Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

EFECTO DEL ACETALDEHÍDO SOBRE LAS VÍAS DE PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA REGULADAS POR NOREPINEFRINA EN HEPATOCITOS

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

BIÓL. EXP. JORGE ANTOLIO DOMÍNGUEZ BAUTISTA

Comité tutoral
Directora
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Asesores
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

México, D.F. 11 de Marzo de 2009.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

ASESORA
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Departamento de Biofísica
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
mhiriart@ifc.unam.mx

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por medio de los proyectos con clave 2004-C01-45921-M y CB-2006-1-61544.

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, con número de registro 309-0, pertenece al Posgrado en Biología experimental y forma parte de los programas de PIFOP-CONACYT con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de registro 203451, en el período 2006-2008.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "EFECTO DEL ACETALDEHÍDO SOBRE LAS VÍAS DE PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA REGULADAS POR NOREPINEFRINA EN HEPATOCITOS", con fecha de examen 11 de marzo de 2009.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE
Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud
División de ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
bet@xanum.uam.mx

SECRETARIA
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Departamento de Biofísica
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
mhiriart@ifc.unam.mx

VOCAL
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

VOCAL
Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Concepción Gutiérrez por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por financiar este proyecto de investigación, por la guía otorgada durante la maestría y por todo su apoyo.

Agradezco al Dr. Luis E. Gómez, por su paciencia, su participación en mi formación científica y por todo el apoyo otorgado.

Agradezco a la Dra. Marcia Hiriart por sus aportaciones a este trabajo, por darse el tiempo para asistir a los exámenes y su amabilidad.

Agradezco a la Dra. Mina Konigsberg por formar parte de mi jurado de examen y su apoyo como coordinadora del programa del Posgrado en Biología Experimental.

Agradezco al Dr. Miguel Betancourt por aceptar formar parte de mi jurado de examen y por sus observaciones al trabajo.

Agradezco a todos mis profesores de licenciatura y maestría en Biología Experimental.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Fisiología Celular de la UAM-I. Dra. Lety Bucio, Dra. Vero López, Dra. Vero Souza y Dra. Elizabeth Hernández.

Dedicatorias

A mis papás Sixto Domínguez Martínez y Sofía Bautista Flores.

A mis hermanos Martín, Héctor, Lety, César, Mari y Rubén Domínguez Bautista.

A mis sobrinos Julio, Gustavo, Joaquín, Hernán, Jacobo, Carlos, Araceli, Diana, Santiago, Jesús y Pedro.

A mis amigos Ma. Guadalupe I. Domínguez, Yared Santa Ana, Nadia M. Pérez, Elena Hernández, Juana Narváez, Oscar Spinoxa, Miguel A. Urbina, Miguel Macías y Francisco Lagunes.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Argelia, Berna, Natalia, Argelia, Mayra, Denise y Cristina.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Alicia, Karina, Lluvia y Noé.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC	Acetaldehído
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Activating Protein-1. Proteína activadora-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CYP2E1	Citocromo 450 2E1
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Epidermal Growth Factor. Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK1/2	Extracellular signal Regulated Kinase. Cinasa regulada por señales extracelulares.
GPCR	G Protein-Coupled Receptor. Receptor acoplado a proteínas G
GTP	Guanosine Triphosphate. Trifosfato de guanosina.
h	horas
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution. Solución salina balanceada de Hank
HGF	Hepatocyte Growth Factor. Factor de crecimiento de hepatocitos
IL-6	Interleucina 6
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase. Cinasa N-terminal de c-jun
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases. Proteínas cinasas activadas por mitógeno.
min	minutos
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide. Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	NAD reducido
NE	Norepinefrina
NF-κB	Nuclear Factor kappaB. Factor nuclear kappa B
PBS	Phosphate-Buffered Saline. Solución salina amortiguada por fosfatos
PKA	Protein Kinase A. Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	Protein Kinase C. Proteína cinasa dependiente de calcio
PP2A	Protein Phosphatase 2A. Proteína fosfatasa 2A
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase. Proteína fostasa de tirosina
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. Transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero fetal de bovino
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3. Transductor de señales y activador de transcripción 3
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha. Factor de necrosis tumoral alfa.

RESUMEN

El hígado tiene una capacidad regenerativa regulada por mecanismos complejos. En la regeneración hepática participan diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos y neurotransmisores como la norepinefrina, los cuales se unen a receptores membranales con actividad de cinasas de tirosina o acoplados a proteínas G, respectivamente. La unión de estos ligandos a los receptores activa cascadas de fosforilación como las de ERK1/2 y PI3K. Estas vías de señalización regulan respuestas como la expresión de genes importantes para la proliferación y sobrevivencia del tipo celular más abundante en el hígado: los hepatocitos.

Sin embargo, se ha observado que la exposición a etanol puede interferir con la capacidad regenerativa del hígado. El mecanismo de inhibición puede deberse al etanol mismo o a los productos de su oxidación, como las especies reactivas de oxígeno y el acetaldehído, el cual es un compuesto aún más tóxico que el etanol. Por lo tanto, es necesario estudiar a nivel molecular el efecto de cada uno de estos factores sobre los mecanismos de regeneración.

En un modelo de cultivo primario de hepatocitos de ratón se estudió el efecto del acetaldehído sobre las siguientes respuestas reguladas por la norepinefrina: 1) vías de proliferación y sobrevivencia ERK1/2 y PI3K, 2) activación del factor de transcripción NF-κB y 3) migración celular en un modelo de reparación. También se examinó si el acetaldehído afecta a la fosforilación de ERK1/2 regulada por el factor de crecimiento de hepatocitos, el cual es un factor crucial en la regeneración hepática. Finalmente, se determinó que tipo de receptores adrenérgicos median la respuesta a la norepinefrina en el cultivo primario utilizado.

La exposición a acetaldehído inhibió la fosforilación de ERK1/2 y PI3K regulada por norepinefrina, y se observó un efecto similar en la fosforilación de ERK1/2 regulada por el factor de crecimiento de hepatocitos. La migración celular fue otro factor afectado por la exposición a acetaldehído. Finalmente, se observó una inhibición temporal en la activación del factor de transcripción NF-κB.

Dado que las cascadas de señalización están controladas por cinasas y fosfatasas de proteínas, se analizó si el efecto observado por la exposición a acetaldehído depende de la activación de fosfatasas. Se observó que el acetaldehído activa a las fosfatasas de tirosina y a la fosfatasa de serina/treonina PP2A.

En cuanto al tipo de receptores adrenérgicos que median la respuesta a la norepinefrina en el modelo, se encontró que son tanto de tipo α_1 como β.

En conclusión, los resultados muestran que el acetaldehído inhibe las vías de señalización que regulan la proliferación y sobrevivencia celular de los hepatocitos. La información obtenida es relevante para la comprensión de los efectos negativos del consumo de etanol sobre la regeneración hepática.

ÍNDICE **PÁGINA**

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 HÍGADO 1
1.2 HEPATOCITOS 2
1.3 OTROS TIPOS CELULARES EN EL HÍGADO 2
1.4 INTERACCIÓN HÍGADO-SISTEMA NERVIOSO 3
1.4.1 RECEPTORES ADRENÉRGICOS 4
1.4.2 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN LOS HEPATOCITOS 6
1.5 DAÑO HEPÁTICO PRODUCIDO POR EL ETANOL Y SUS METABOLITOS 7
1.5.1 DAÑO EN HEPATOCITOS PROVOCADO POR EL ACETALDEHÍDO 8
1.6 REGENERACIÓN HEPÁTICA 8
1.6.1 LA NOREPINEFRINA EN LA REPARACIÓN HEPÁTICA 11
1.6.2 VÍA DE LAS MAPK 12
1.6.3 REGULACIÓN DE LA VÍA MAPK POR FOSFATASAS 14

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 15

3. JUSTIFICACIÓN 15

4. OBJETIVOS 16

4.1 OBJETIVO GENERAL 16
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES 16

5. HIPÓTESIS 16

6. MATERIALES Y MÉTODOS 17

6.1 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATÓN 17
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL 18
6.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT 19
6.3.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL 19
6.3.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT 19
6.4 TRANSCRIPCIÓN REVERSA–REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA 20
6.4.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL 20
6.4.2 ANÁLISIS DE INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ARN 21
6.4.3 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y RT-PCR EN UN PASO 21
6.5 ENSAYO DE RETARDO EN MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA 23
6.5.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR 23
6.5.2 ENSAYO DE RETARDO EN MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA 23
6.6 INMUNOPRECIPITACIÓN 24

6.7 ENSAYO DE HERIDA-CICATRIZACIÓN 24
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 25

7. RESULTADOS 26

7.1 EFECTO DEL AC SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y PI3K INDUCIDAS POR LA NE 26
7.2 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB Y MIGRACIÓN CELULAR MEDIADA POR LA NE 35
7.3 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE FOSFATASAS 37
7.4 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL MODELO 40

8. DISCUSIÓN 43

8.1 EFECTO DEL AC SOBRE RESPUESTAS MEDIADAS POR NE 43
8.2 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE FOSFATASAS 46
8.3 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL MODELO 48

9. CONCLUSIONES 50

10. BIBLIOGRAFÍA 51

1. INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano sólido más grande del cuerpo, constituye entre 2 y 5% del peso corporal en los adultos. Lleva a cabo diversas funciones como la síntesis de proteínas plasmáticas, participa en las reacciones inmunitarias, así como en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, lleva a cabo la transformación de xenobióticos provenientes del aparato digestivo.

La sangre entra en el hígado por la arteria hepática y la vena porta. La arteria hepática provee de sangre oxigenada al hígado, mientras que la vena porta lleva sustancias absorbidas en el intestino, como nutrientes provenientes de la alimentación, fármacos, así como sustancias tóxicas como el etanol.

El hígado es el principal órgano donde se lleva a cabo la biotransformación de etanol, la cual puede tener efectos nocivos para la viabilidad de las células hepáticas. La asociación entre el abuso en el consumo del alcohol y las enfermedades hepáticas se ha reconocido desde hace mucho tiempo. Aunque se ha adquirido conocimiento sobre sus efectos en el hígado a nivel molecular, todavía se desconocen muchos mecanismos por los que su consumo causa daño e interfiere con los mecanismos que normalmente favorecen la capacidad regenerativa del hígado.

1.1 HÍGADO

El hígado se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y se divide en cuatro lóbulos anatómicos. Lo recubre una cápsula de tejido conjuntivo llamada cápsula de Glisson. En la porción media de la cara posteroinferior hay una hendidura transversal profunda llamada hilio hepático, que es el punto de acceso de la vena porta y la arteria hepática. Por esta razón, la irrigación del hígado es doble pues recibe sangre oxigenada de la arteria hepática y sangre escasamente oxigenada procedente del tracto digestivo. A su vez, la sangre sale del hígado a través de las venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior [1, 2].

A nivel microscópico, es posible observar un patrón repetido de estructuras más o menos hexagonales de aproximadamente 0.7 mm, llamadas lobulillos hepáticos, en las que las células parenquimatosas se disponen radialmente alrededor de una vena central. En los vértices de lobulillos hepáticos existe una pequeña área triangular llamada espacio porta, formada por tejido conjuntivo además de una ramificación del conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta. Las ramas laterales de estos vasos confluyen en los sinusoides hepáticos, que ocupan el espacio entre las placas de células dispuestas radialmente y que drenan en la vena central [2, 3].

1.2 HEPATOCITOS

El 80% de la población celular hepática está conformada por los hepatocitos. Estas células tienen forma poliédrica, con un tamaño aproximado de 30 μm de largo y 20 μm de ancho. La mayor parte presenta un núcleo único, aunque aproximadamente el 25% es binucleado.

Los hepatocitos llevan a cabo la mayoría de las funciones hepáticas. Contribuyen al proceso digestivo por medio de la secreción de bilis, llevan a cabo la eliminación de bilirrubina que se origina por la degradación de la hemoglobina contenida en los eritrocitos viejos, tienen un papel fundamental en mantener una concentración normal de glucosa en sangre, llevan a cabo el metabolismo de lípidos y sintetizan proteínas plasmáticas como la albúmina, fibrinógeno, trombina y factor III. También presentan una función accesoria en el sistema inmune, pues sintetizan las proteínas del sistema del complemento y fase aguda. Además, la biotransformación de xenobióticos se lleva a cabo principalmente en dichas células [2, 4, 5].

1.3 OTROS TIPOS CELULARES EN EL HÍGADO

El 20% de los tipos celulares en el hígado está compuesto por células no parenquimatosas, que incluyen a las células endotelilales, las células de Kupffer,

linfocitos y células estelares. Las células endoteliales se encuentran en los sinusoides hepáticos, lo cual provee un área grande para la absorción de nutrientes. Las células de Kupffer también residen en los sinusoides y son esenciales para la fagocitosis de partículas extrañas y organismos infecciosos, así como la producción de citocinas. Los linfocitos son parte del sistema inmune que residen dentro del hígado y ayudan a prevenir infecciones. Las células estelares hepáticas tienen varias funciones, incluyendo el almacenamiento de vitamina A y la producción de matriz extracelular [6].

1.4 INTERACCIÓN HÍGADO-SISTEMA NERVIOSO

Al igual que otros órganos, el hígado se comunica con el resto del cuerpo por medio de señales humorales y neurales como un mecanismo para regular sus funciones. La comunicación entre el hígado y el sistema nervioso central es bidireccional, con fibras aferentes y eferentes tanto de origen simpático como parasimpático [7, 8].

