Wistar de 100 – 150gr alimentadas *ad libitum*. Las células hepáticas fueron aisladas por el método de Berry and Friend. Para la obtención de los fragmentos de membrana plasmática, las células hepáticas fueron suspendidas en un amortiguador de lisis, después de una agitación mecánica se centrifugaron a 1000 r.p.m. X 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue centrifugado a 10 000 r.p.m. X 10 minutos a 4°C y finalmente se realizaron dos lavados. Se analizó la actividad de las enzimas 5'-nucleotidasa, glucosa – 6-fosfatasa y succinato deshidrogenasa como marcadores de membrana plasmática, contaminación microsomal y mitocondrial respectivamente.

Para los ensayos de la actividad de la NADPH oxidasa se siguió un procedimiento basado en dos pasos con amortiguadores específicos a pH de 7.5 y 5.8 respectivamente: a) activación con epinefrina ( $1 \times 10^{-6}$ M) más GTP $\gamma$ S ( $1 \times 10^{-5}$ M) y los antagonistas específicos para cada tipo de receptor adrenérgico presente en células hepáticas: prazosina ( $\alpha_{1B}$ ), yohimbina ( $\alpha_{2A}$ ), rauwolscina ( $\alpha_{2B}$ ) y propranolol ( $\beta_3$ ) ( $1 \times 10^{-7}$ M) con el fin de evaluar la participación de cada uno de los receptores en la regulación de la NADPH oxidasa. B) Catalísis, en donde se agregó el sustrato de la enzima: NADPH (0.25mM). La producción de  $H_2O_2$  fue cuantificada por la técnica de Fioravanti.

**Resultados:** Las pruebas de pureza demostraron un enriquecimiento de membranas plasmáticas y sólo un 2% de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. Se demostró que el sustrato utilizado por la enzima es el NADPH ( $K_m$  44 $\mu$ M) y no el NADH, no requiere de ATP, el primer producto de la enzima es  $O_2^-$  y es inhibida por DPI (1 $\mu$ M) (256.25 nmol de  $H_2O_2$ /mg de proteína X min<sup>-1</sup> sin DPI y 118.75 nmol de  $H_2O_2$ /mg de proteína X min<sup>-1</sup> con DPI).



Los resultados son la media ± error estándar de 7 experimentos.

\* ( $p < 0.05$ ) al control A y C, \*\* ( $p < 0.01$ ) al control A y C.

**Figura 1.** Valoración de los receptores adrenérgicos presentes en células hepáticas en la regulación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa.

**Discusión:** La subunidad  $\alpha$  del trímero de las proteínas G, con las cuales los receptores adrenérgicos están asociados, tiene actividad de GTPasa. Al ser estimulados los receptores adrenérgicos por su agonista, la subunidad  $\alpha$  cambia su motivo de GDP a GTP y de esta manera se desencadena la cascada de señalización. El GTP $\gamma$ S presenta una molécula de azufre en el carbono  $\gamma$  que no permite que sea hidrolizado a GDP. En la figura 1 se muestra la necesidad del GTP para que pueda ser activada la enzima Nox por la epinefrina.

Estamos frente a una vía de señalización de la epinefrina por medio de ROS en células hepáticas de rata no antes descrita, que probablemente esté involucrada en procesos tales como la regulación de la expresión génica y el crecimiento y diferenciación celular.

**Conclusión:** La epinefrina vía el receptor  $\alpha_{1B}$  activa una enzima NADPH oxidasa que produce ROS en concentraciones ( $< 10$ mM) no tóxicas para la célula,<sup>4</sup> efecto que se ve inhibido por el receptor  $\beta_3$ .

## REFERENCIAS

1. Bokoch GM. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 502-508.
2. Groemping Y. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003; 113: 343-355.
3. Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidase. *Jap J Infect Dis* 2004; 57: S28-S29.
4. Halliwell B. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford. 1999.