La inervación simpática del hígado está dada por neuronas que se originan de los ganglios celíaco y superior mesentérico; generalmente estas neuronas son noradrenérgicas. Por otro lado, la inervación de origen parasimpático se origina a partir de neuronas del nervio vago. Aunque la mayor parte de estas neuronas son colinérgicas, hasta un 10% tienen un fenotipo catecolaminérgico [8].

Los nervios de origen simpático entran al hígado junto con los vasos sanguíneos grandes por medio del hilio hepático. Muestran una ramificación vascular hasta que alcanzan los espacios porta, de ahí penetran a diferentes niveles en los espacios de Disse cerca de los hepatocitos y células estelares hepáticas [8, 9]. Por microscopía electrónica y métodos histoquímicos se ha mostrado que la inervación de los hepatocitos varía entre las especies. Es rara o se encuentra ausente en anfibios y peces, en los ratones y ratas se encuentra restringida a la vasculatura del espacio porta; mientras que en primates, los nervios penetran el acino hepático hasta la vecindad de la vena central.

La densidad de la inervación parece estar inversamente relacionada con el número de uniones comunicantes en los hepatocitos, lo que sugiere que la estimulación nerviosa del hígado afecta la función hepática por una combinación entre inervación directa y propagación de señales a través de las uniones comunicantes, que son permeables a los segundos mensajeros generados por la activación de los receptores adrenérgicos [9, 10]. La inervación aferente del hígado participa en la regulación de procesos como la osmorregulación, ionorrecepción, barorrecepción; mientras que los nervios eferentes participan en la regulación hemodinámica, la regulación del flujo biliar, y el control del metabolismo de carbohidratos y lípidos [11].

1.4.1 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos o adrenoceptores median las acciones del principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático, la norepinefrina (NE). Los adrenoceptores pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Este tipo de proteínas atraviesan la membrana plasmática en siete dominios formados por α hélices unidas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares.

Mientras que los adrenoceptores se han clasificado históricamente en dos subtipos principales, los α- y β-adrenoceptores, recientemente se ha hecho claro que es más útil clasificar a los receptores adrenérgicos en tres tipos principales, como se presenta en la figura 1.1.

La razón de esta clasificación está basada en tres tipos de evidencias. Primero, la afinidad por fármacos difiere entre 3 y 4 órdenes de magnitud entre los principales tipos, mientras que dicha diferencia es de entre 1 y 2 órdenes de magnitud dentro los subtipos. Segundo, los segundos mensajeros generados son diferentes para cada uno de los tres tipos principales. Finalmente, la estructura primaria de los adrenoceptores concuerda con la existencia de tres tipos, y no únicamente dos [12].

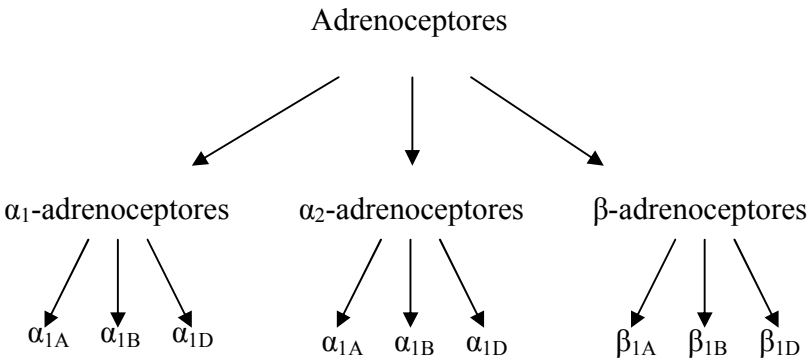


Figura 1.1. Clasificación de los receptores adrenérgicos.

La señalización por medio de los receptores adrenérgicos depende de la interacción con las proteínas G heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina y transducen las señales de los receptores adrenérgicos hacia efectores intracelulares. Estas proteínas constan de tres subunidades: α, β y γ.

La subunidad α es una proteína que contiene una hendidura en donde se unen los nucleótidos de guanina y posee actividad intrínseca de GTPasa. Las subunidades β y γ están asociadas fuertemente entre sí y frecuentemente se les denomina subunidad βγ.

En las vías de señalización mediadas por los GPCR, la unión del ligando al receptor cataliza el intercambio de GDP a GTP en la subunidad α, y posteriormente la subunidad α unida a GTP se disocia del receptor así como de la subunidad βγ. La subunidad α unida a GTP y la subunidad βγ estimulan diversos efectores incluyendo enzimas, canales iónicos y GTPasas pequeñas, por lo que pueden regular múltiples vías de señalización. Las subunidades α se usan para clasificar a las proteínas G en G_s (activadora de la adenilato cilasa), G_i (inhibidora de la adenilato ciclasa), G_q (activadora de la fosfolipasa C) y G_{12}. [13].

Cada tipo de receptor adrenérgico está asociado a una clase de proteína G y una vía de señalización en particular. Los α_1-adrenoceptores están acoplados con la proteína G_q, y se asocia con el incremento de las concentraciones de calcio intracelular, activación de la fosfolipasa C y la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (PKC). Los α_2-adrenoceptores

están asociados a la proteína G_i, por lo que inhiben a la adenilato ciclasa. Los β-adrenoceptores están vinculados con la activación de la adenilato ciclasa por medio de la proteína G_s, por lo que dan lugar a la formación de AMPc y a la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) [12, 14].

En la siguiente tabla se resumen las características principales de los tres tipos de receptores adrenérgicos:

	α_1-adrenoceptores	**α_2-adrenoceptores**	**β-adrenoceptores**
Vía de señalización principal	Activación de la PLC, PKC y elevación de Ca^{2+} intracelular.	Inhibición de la adenilato ciclasa.	Activación de la adenilato ciclasa y activación de PKA.
Agonista	Fenilefrina	Xilacina	Isoproterenol
Antagonista	Prazosina	Yohimbina	Propranolol

Tabla 1. Propiedades de los receptores adrenérgicos.

1.4.2 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN LOS HEPATOCITOS

La mayoría de los estudios sobre receptores adrenérgicos en hepatocitos se han realizado utilizando hígado de rata; hay evidencias de que los α_1 [1, 15, 16] y β [17, 18] son los que se encuentran principalmente en hepatocitos; mientras que la respuesta α_2-adrenérgica es muy baja [19].

Uno de los factores que influyen en el tipo de receptores adrenérgicos presentes en los hepatocitos es la edad. Por ejemplo, en el hígado de ratas neonatas el control de la glucogenólisis está mediado principalmente por los receptores β-adrenérgicos, mientras que en hepatocitos de ratas adultas las funciones metabólicas reguladas por NE están mediadas principalmente por los receptores adrenérgicos α_1. Los receptores adrenérgicos β parecen tener un papel menor en estas células [20, 21].

1.5 DAÑO HEPÁTICO PRODUCIDO POR EL ETANOL Y SUS METABOLITOS

Más del 90% del etanol ingerido se metaboliza en los hepatocitos. Existen 3 vías principales del metabolismo del etanol, cada una localizada en diferentes compartimentos celulares. La vía catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa se encuentra en el citosol, el sistema oxidativo microsomal se localiza en el retículo endolásmico y la vía de la catalasa se localiza en los peroxisomas. Las tres vías dan lugar a la producción de acetaldehído (AC), el cual es un compuesto altamente tóxico que a su vez es oxidado a acetato por la enzima mitocondrial aldehído deshidrogenasa [22].

El metabolismo de etanol tiene varias consecuencias. Se provocan cambios en la homeostasis del estado rédox cuando la alcohol deshidrogenasa transfiere un átomo de hidrógeno al cofactor dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), que se convierte en su forma reducida (NADH), favoreciéndose la síntesis y acumulación de ácidos grasos, además de inhibir la gluconeogénesis y el ciclo de Krebs [23].

Asimismo, el metabolismo de etanol incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno por medio del sistema oxidativo microsomal, que depende de una forma específica del citocromo P450 (CYP2E1). Una de las características principales del sistema CYP2E1 es que es altamente inducible como resultado del consumo crónico de etanol, y se caracteriza por formar especies reactivas de oxígeno, las cuales que pueden causar lipoperoxidación. Cuando los sistemas de defensa antioxidantes se saturan, la viabilidad de los hepatocitos disminuye, resultando en daño hepático. Además, el etanol por sí mismo puede causar efectos directos en las funciones celulares al interactuar con los microdominios lipídicos e influir en la actividad de proteínas membranales [23, 24].

El consumo crónico de etanol puede causar daño hepático. La esteatosis es la etapa más temprana de daño hepático y se caracteriza por la deposición de lípidos en los hepatocitos, hay alteraciones en el estado de oxidación-reducción, estrés metabólico y desregulación de citocinas. La esteatosis puede progresar a hepatitis, caracterizada por inflamación hepática, asociada con hepatomegalia e infiltración de granulocitos,

monocitos y linfocitos. Posterior a los cambios inflamatorios en el hígado debido a la exposición a alcohol, los hepatocitos mueren por necrosis y apoptosis. Conforme la respuesta inflamatoria del hígado progresa, las células estelares hepáticas, que normalmente son quiescentes, se activan y producen colágena, dando lugar a fibrosis, que puede avanzar a cirrosis [25, 26].

Aproximadamente el 80% de los alcohólicos desarrollan esteatosis, entre el 10 y 35% desarrollan hepatitis alcohólica y aproximadamente el 10% desarrollan cirrosis [26].

1.5.1 DAÑO EN HEPATOCITOS PROVOCADO POR EL ACETALDEHÍDO

El AC es un producto altamente reactivo y más tóxico que el etanol. De hecho, al AC se deben muchos de los efectos nocivos del consumo de etanol. El AC puede formar enlaces covalentes con las proteínas, dando lugar a la generación de antígenos, inactivación de enzimas y disminución en la capacidad de reparación del ADN. También se asocia con una disminución en la capacidad del hígado para utilizar oxígeno. Además, favorece la disminución de glutatión reducido en la mitocondria y aumenta la sensibilidad de los hepatocitos a la apoptosis inducida por TNF-α [27], aumenta la toxicidad mediada por radicales libres y peroxidación [22]. Por otro lado, se ha encontrado que el AC es un mediador clave en la apoptosis inducida por etanol [28].

A nivel experimental, se ha encontrado que el AC activa factores de transcripción que regulan la expresión de citocinas proinflamatorias en la línea de carcinoma hepatocelular HepG2 [29]. En la misma línea celular se encontró que el AC produce un incremento en la inducción de la citocina proinflamatoria interleucina-8, la cual es un mediador importante en el daño hepático [30].

1.6 REGENERACIÓN HEPÁTICA

Tanto en animales como en humanos, el hígado tiene una capacidad única de regular su crecimiento y masa. Esta propiedad es particularmente notable porque los hepatocitos

raramente se dividen. En el hígado adulto, los hepatocitos tienen un índice mitótico muy bajo, que se estima entre 2/1000 y 1/10000 [2, 5, 31].

Varios factores pueden provocar disminución en la masa hepática; por ejemplo, remoción quirúrgica para eliminar tumores o para realizar un transplante, pérdida celular causada por daño químico o muerte celular ocasionada por virus. Para estudiar los mecanismos moleculares de la regeneración hepática, se utilizan tres estrategias generales: 1) hepatectomía parcial, que es la remoción del 70% de la masa hepática, 2) exposición a hepatotoxinas como el tetracloruro de carbono (CCl_4) y 3) exposición a hepatotoxinas menos fuertes como el acetilaminofluoreno o la retrorsina [31].

Además de los estudios *in vivo*, continuamente se reportan trabajos realizados utilizando líneas celulares de origen hepático o cultivos primarios de diferentes especies para estudiar las vías de señalización que regulan a la reparación hepática. De esta manera se ha comprobado *in vitro* que factores de crecimiento como HGF y EGF [32, 33], hormonas como la insulina [34], o el neurotransmisor NE [35-38] activan vías de señalización que regulan la proliferación de hepatocitos.

La regeneración hepática depende tanto de hepatocitos diferenciados como de células progenitoras, dependiendo del tipo de daño. Cuando la capacidad de proliferación de los hepatocitos está comprometida debido a un daño masivo, la regeneración depende de las células progenitoras [39]. Experimentalmente, esta respuesta se observa después de un daño causado por toxinas como galactosamina o retrorsina [40].

Utilizando el modelo de la hepatectomía parcial, se ha observado que varios genes se expresan diferencialmente en las primeras horas después de la operación. Hay incrementos en los niveles de ARNm del factor TNF-α y la IL-6, así como de los factores de transcripción AP-1, NF-κB y STAT3, ya que son fundamentales para la reparación hepática. La activación de estos factores no requiere su síntesis *de novo*, sino depende de mecanismos post-traduccionales.

El factor de transcripción NF-κB se encuentra prácticamente en todos los tipos celulares, incluyendo hepatocitos. Después de la hepatectomía parcial, el NF-κB se activa rápidamente de manera transitoria, y deja de estar activo 4 ó 5 horas después.

El TNF-α y la IL-6 son importantes para que los hepatocitos pasen de la fase G_0 a la fase G_1. Posteriormente la progresión en el ciclo celular está dirigida por factores de crecimiento que favorecen el paso de la fase G_1 a la fase S. Dicho paso está asociado con la fosforilación de la proteína retinoblastoma, aumento en la expresión de las ciclinas D, E, y A, y la formación de los complejos cdk4/ciclina D y cdk2/ciclina E.

Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) son muy importantes en la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática. El HGF es producido por las células mesenquimales y actúa sobre los hepatocitos de manera parácrina o endócrina. Tiene efectos de migración, morfogénicos y mitogénicos. Se ha demostrado que la señalización generada por HGF es esencial para la entrada en el ciclo celular después de la hepatectomía parcial [41]. El receptor de HGF, conocido como c-met, es una proteína transmembranal de 190 kDa con actividad de cinasa de tirosina y activa varias vías de señalización, entre ellas la vía de ERK1/2 [42].

En el siguiente esquema se resume la cronología de los eventos que ocurren después de la hepatectomía parcial:

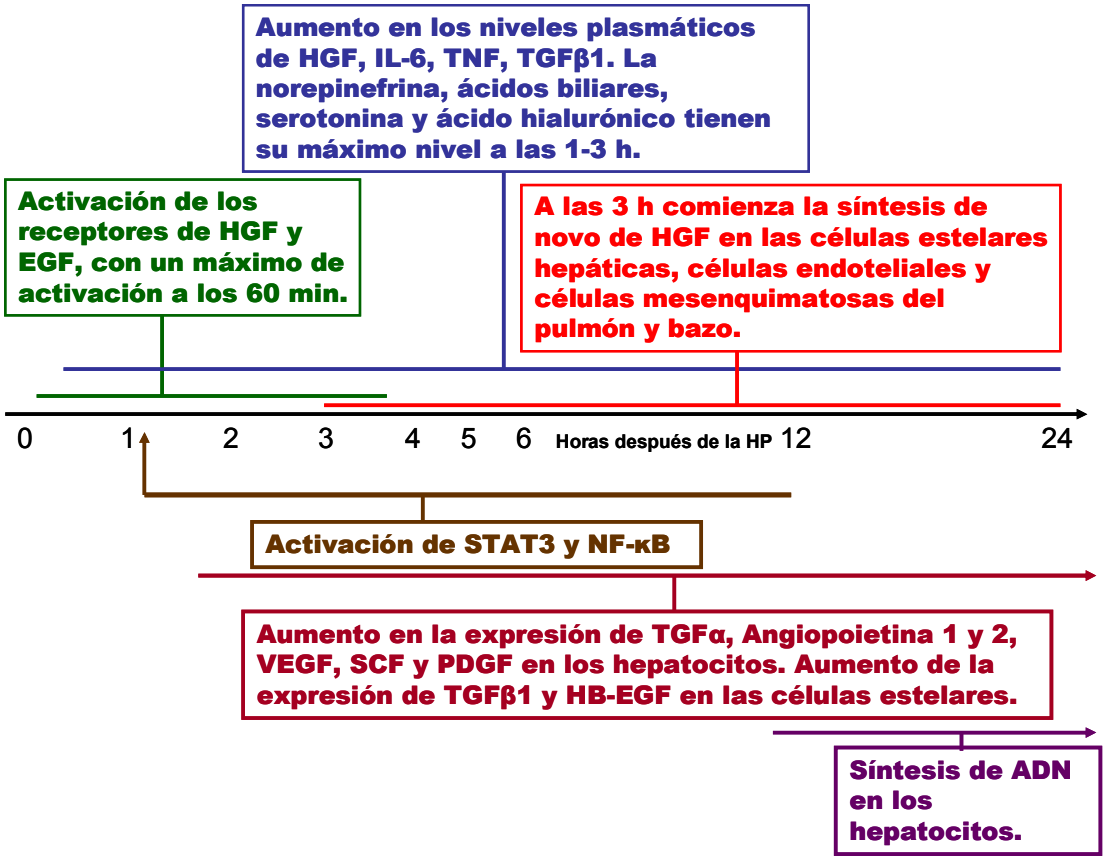


Figura 1.2. Cronología de principales eventos que ocurren en etapas tempranas de la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial (HP). Las líneas horizontales indican el inicio y duración de cada señal [43].

1.6.1 LA NOREPINEFRINA EN LA REPARACIÓN HEPÁTICA

El papel del sistema nervioso en la reparación hepática se ha investigado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. En experimentos en los que se elimina la inervación hepática (como vagotomía, cortes espinales o eliminación química) se ha observado una marcada inhibición en el proceso de la reparación [44-46].

Después de un transplante de hígado, éste pierde su inervación simpática y parasimpática, con lo que se produce una disminución en la concentración de NE; una consecuencia de

esto es la disminución en la capacidad de reparación hepática [47]. Además, se ha observado que los niveles de NE se elevan en el plasma después de la hepatectomía parcial [48].

En cuanto al tipo de receptores adrenérgicos que media el papel de la NE en la regeneración hepática, tanto a los receptores adrenérgicos α_1 [16, 49] como a los β [17, 46] se les ha atribuido relevancia en la regeneración hepática. En experimentos *in vitro* con cultivo primario de hepatocitos se ha demostrado que la NE potencia el efecto mitogénico de los factores de crecimiento HGF y EGF [16, 38, 50].

1.6.2 VÍA DE LAS MAPK

Las células responden a estímulos extracelulares por medio de vías de señalización como las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK). Todas las células eucariotas poseen múltiples vías MAPK, que coordinadamente regulan diversas actividades celulares como la expresión génica, mitosis, metabolismo, motilidad, diferenciación, sobrevivencia y apoptosis. Los grupos de MAPK más estudiados son las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), cinasas de c-Jun amino terminal (JNK) y p38 [51].

Cada familia de MAPK está compuesta por cinasas conservadas evolutivamente y que actúan de manera secuencial: Una cinasa de MAPKK (MAPKKK), una cinasa de MAPK (MAPKK) y una MAPK. Las MAPKKK son cinasas que fosforilan residuos de serina o treonina, y se activan por medio de fosforilación y/o como resultado de su interacción con una proteína pequeña que une GTP, como las proteínas Ras y Rho. La activación de MAPKKK lleva a la fosforilación y activación de MAPKK, que a su vez activan a las MAPK por medio de fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina. Una vez activadas, las MAPK fosforilan proteínas diana en residuos de serina o treonina seguidos de prolina. Entre las proteínas blanco típicas de las MAPK se encuentran los factores de transcripción, factores citoplásmicos de inicio de la traducción y proteínas que modulan la apoptosis (Figura 1.3) [52].

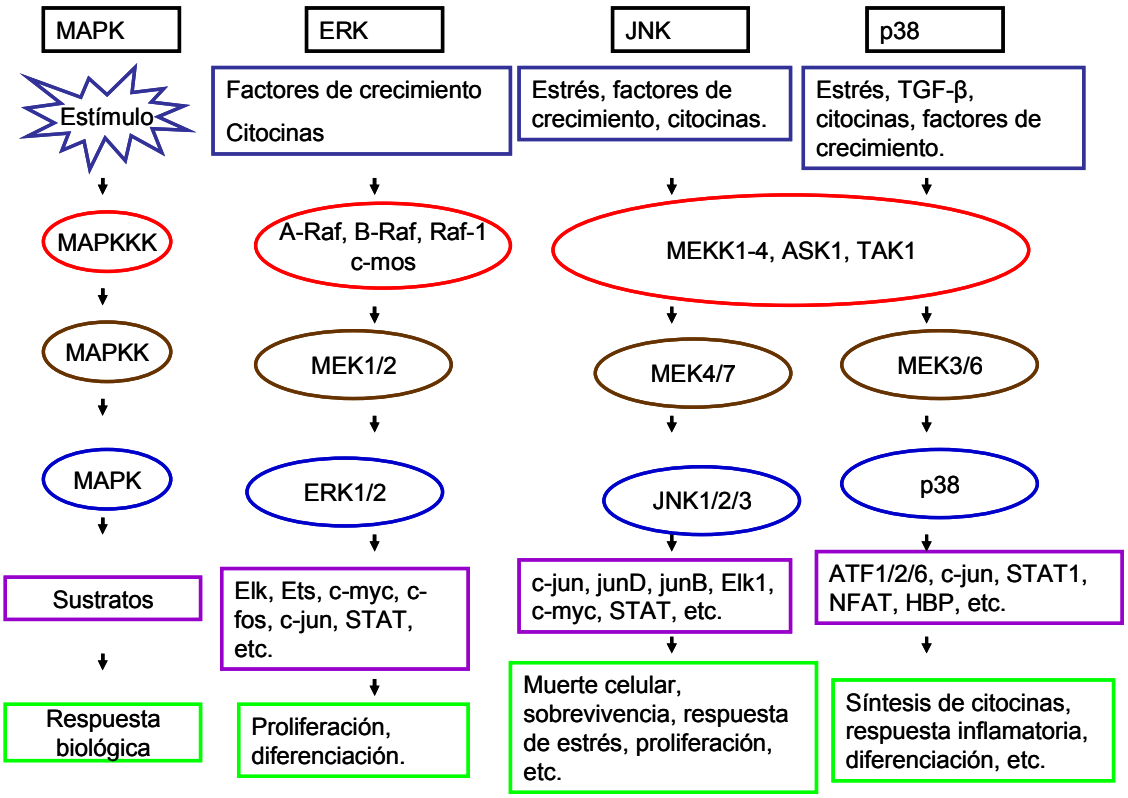


Figura 1.3. Diagrama simplificado en donde se muestra la cascada de las MAPK ERK, JNK, y p38 [53].

La vía de ERK1/2 consta de las MAPKKK A-Raf, B-Raf y Raf-1, las MAPKK MEK1/2, y las MAPK ERK1 y ERK2. ERK1 y ERK2, de 43 y 41 kDa, son similares en un 83% de su secuencia de aminoácidos, con la mayor parte de sus diferencias fuera del sitio con actividad cinasa, se expresan en varios grados en todos los tejidos, incluyendo células terminalmente diferenciadas [53].

La selectividad de las MAPK depende de interacciones con motivos específicos en los sustratos, además de la interacción de MAPK con proteínas de andamiaje que organizan las vías de señalización en módulos específicos por medio de la unión simultánea con diferentes componentes de la ruta [51]. Las MAPK pueden activarse por una amplia variedad de estímulos, pero en general ERK1/2 se activa cuando los factores de crecimiento activan receptores con actividad de cinasas de tirosina; por la activación de

receptores adrenérgicos y receptor de insulina; mientras que JNK y p38 se activan en respuesta a estímulos estresantes como choques osmóticos, radiaciones ionizantes y estimulación con citocinas [54].

Los receptores adrenérgicos también activan la vía de ERK1/2. El mecanismo de activación depende de la clase de proteína G asociada a los adrenoceptores, las subunidades βγ, el tipo celular y la presencia de proteínas efectoras adicionales [13, 53].

1.6.3 REGULACIÓN DE LA VÍA MAPK POR FOSFATASAS

Todos los niveles de la vía de las MAPK pueden regularse por fosfatasas. Las fosfatasas de la vía de ERK1/2 se clasifican de acuerdo con su especificidad en fosfatasas de tirosina o PTP (*protein tyrosine phosphatases)*, fosfatasas de serina y treonina PSP (*protein serine/threonine phosphatases*) y fosfatasas de MAPK con doble especificidad (*dual specificity phosphatases*) o fosfatasas de MAPK (*MAPK phosphatases*), las cuales desfosforilan residuos de treonina y tirosina.

Las PTP pueden desfosforilar a ERK1/2 directamente o a proteínas ubicadas arriba en la vía de señalización. Se conocen dos mecanismos de regulación de las PTP: su localización intracelular y fosforilación en serina, treonina o tirosina. En estas fosfatasas, no se han identificado subunidades regulatorias [55].

Una de las PSP predominantes es la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Esta fosfatasa es un heterodímero formado por una subunidad catalítica o subunidad C de 36 kDa, una subunidad de andamiaje de 65 kDa o subunidad A, y una subunidad reguladora variable o subunidad B. Muchos aspectos esenciales en la regulación de PP2A no se entienden, pero se sabe que para su activación es necesaria la metilación de la subunidad C [56, 57], mientras que la fosforilación en un residuo de tirosina tiene un efecto inhibitorio sobre su actividad [58]. Ambas modificaciones participan en la asociación con la subunidad reguladora [59].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hígado tiene una capacidad única de regular su masa. Después de la pérdida de hepatocitos causado por diferentes daños, hay una serie de procesos moleculares que permiten la proliferación de los hepatocitos adultos. En estos eventos, están involucrados varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos y neurotransmisores como la norepinefrina.

Sin embargo, hay estudios clínicos y básicos que muestran que la exposición a etanol inhibe la capacidad regenerativa del hígado. Estos efectos pueden deberse al etanol mismo, al desbalance en el estado rédox provocado por su biotransformación o a la formación de AC, el cual es un producto aún más tóxico que el etanol.

Dado que la norepinefrina tiene un papel fundamental en el proceso regenerativo, es necesario examinar el efecto que tiene el acetaldehído sobre 1) la fosforilación de proteínas de transducción de señales relacionadas con la reparación y regeneración hepática, 2) la activación de factores de transcripción y 3) la migración celular.

3. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos por los que la ingesta de alcohol inhibe la regeneración hepática no están completamente caracterizados. Por lo tanto, es necesario identificar los mecanismos moleculares por los que el acetaldehído, metabolito del alcohol, puede afectar las vías de sobrevivencia y/o proliferación activadas por la norepinefrina en los hepatocitos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el efecto del acetaldehído sobre la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y PI3K activadas por norepinefrina en cultivo primario de hepatocitos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

En un modelo de cultivo primario de hepatocitos:

1. Determinar el efecto del acetaldehído sobre la fosforilación de ERK1/2 y PI3K inducida por la norepinefrina y por el factor de crecimiento de hepatocitos.

2. Determinar el efecto del acetaldehído sobre la activación del factor de transcripción NF-κB inducida por la norepinefrina.

3. Determinar el efecto del acetaldehído sobre la migración celular inducida por la norepinefrina.

4. Examinar la activación de fosfatasas por el acetaldehído.

5. Determinar el perfil de expresión de receptores adrenérgicos y su papel en la respuesta inducida por la norepinefrina.

5. HIPÓTESIS

El acetaldehído disminuye la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y PI3K activadas por norepinefrina en hepatocitos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATÓN

Para la obtención de hepatocitos de ratón se utilizó la técnica de perfusión con colagenasa en dos pasos [60]. Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1, de 8 a 12 semanas de edad. Se anestesiaron intraperitonealmente utilizando 0.7 ml de avertina. La superficie abdominal se limpió con etanol al 70% y posteriormente se realizó una incisión en el abdomen y tórax. Se hizo una incisión en la aurícula derecha del corazón y se introdujo un catéter Abbocath 22G acoplado a un equipo de perfusión. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones, y se seccionó la vena porta para abrir la circulación. En la primera parte del proceso, el hígado se perfundió con aproximadamente 30 ml de amortiguador HBSS (Solución salina balanceada de Hanks) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}, con HEPES 10 mM, pH 7.4, EGTA 75 mM, a una temperatura de 37 ºC. La velocidad de la perfusión se controló con una bomba peristáltica a 3.8 ml/min. En el segundo paso de la perfusión se utilizaron 50 ml de colagenasa tipo I al 0.1% en medio Williams con $NaHCO_3$ 25 mM y amortiguado con HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37 ºC. El hígado se removió y se colocó en una caja de Petri de 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío con suero fetal de bovino (SFB) al 10% y penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml (medio de adhesión). La cápsula de Glisson se rompió utilizando 2 pipetas graduadas estériles de 1 ml, con lo que se dispersaron las células hepáticas y se obtuvo una suspensión celular que se pasó por un filtro con un tamaño de poro de 100 µm. El filtrado se centrifugó a 45 g durante 5 min a 4 ºC. Después se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío. Esta suspensión celular se depositó sobre una solución de Percoll con HBSS 1X, ambas fases se homogenizaron suavemente invirtiendo 3 veces y posteriormente se centrifugó a 170 g durante 10 min a 4 ºC, con lo que se obtuvo un paquete compuesto por hepatocitos viables. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. Una alícuota de 100 µl se utilizó para contar las células en un

hemocitómetro usando tinción con azul tripano para determinar la viabilidad celular, que en todos los experimentos siempre fue mayor al 95% y se obtuvieron entre 25 y 50 millones de hepatocitos por hígado. Después de haber resuspendido las células en 20 ml de medio, se centrifugó a 45 g durante 5 min a 4ºC y se resuspendió en medio Williams a una concentración de $1.0x10^6$ células/ml. Las células se sembraron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro a 37 ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%.

6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En todos los experimentos los hepatocitos se sembraron en una densidad de $3.5x10^4$ células/cm^2, que corresponde a aproximadamente 90% de confluencia. Después de que la mayor parte de las células se adhirieron (2 a 4 h), se les cambió el medio de adhesión por medio Williams con antibiótico y antimicótico, sin SFB. Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir que se adhirieran completamente y al día siguiente se realizaron los experimentos.

Para los tratamientos se prepararon las siguientes soluciones patrón. AC 80 mM en PBS frío, NE 10 mM en agua desionizada, propranolol 10 mM en agua desionizada, HGF 10 μg/ml en agua desionizada y prazosina 10 mM en metanol. De estas soluciones se agregó el volumen necesario al medio de cultivo para obtener concentraciones de AC 80 μM, NE 10 μM, propranolol 10 μM, prazosina 10 μM y HGF 50 ng/ml. Las cajas se sellaron con papel parafilm para evitar la evaporación del AC.

Los tiempos utilizados para el análisis de la fosforilación de ERK1/2 y PI3K (0-1h) se basaron en estudios previos realizados en el laboratorio y en condiciones reportadas, ya que los eventos de fosforilación ocurren en un lapso de minutos después de la exposición a ligandos como la norepinefrina o el factor de crecimiento de hepatocitos. Los tiempos utilizados en el experimento con NF-κB (0-2h) y ensayo de herida-cicatrización (0-48h) también estuvieron basados en reportes previos.

6.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

6.3.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron con 1 ml de PBS frío para después despegar las células usando un gendarme de goma. La suspensión celular obtenida se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 8900 g durante 1 min a 4 ºC. El sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 300 µl de amortiguador de lisis M-PER (Pierce) con mezcla de inhibidores de fosfatasas y de proteasas (Roche). Se incubó en hielo durante 15 min y después se centrifugó a 17000 g durante 10 min a 4 ºC. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -20 ºC en alícuotas hasta ser cuantificadas.
La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el paquete comercial BCA de la marca Pierce, basado en la reacción de Biuret o del ácido bicincónico. Como curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino.

6.3.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Entre 50 y 100 µg de proteína se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS 0.1 %, usando un voltaje de 120 V durante 90 min. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana de PVDF durante 90 min a 120 V y posteriormente la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween. Para la detección de proteínas de señalización se utilizaron anticuerpos de la marca Santa Cruz Biotechnology. Se utilizaron anticuerpos contra ERK1/2 y PI3K fosforilados en residuos de tirosina que en adelante se denominan p-ERK y p-PI3K. Estos anticuerpos se utilizaron una concentración de 0.4 µg/ml y para la detección de ERK1/2 y PI3K totales se utilizaron 0.2 µg/ml. En todos los casos se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano. Las proteínas fosforiladas se detectaron utilizando el sustrato de alta sensibilidad immobilon (Millipore), y la proteína total se detectó usando el sustrato ECL (Pierce). La luminiscencia se detectó directamente de las membranas PVDF usando el equipo Gel Logic 1500 imaging system, de Kodak. Para el análisis densitométrico se utilizaron los valores obtenidos correspondientes a la proteína

fosforilada y dichos valores se normalizaron con respecto a los correspondientes a la proteína total. Como control de carga se utilizó ERK1/2 total y PI3K total, ya que sus valores no cambian en los tiempos cortos (0-1h) utilizados.

Los experimentos de ERK1/2 se realizaron en al menos 3 experimentos independientes, mientras que los de PI3K se realizaron una sola vez.

6.4 TRANSCRIPCIÓN REVERSA–REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

6.4.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL

El aislamiento de ARN total se realizó de acuerdo con el método de isotiocianato de guanidina y fenol. Las células se cultivaron de la misma manera que en los experimentos para Western blot. Un millón de células cultivadas a una densidad de $3.5x10^4$ células/cm^2 se lavaron con PBS frío y se les agregó 1 ml de TRIZOL, posteriormente se levantaron con un gendarme de goma estéril. El homogenado se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó la mezcla durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Al final de la centrifugación, se generaron dos fases: una fase inferior roja (orgánica), una interfase blanca y una fase superior incolora (acuosa), en donde se encuentra el ARN. Esta fase se transfirió a tubos limpios de 1.5 ml. Se agregaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Después de este tiempo se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Las muestras se agitaron y se centrifugaron a 7500 g durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el ARN se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20-100 µl de agua libre de RNasas. Las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta la realización de la RT-PCR.

6.4.2 ANÁLISIS DE INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se tomó una alícuota de ARN y se diluyó en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM a pH7.5, 1 mM EDTA) en un volumen final de 1 ml. La cuantificación de ARN se realizó leyendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm se utilizó para monitorear la pureza del ARN, dicho cociente se encontró en el intervalo de 1.8 y 2.1. Para la cuantificación de ARN, se utilizó la siguiente fórmula:

[ARN] µg/ml = (40 µg/ml) (Abs260) (Factor de dilución)

Para analizar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en condiciones no desnaturalizantes. De 3-5 µl de ARN se separaron en un gel de agarosa 1.5% en amortiguador TBE 0.5 X (Tris base 45 mM a pH 8, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) en presencia de bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta.

6.4.3 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y RT-PCR EN UN PASO

Para el diseño de oligonucleótidos se empleó el programa Primer3 del Whitehead Institute For Biomedical Research, MIT (http://frodo.wi.mit.edu/) utilizando las secuencias de ARN de los receptores adrenérgicos α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, β_1, β_2 y β_3 de ratón encontradas en la página http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 1. Para diferenciar entre la amplificación de ARN y posible ADN genómico contaminante, los oligonucleótidos se diseñaron de manera que se alinearan en exones localizados en lados opuestos de un intrón. De esta manera, un producto derivado de ADN contaminante tiene un tamaño más grande que el producto de la reacción de RT-PCR. Para la Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en un paso se utilizaron 2 µg de ARN y se empleó el paquete comercial Access RT-PCR System (Promega), el cual utiliza la Transcriptasa Reversa del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) para la síntesis de la primera hebra de ADN y la ADN

polimerasa termoestable *Tfl* de *Thermus flavus* para la síntesis de la segunda hebra de ADN y subsecuente amplificación.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos, temperatura de desnaturalización Tm, y tamaño esperado del producto.

Oligonucleótido	**Secuencia**	**Tm**	**pb del producto**
α_{1A} sentido	GCCCTGAAGAAAATCACCAA	60 ºC	302
α_{1A} antisentido	CAGACCCCCAACAGTCAAGT		
α_{1B} sentido	AACCTTGGGCATTGTAGTCG	60 ºC	347
α_{1B} antisentido	TGCCACTGTCATCCAGAGAG		
α_{1D} sentido	GCCTCTGAGGTGGTTCTGAG	60 ºC	323
α_{1D} antisentido	CTGGAGCAGGGGTAGATGAG		
β_1 sentido	GATCTGGTCATGGGATTGCT	60 ºC	398
β_1 antisentido	GGCACGTAGAAGGAGACGAC		
β_2 sentido	AAGAATAAGGCCCGAGTGGT	60 ºC	383
β_2 antisentido	GTCTTGAGGGCTTTGTGCTC		
β_3 sentido	ACTCCTCGTAATGCCACCAG	60 ºC	378
β_3 antisentido	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG		

El programa utilizado para la RT-PCR en un paso fue el siguiente:

Paso	**Temperatura, min**	**# de ciclos**
Transcripción reversa	45 ºC, 45 min	1
Inactivación de AMV RT y desnaturalización del híbrido ARN/ADNc	94 ºC, 2 min	1
Desnaturalización	94 ºC, 30 seg	35
Alineamiento	60 ºC, 1 min	
Extensión	68 ºC, 2 min	
Extensión final	68 ºC, 7 min	1

6.5 ENSAYO DE RETARDO EN MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

6.5.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR

Se sembraron hepatocitos en cajas de Petri de 10 cm de diámetro a una densidad de $3.5x10^4$ células/cm^2. Para extraer la proteína total, se lavaron las células con PBS frío y se despegaron con un gendarme de goma. Se recuperó la suspensión celular y se centrifugó a 15000 g durante 10 seg. Las células se resuspendieron en 800 µl de solución A (HEPES 10 mM a pH 7.9, KCl 10 mM , EDTA 0.1 mM , EGTA 0.1 mM , DTT 1 mM y PMSF 0.5 mM) y se incubaron en hielo durante 15 min. Posteriormente, se agregaron 50 µl de una solución de detergente IGEPAL al 10% en solución A. Se agitó vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó a 15000 g a temperatura ambiente durante 30 seg. El precipitado obtenido corresponde a los núcleos celulares, los cuales se incubaron durante 15 min en 30 µl de solución C (HEPES 20 mM a pH 7.9, NaCl 0.4 mM , EDTA 1 mM , EGTA 1 mM , DTT 1 mM y PMSF 1 mM). Durante este tiempo se agitó vigorosamente al inicio, a la mitad y al final de la incubación. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 17000 g durante 5 min a 4 ºC. El sobrenadante se recuperó, y se tomó una alícuota de 5 µl para la determinación de la concentración de proteína nuclear y el resto se mantuvo a -80 ºC para su empleo posterior.

6.5.2 ENSAYO DE RETARDO EN MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Se adicionaron en un tubo 5 µl de solución de incubación (Tris HCl 50 mM a pH 7.5, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, β-mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 20%). Posteriormente se agregó 1 µg de poli dIdC y 20 µg de proteína nuclear. Se incubó en hielo durante 15 min, y al término de la incubación se agregaron 2 µl de sonda para NF-κB marcada con ^{32}P. La secuencia consenso para NF-κB utilizada fue 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min y después se agregaron 2 µl de azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida al 6%, que se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 4 ml de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 1 ml de solución de TBE

5X, 15 ml de agua desionizada, 200 µl de persulfato de amonio al 10% y 10 µl de TEMED. El gel se corrió durante 2h a 150 V. Finalmente, una película Kodak se expuso al gel durante 2 días a -80ºC.

6.6 INMUNOPRECIPITACIÓN

Se sembraron hepatocitos en cajas de Petri de 10 cm de diámetro a una densidad de $3.5x10^4$ células/cm^2. Después de los tratamientos se extrajo y cuantificó la proteína total como se describe en la sección de análisis de proteínas por Western blot. Dos mg de proteína se incubaron con 20 µl de *preclearing matrix A* (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4ºC en rotación. Se centrifugó a 800 g durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se incubó toda la noche con un anticuerpo dirigido contra la subunidad catalítica de PP2A (Cell Signaling) en una dilución 1:100, a 4 ºC, en rotación constante. Posteriormente, se agregaron 20 µl de *Protein A/G PLUS-Agarose* (Santa Cruz Biotechnology), y se agitó en rotación a 4 ºC durante 1 h. El inmunocomplejo se colectó centrifugando a 800 g durante 5 min a 4ºC. El sobrenadante se eliminó con una pipeta y la proteína se lavó 2 veces con 300 µl de amortiguador de lisis, repitiendo la centrifugación en cada lavado. Después del último lavado, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 30 µl de amortiguador muestras 2X, y se realizó un Western blot para la determinación de ERK1/2.

6.7 ENSAYO DE HERIDA-CICATRIZACIÓN

En una caja de Petri de 6 cm de diámetro, se sembraron hepatocitos como se indicó anteriormente. Con una punta de pipeta de 200 µl se raspó la monocapa de cultivo celular haciendo tres líneas paralelas y una perpendicular. Las células fueron lavadas 2 veces con medio de cultivo para eliminar las células despegadas, y se agregó medio de Williams sin SFB para después poner los tratamientos: control, NE y pretratamiento con AC 10 min seguido de NE. Se tomaron fotografías en diferentes tiempos utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio invertido Axiovert 25 (Carl Zeiss).

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos con ERK1/2 se realizaron en al menos 3 experimentos independientes, mientras que con PI3K se realizaron una sola vez.

Para la comparación de medias de diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por prueba de Tukey. Se empleó el programa SPSS 13.0. La diferencia entre medias se consideró significativa con $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 EFECTO DEL AC SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y PI3K INDUCIDAS POR LA NE

Antes de evaluar el efecto del AC sobre la fosforilación de ERK1/2 y PI3K por la NE, se hicieron experimentos utilizando únicamente NE. Para determinar la fosforilación de ERK1/2 y PI3K en el cultivo primario de hepatocitos, las células se expusieron 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min a NE 10 μM, se aisló la proteína total y la fosforilación de dichas proteínas se determinó por Western blot. En la figura 7.1 se observa que la NE indujo la fosforilación de ERK1/2. El valor máximo se observó a los 10 min, con un valor promedio 2 veces con respecto al valor basal. La fosforilación disminuyó durante los minutos siguientes, y una hora después del tratamiento el promedio fue estadísticamente igual a la fosforilación basal.

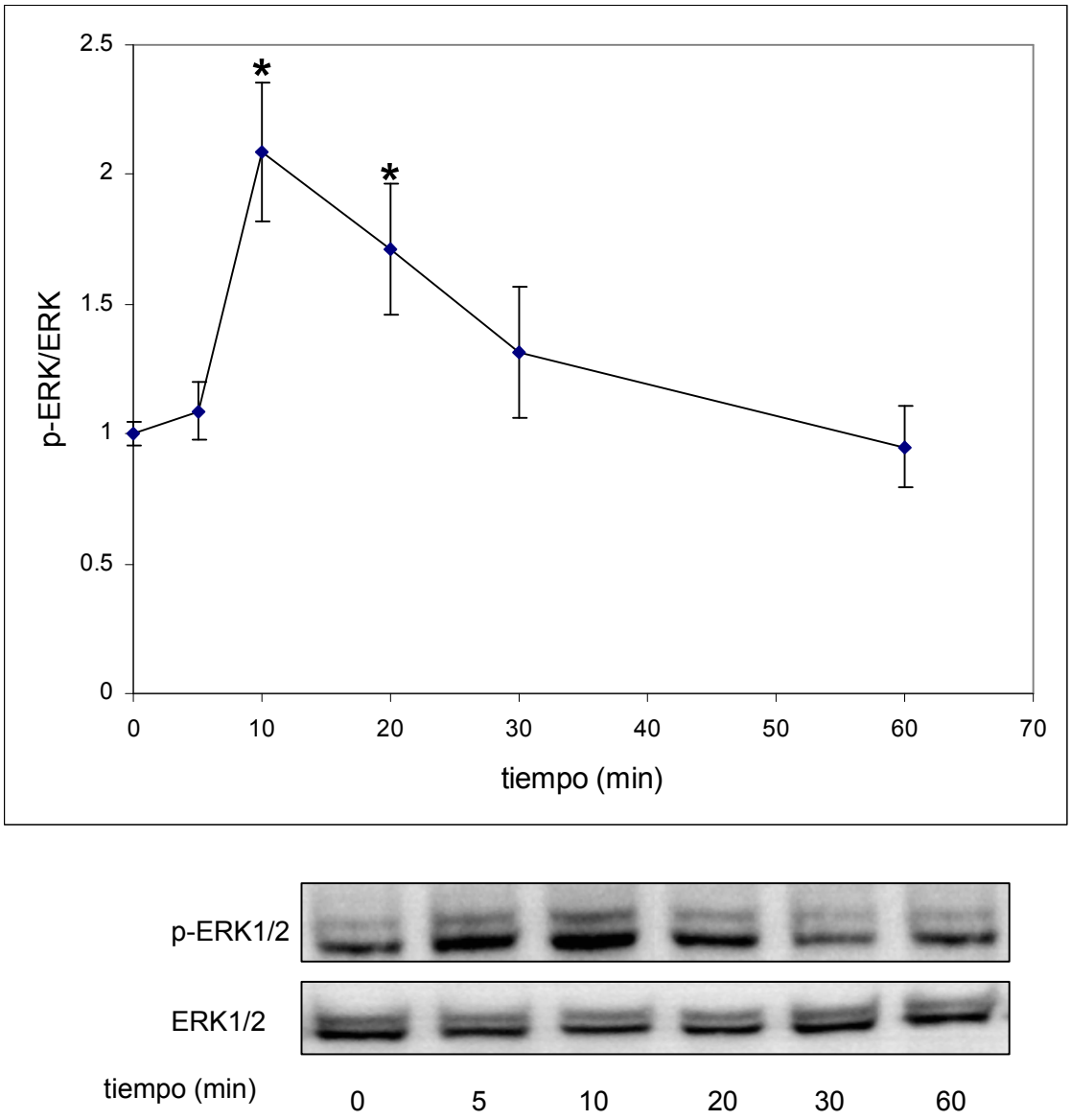


Figura 7.1. **Activación de ERK1/2 inducida por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron con NE 10 µM durante diferentes tiempos. La fosforilación se evaluó por Western blot. Los resultados se presentan como promedio ± E.E. de al menos 5 experimentos independientes. En la parte inferior se muestra un gel representativo. *P < 0.05 respecto a tiempo 0.

Otra proteína de señalización activada por NE fue PI3K. En la figura 7.2 se observa que PI3K presentó un máximo de fosforilación a los 5 min del tratamiento con NE, y 30 min después del tratamiento el nivel de fosforilación de PI3K fue igual al control.

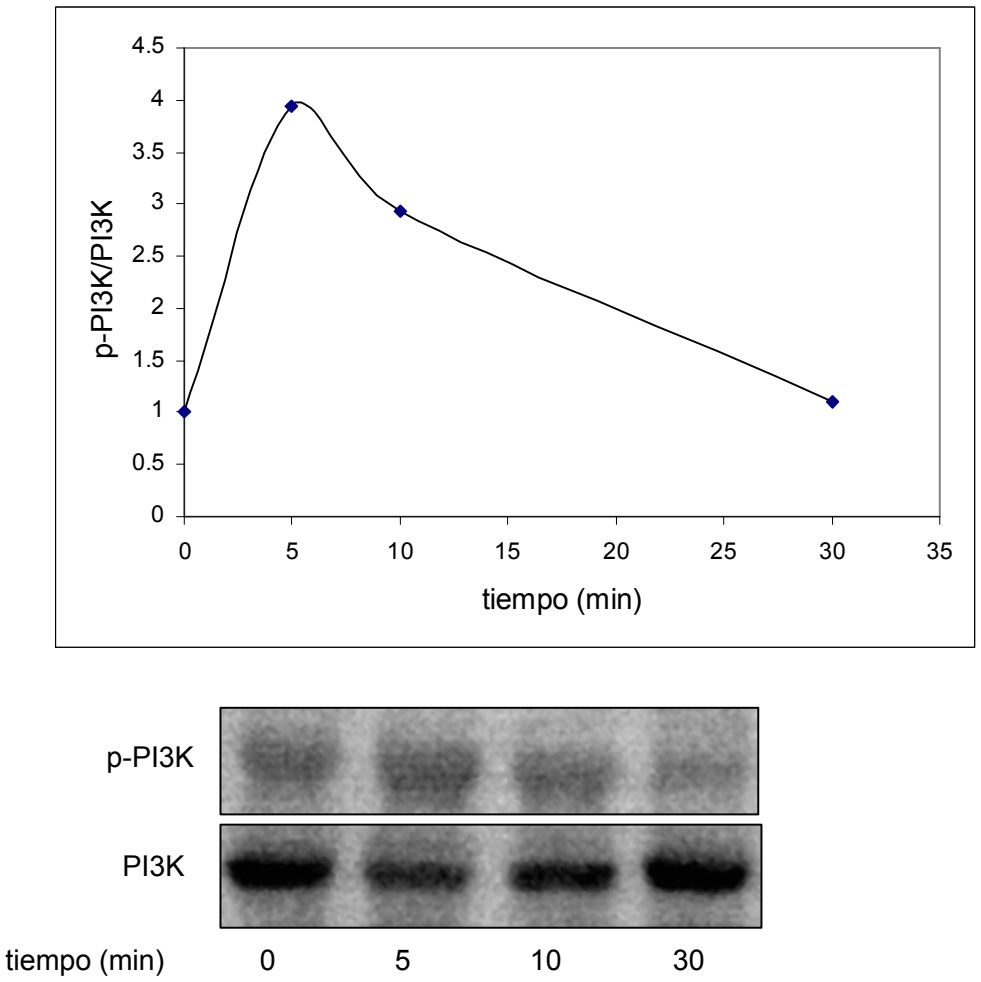


Figura 7.2. **Activación de PI3K inducida por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron con NE 10 μM durante diferentes tiempos. La fosforilación se evaluó por Western blot.

Para conocer cuál es el efecto independiente de AC sobre la fosforilación de ERK1/2, se hicieron experimentos para determinar si AC puede inducir la fosforilación de dicha proteína. En la figura 7.3 se observa que el tratamiento con AC 80 µM no tuvo efectos estadísticamente significativos sobre la fosforilación de ERK1/2 en el lapso de 5 a 60 min.

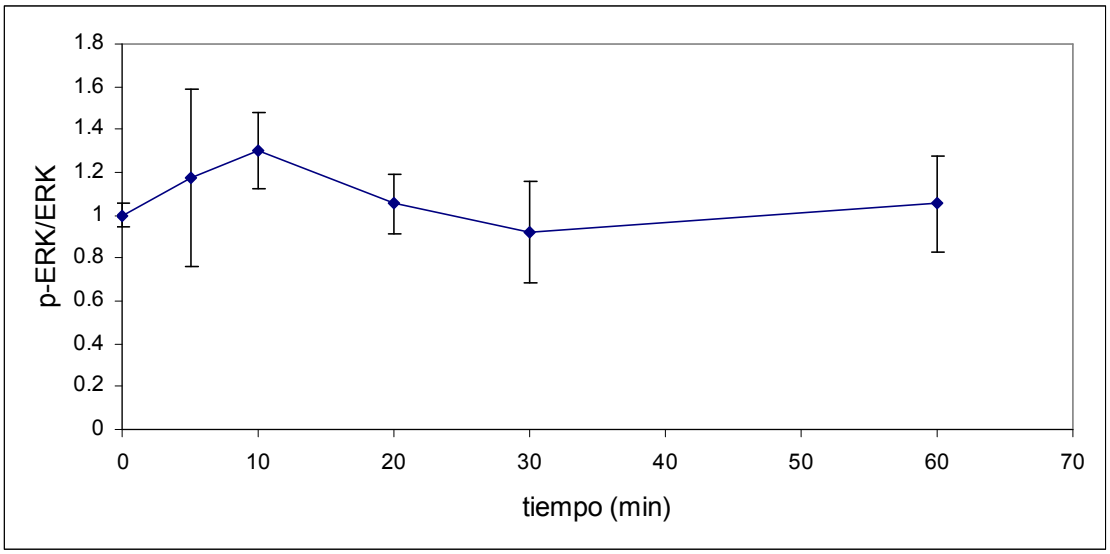


Figura 7.3. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la fosforilación de ERK1/2 en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron durante diferentes tiempos con AC 80 µM y la fosforilación de ERK1/2 se determinó por Western blot. Los resultados se presentan como promedio ± E.E. de al menos 3 experimentos independientes.

Para determinar el efecto que tiene la exposición a AC sobre la fosforilación de ERK1/2 y PI3K inducida por NE, los hepatocitos fueron tratados durante 10 min con AC 80 μM, y posteriormente con NE 10 μM; se aisló la proteína total y la fosforilación se determinó por Western blot. En la figura 7.4 se observa que el valor promedio de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a NE fue de 2 veces el valor del control, mientras que cuando las células fueron pretratadas con AC, dicho valor disminuyó a 1.2 veces el valor del control; esta disminución fue estadísticamente significativa. Por otro lado, en la figura 7.5 se observa que también la fosforilación de PI3K disminuyó por el pretratamiento con AC, en este caso el valor se redujo a un valor similar al control.

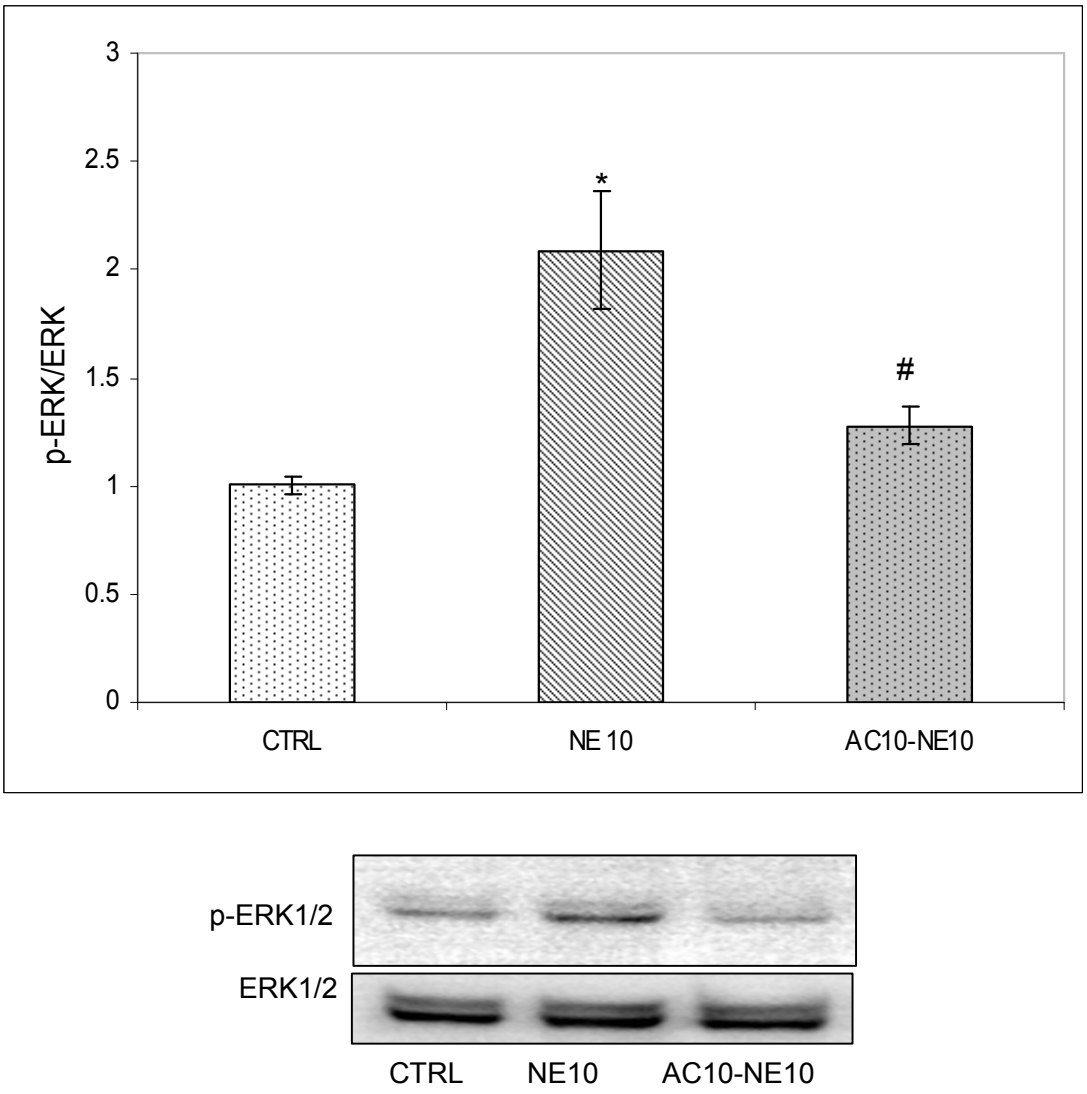


Figura 7.4. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la activación de ERK1/2 por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron con AC 80 μM y NE 10 μM de acuerdo con la siguiente simbología: CTRL-control, NE 10–tratamiento con NE 10 min, AC10-NE10 pretratamiento con AC 10 min, seguido de tratamiento con NE 10 minutos. La fosforilación se determinó por Western blot. Los resultados se presentan como promedio ± E.E. de al menos 6 experimentos independientes. En la parte inferior se muestra un gel representativo. *****P < 0.05 respecto a CTRL. $^{\#}$P = 0.009 comparado con NE 10 min.

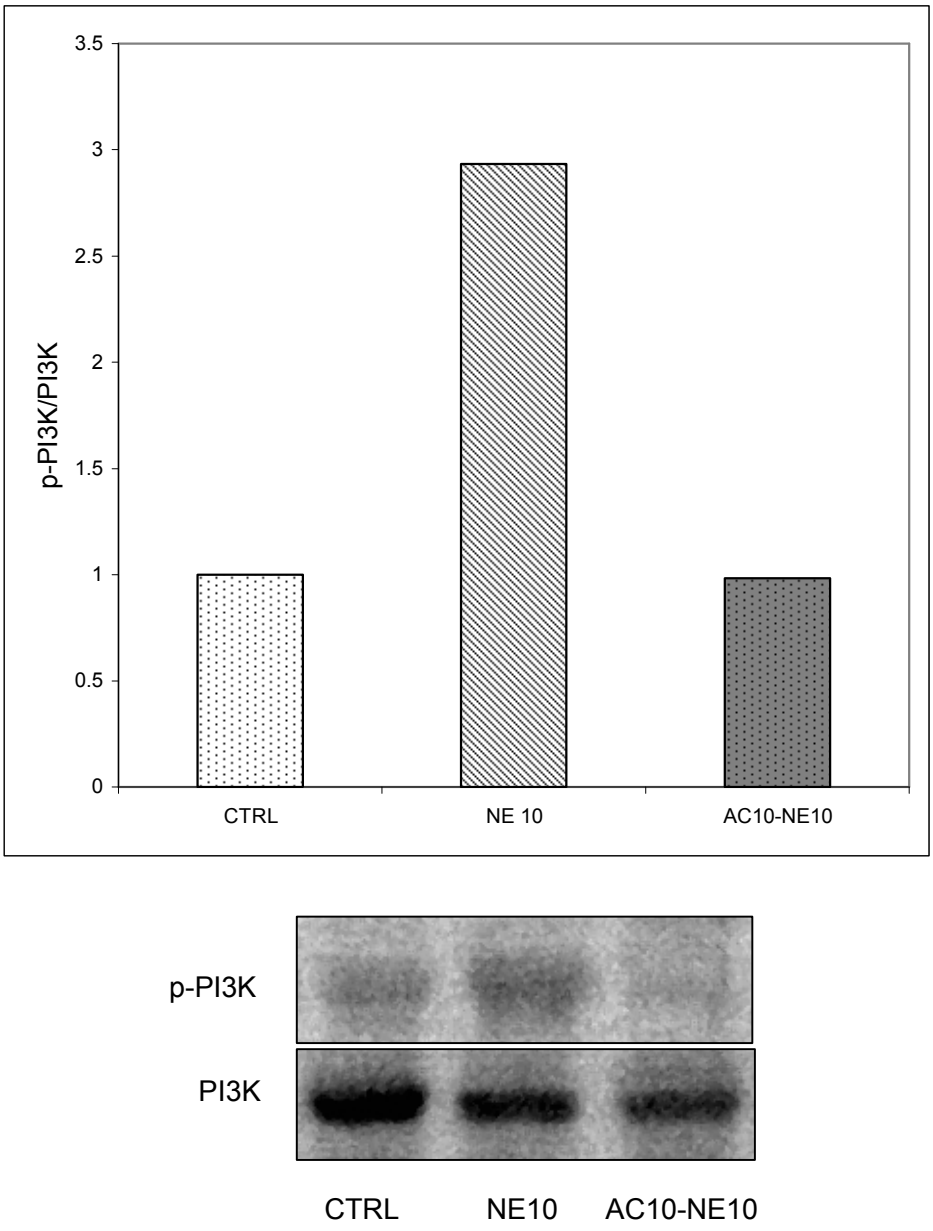


Figura 7.5. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la activación de PI3K por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron con AC 80 μM y NE 10 μM de acuerdo con la siguiente simbología: CTRL-control, NE 10–tratamiento con NE 10 min, AC10-NE10 - pretratamiento con AC 10 min, seguido de tratamiento con NE 10 minutos. La fosforilación se determinó por Western blot.

Como se mencionó, ERK1/2 se activa en respuesta a varios ligandos, como neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento como HGF, el cual tiene un papel fundamental en la proliferación de hepatocitos durante la regeneración hepática. Por lo tanto, se analizó el efecto del AC sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por HGF, con la finalidad de determinar si, al igual que con NE, hay un efecto inhibitorio. Para esto, las células fueron pretratadas con AC durante 10 min, y después se agregó HGF al medio de cultivo; se aisló la proteína total y se analizó la activación de ERK1/2 por Western blot. En la figura 7.6 se observa que el AC también inhibió la fosforilación de ERK1/2 inducida por HGF. Esto sugiere que el AC induce mecanismos de regulación negativa independientes del ligando que active a ERK1/2.

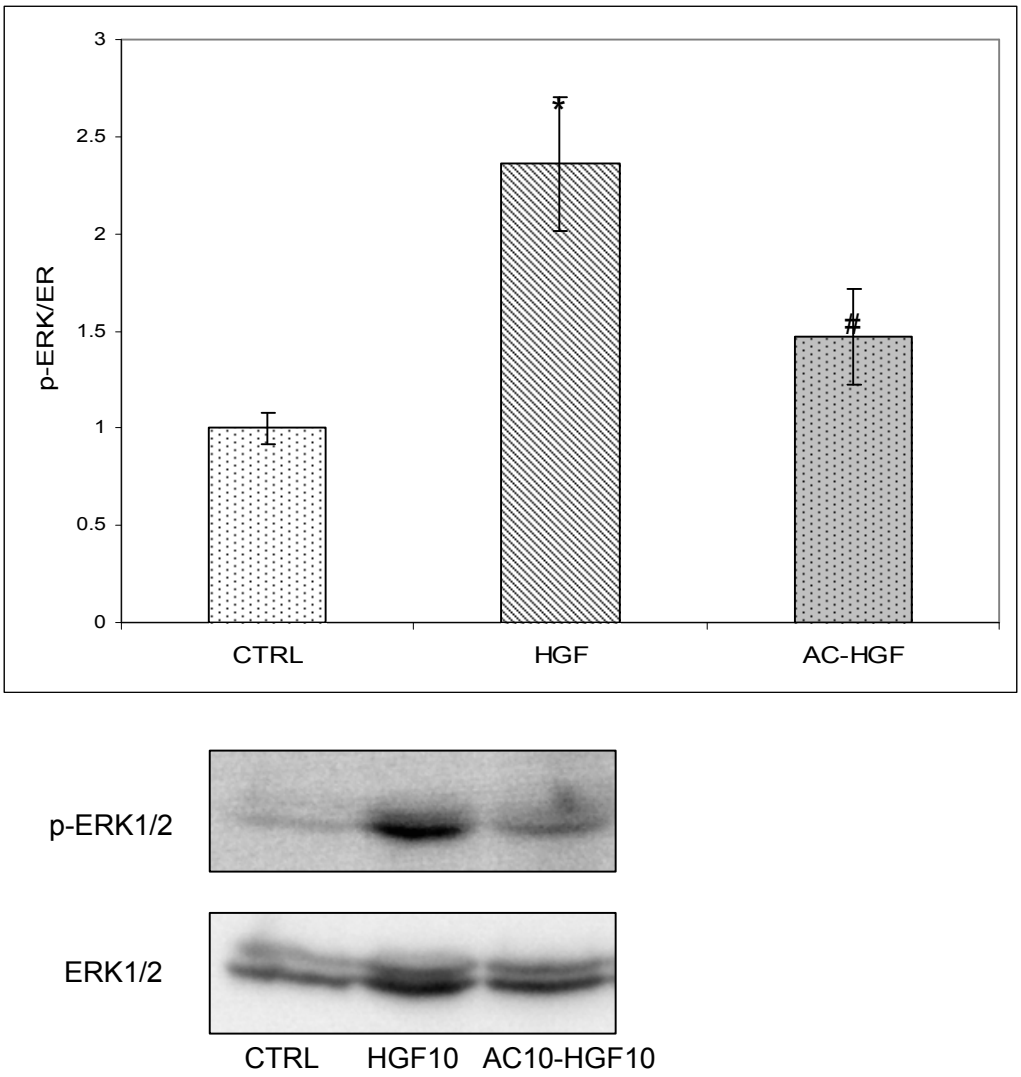


Figura 7.6. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la activación de ERK1/2 por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron con AC 80 μM y HGF 50 ng/ml de acuerdo con la siguiente simbología: CTRL-control, HGF–tratamiento con HGF 10 min, AC-HGF pretratamiento con AC 10 min, seguido de tratamiento con HGF 10 minutos. La fosforilación se determinó por Western blot. Los resultados se presentan como promedio ± E.E. de al menos 5 experimentos independientes. En la parte inferior se muestra un gel representativo. $^{*}P < 0.05$ respecto a CTRL. $^{\#}P < 0.05$ comparado con HGF.

7.2 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB Y MIGRACIÓN CELULAR MEDIADA POR LA NE

Además de estudiar el efecto del AC a nivel de fosforilación de proteínas, se hizo un experimento para determinar el efecto del AC sobre la activación de NF-κB, para lo cual se realizó un ensayo de retardo en movimiento electroforético con el cual se analizó la activación de NF-κB por la NE y el efecto que tiene el pretratamiento con AC. En la figura 7.7 se observa que el tratamiento con NE activó al factor de transcripción NF-κB en los tiempos estudiados de 0.5, 1, 1.5 y 2 h, mientras que el pretratamiento con AC disminuyó la activación de dicho factor de transcripción 0.5 y 1 h después de haber agregado NE al medio. Este resultado sugiere que la NE activa vías de señalización que dan lugar a la activación de NF-κB y que el AC inhibe esta respuesta.

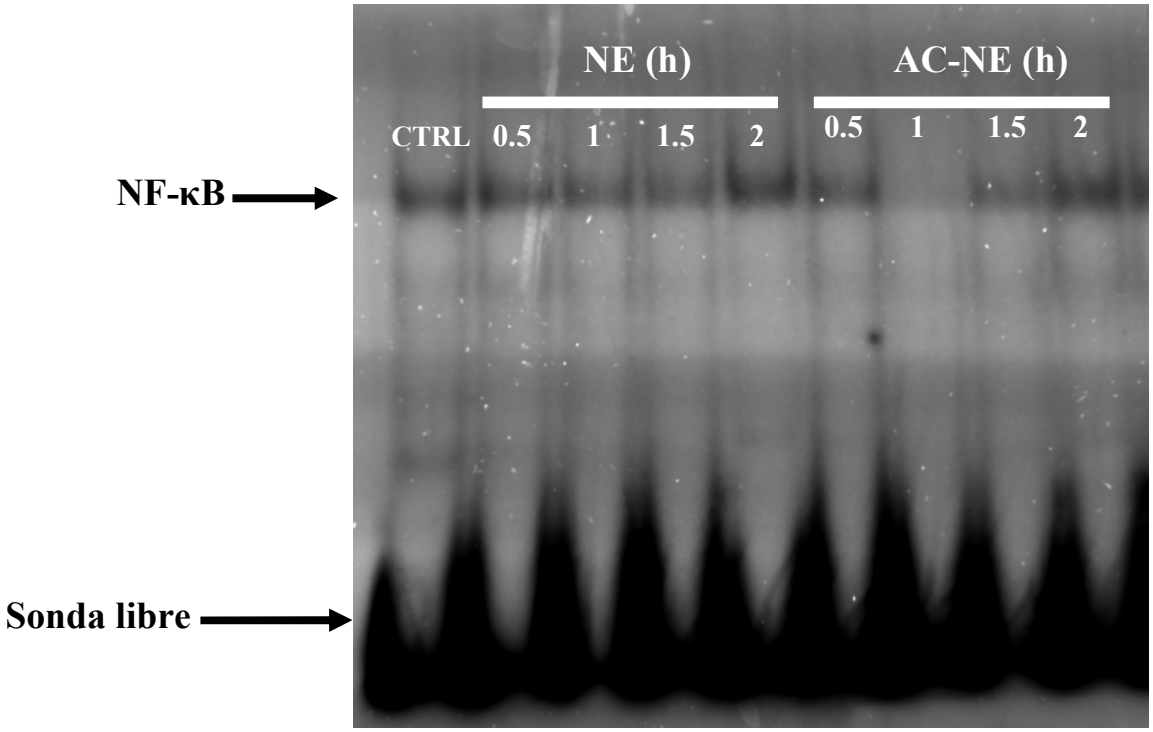


Figura 7.7. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la activación de NF-κB por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron durante diferentes tiempos con NE 10 μM con o sin pretratamiento con AC 80 μM durante 10 min. La activación de NF-κB se determinó por medio de EMSA.

Dado que en resultados anteriores se mostró que la NE activa la vía de ERK1/2, la cual forma parte de la regulación de proliferación, sobrevivencia y migración celular; se evaluó el efecto que tiene la NE y el pretratamiento con AC sobre un modelo de reparación, para lo cual se llevó a cabo un ensayo de herida-cicatrización. En la figura 7.8 se observa que en las células control hubo poca migración celular, y que la NE favoreció dicha respuesta tanto a las 24 como 48 h. Sin embargo, el pretratamiento con AC disminuyó esta respuesta.

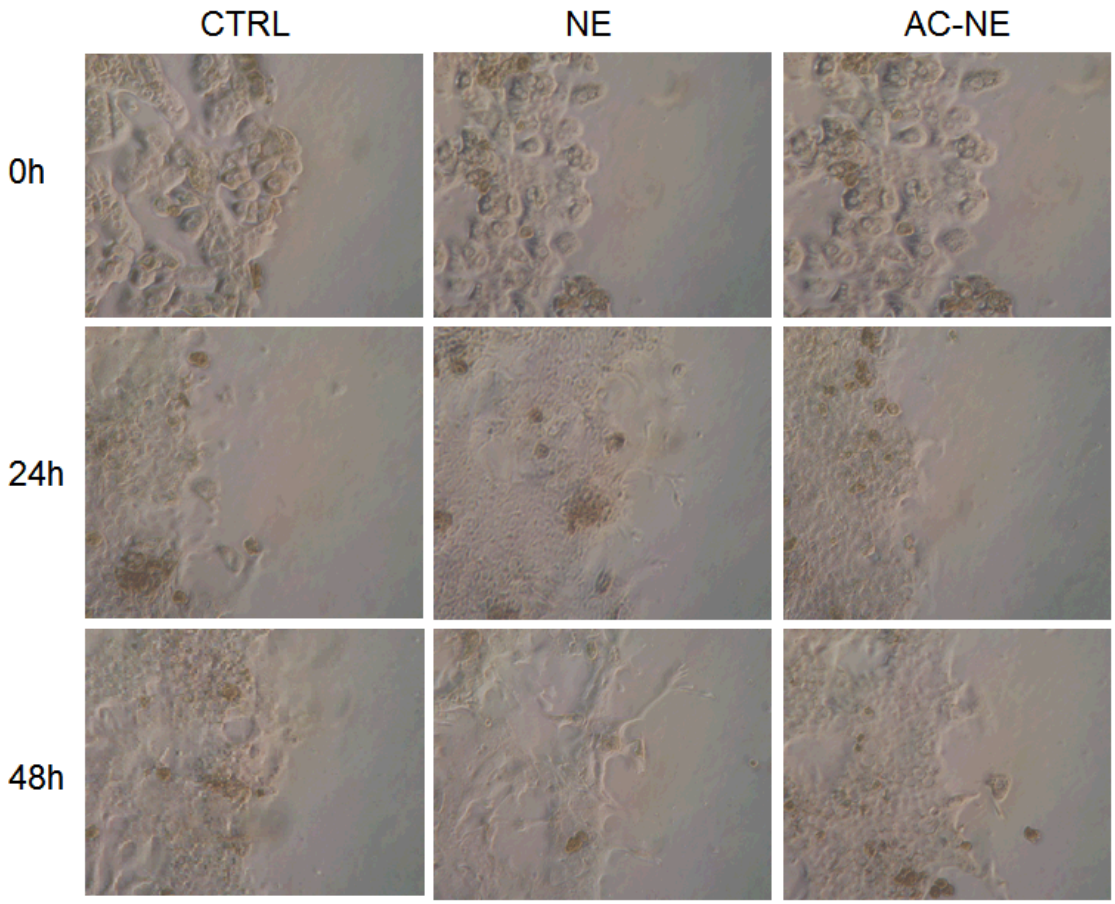


Figura 7.8. **Efecto del acetaldehído (AC) sobre la migración celular estimulada por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se trataron durante diferentes tiempos con NE 10 µM con o sin pretratamiento con AC 80 µM durante 10 min. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido a las 24 y 48 h de los tratamientos. Aumento 200X.

7.3 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE FOSFATASAS

En las figuras anteriores se presentaron resultados en los que se muestra que la NE activa las vías de señalización ERK1/2 y PI3K, mientras que la exposición previa a AC inhibe dicha activación. Además, se mostró que dicho efecto inhibitorio también se observa cuando posterior al AC se expone a las células a HGF. Dado que el mecanismo inhibitorio activado por el AC parece ser independiente del ligando que activa a ERK1/2, se analizó la participación de fosfatasas de proteínas como parte del mecanismo inhibitorio activado por el AC, pues el estrés provocado por tóxicos puede activar fosfatasas [61].

En la figura 7.9 se presenta el efecto del ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), el cual es un inhibidor general de las PTP, sobre la fosforilación de ERK1/2. Se observa que Na_3VO_4 por sí solo indujo la fosforilación de ERK1/2 en una manera dependiente de la concentración. Los niveles de fosforilación inducidos por Na_3VO_4 fueron mayores a los inducidos por NE o por HGF pues cuando las células se expusieron durante 50 min, el cociente p-ERK/ERK fue de entre 3 y 12, mientras que cuando las células se expusieron a NE 10 μM o HGF 50 ng/ml durante 10 min, el cociente fue de 2 y 2.3 respectivamente. Además, en las células en las que después de 30 min de tratamiento con Na_3VO_4 se expusieron a AC y posteriormente a NE, la fosforilación de ERK1/2 fue mayor a la observada cuando sólo se trató con Na_3VO_4. Este contraste se observa particularmente cuando la concentración de Na_3VO_4 fue de 10 μM. Este resultado sugiere que el AC activa PTP, porque aún cuando las células fueron expuestas a AC, el pretratamiento con Na_3VO_4 previno la inhibición observada anteriormente, permitiendo la fosforilación adicional mediada por NE.

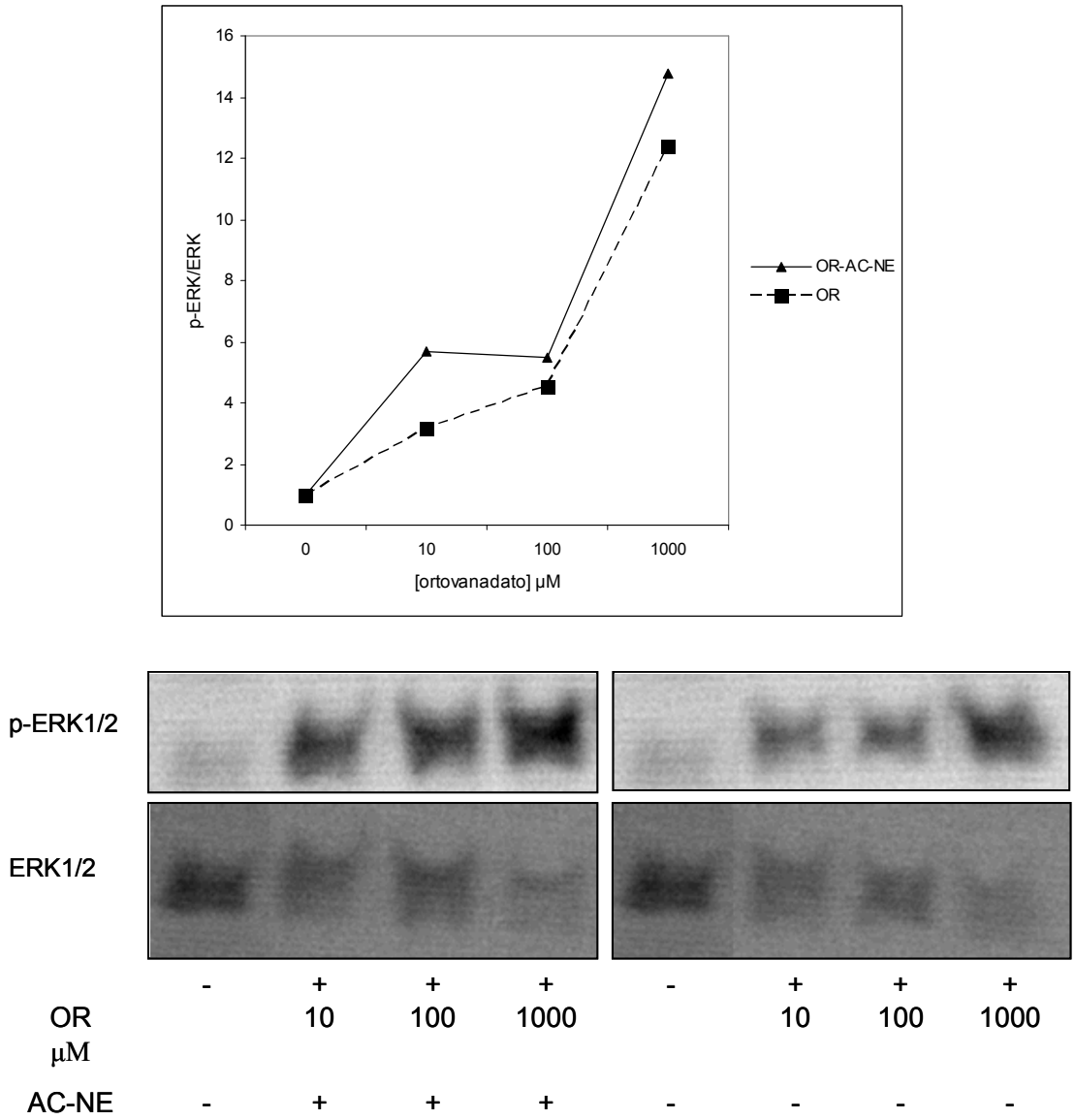


Figura 7.9. **Efecto de la inhibición de las fosfatasas de tirosina (PTP) con ortovanadato de sodio sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 en presencia de acetaldehído (AC) y norepinefrina (NE).** OR-AC-NE: las células fueron tratadas durante 30 min con ortovanadato de sodio en concentraciones de 10, 100 y 1000 µM, posteriormente con AC 80 µM por 10 min, seguido de NE 10 µM durante 10 min. OR: las células se trataron durante 50 min con ortovanadato de sodio en concentraciones de 10, 100 y 1000 µM. Se aisló la proteína total y la fosforilación de ERK1/2 se determinó por Western blot.

Además de analizar la activación de PTP por AC, se hizo un ensayo de inmunoprecipitación para determinar si PP2A es activada por AC. En la figura 7.10 se observa que después de 20 min el AC indujo una asociación entre PP2A y ERK1/2, y después de 1 h de exposición a AC, la asociación fue comparable a la asociación basal observada en el experimento control. En las figuras 7.9 y 7.10 se tiene entonces que el AC induce la activación de proteínas fosfatasas, y este puede ser el mecanismo por el que el AC inhibe la fosforilación de ERK1/2 y PI3K.

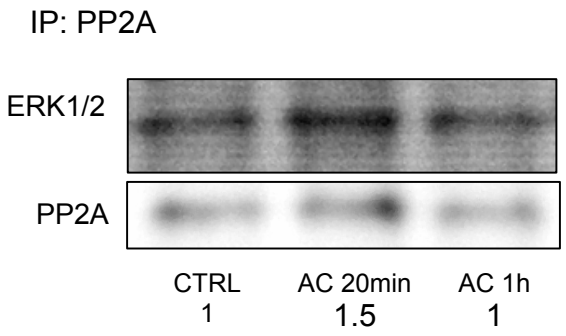


Figura 7.10. **Efecto del AC sobre la asociación de ERK1/2 con PP2A.** Las células se expusieron a AC 80 μM por 20 min y 1h, se aisló la proteína total y se inmunoprecipitó PP2A. Posteriormente se analizó ERK1/2 y PP2A por Western blot. IP: Inmunoprecipitación. Debajo de los nombres de los tratamientos se muestran los valores densitométricos de la asociación de ERK1/2-PP2A.

7.4 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL MODELO

Para determinar el tipo de receptor adrenérgico presente en el modelo, se utilizaron antagonistas de los receptores adrenérgicos α_1 y β (prazosina y propranolol, respectivamente). Las células se expusieron durante 30 min a los antagonistas y después se agregó NE al medio, posteriormente se analizó el efecto de los antagonistas sobre la fosforilación de ERK1/2. En la figura 7.11 se muestra que tanto la prazosina, como el propranolol inhibieron la fosforilación de ERK1/2 mediada por NE. Esto sugiere que bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el cultivo de hepatocitos, tanto los receptores α_1 como β estuvieron presentes en las células.

Para corroborar los resultados obtenidos con los antagonistas de los receptores α_1 y β, se realizaron experimentos de RT-PCR para determinar si los ARNm de los receptores adrenérgicos α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, β_1, β_2 y β_3 se encuentran en el cultivo primario de hepatocitos utilizado. En la figura 7.12 se muestra que bajo las condiciones de cultivo, los hepatocitos expresan los ARNm de los receptores adrenérgicos α_{1A}, α_{1B}, β_2 y β_3, lo cual concuerda con los resultados obtenidos utilizando antagonistas.

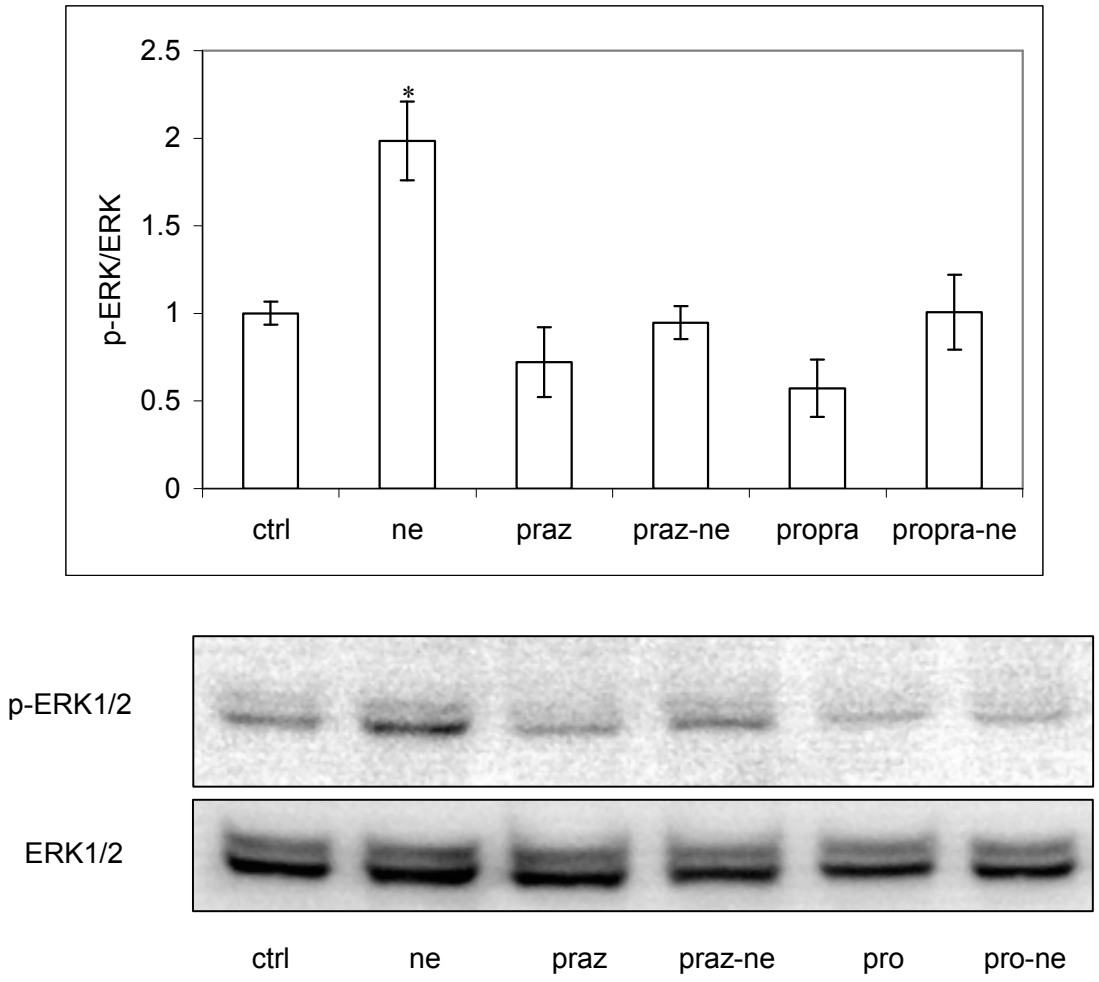


Figura 7.11. **Efecto de antagonistas de los adrenoceptores α_1 y β sobre la activación de ERK1/2 inducida por norepinefrina (NE) en cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Las células se expusieron 30 min a antagonistas de los adrenoceptores α_1 (Prazosina 10μM) y β (Propranolol 10μM), posteriormente se expusieron a NE 10μM durante 10 min para evaluar la fosforilación de ERK1/2 por Western blot. Los datos se muestran como promedio ± E.E. de al menos 3 experimentos independientes. En la parte inferior se muestra un gel representativo *P < 0.05 respecto a CTRL.

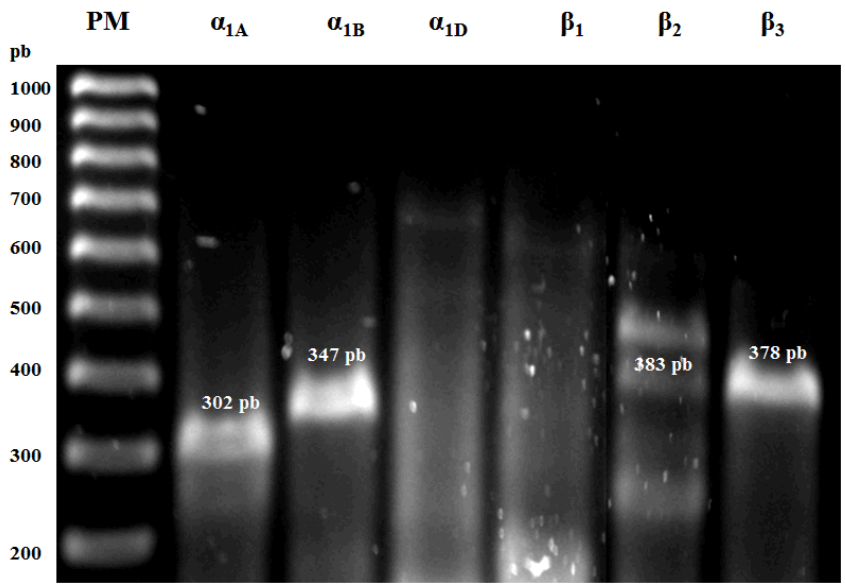


Figura 7.12. **ARNm de los adrenoceptores α_1 y β presentes en el cultivo primario de hepatocitos.** Las células se cultivaron como se indicó en la sección de materiales y métodos, se extrajo el ARN total y los ARNm se amplificaron por RT-PCR. El experimento se repitió con hepatocitos de dos ratones diferentes, y se obtuvieron los mismos resultados.

8. DISCUSIÓN

8.1 EFECTO DEL AC SOBRE RESPUESTAS MEDIADAS POR NE

La NE tiene un papel fundamental en la regeneración hepática, con gran capacidad para potenciar el papel mitogénico de factores de crecimiento como HGF y EGF [62, 63]. Aunque los hepatocitos en el hígado normal se dividen a tasas muy bajas, su capacidad proliferativa aumenta notablemente después de un daño como el producido por métodos quirúrgicos como la hepatectomía parcial, la remoción de tejido canceroso o la remoción de tejido para donación. Otro mecanismo de daño al hígado es el causado por xenobióticos, como el etanol, que es biotransformado principalmente en el hígado.

El etanol causa daño hepático y puede alterar la capacidad regenerativa del hígado [64, 65]. Este efecto negativo del etanol puede deberse al etanol mismo, a los productos de su biotransformación como el AC, o bien a otros productos generados como las especies reactivas de oxígeno o desbalance en el estado redox. Dado el papel hepatotóxico del AC [66], en este trabajo se estudió el efecto del AC sobre las respuestas mediadas por NE a nivel de 1) fosforilación de proteínas de transducción de señales relacionadas con la reparación y regeneración hepática, 2) activación de factores de transcripción y 3) migración celular.

En las figuras 7.1 y 7.2 se muestra que la NE indujo la activación de las proteínas ERK1/2 y PI3K. La activación de estas proteínas en respuesta a la NE se ha reportado en hepatocitos [37, 67], aunque en otro reporte indican que los agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 y β (fenilefrina y metaproterenol) no activaron ERK1/2 en un cultivo primario de hepatocitos de rata, sin embargo esos mismos autores mencionan que al exponer a las células a HGF junto con los agonistas mencionados, hubo una potenciación en la actividad de ERK1/2 [68]. El máximo de fosforilación observado en el caso de PI3K ocurrió a los 5 min de exposición a la NE, mientras que la fosforilación máxima de ERK1/2 se observó a los 10 min. Es posible que la fosforilación temprana de PI3K esté

relacionada con la fosforilación de ERK1/2, pues se la inhibición de PI3K previene la activación de ERK1/2 mediada por un receptor adrenérgico en otros tipos celulares [69].

Antes de evaluar el efecto del AC sobre la fosforilación de ERK1/2 y PI3K mediada por la NE, se hizo un experimento para determinar si el AC por sí solo es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2. En la figura 7.3 se muestra que aunque a los 10 min de tratamiento con AC el valor promedio de la fosforilación de ERK1/2 fue de 1.3, esta diferencia no es estadísticamente significativa con respecto a las células sin tratamiento. En contraste con estos resultados, la exposición a AC induce la activación de ERK1/2 y JNK. Sin embargo, en dicho reporte se utilizaron concentraciones de AC entre 0.2 y 5 mM, mientras que en el presente trabajo se utilizó una concentración de 80 μM, esa diferencia en la concentración de AC podría explicar el contraste en los resultados [70]. Además, la concentración de AC a la que están expuestos los hepatocitos *in vivo* debido a la ingesta de etanol es del orden micromolar, no milimolar [71, 72].

En las figuras 7.4 y 7.5 se observa que la exposición previa a AC disminuye la fosforilación de ERK1/2 y PI3K mediada por NE. Estos resultados son similares a los obtenidos en un modelo de cultivo primario de hepatocitos de rata, donde la exposición aguda etanol inhibió la activación de la proteína AKT inducida por insulina [61]; además, en un modelo de exposición crónica a etanol en ratas se inhibió la activación de ERK1/2 en el hígado [73].

Asimismo, en la figura 7.6 se muestra que el AC también afecta la fosforilación de ERK1/2 inducida por HGF, lo que sugiere que el mecanismo de inhibición es independiente del ligando que activa la vía de ERK1/2. Los resultados en las figuras 7.4, 7.5 y 7.6 muestran que el AC inhibe vías de señalización fundamentales para la proliferación de hepatocitos, y explican mecanismos de toxicidad debida a la exposición al etanol, y proveen evidencia para explicar la reducción en la capacidad regenerativa del hígado observada en modelos *in vivo* [74, 75].

El efecto del AC sobre el crecimiento celular se ha descrito en una línea celular con capacidad para oxidar etanol. Se mostró que la producción de AC, más que el desbalance en el estado redox o la presencia del mismo etanol, tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular [76]. Además, existen reportes que indican que el AC puede inhibir la proliferación de otros tipos celulares como células ováricas [77] y astrocitos [78]. En estos reportes, se mostró que el efecto sobre el crecimiento celular se debió a la formación de AC, pues al inhibir la oxidación de etanol a AC, el efecto negativo disminuyó significativamente. Por lo que los resultados presentados aquí ayudan a explicar la inhibición del crecimiento celular provocada por el AC.

El NF-κB es uno de los factores de transcripción que regulan la regeneración hepática [41], así la prevención de la apoptosis [79]. El NF-κB es un factor de transcripción formado por la homo- o heterodimerzación de proteínas de la familia rel. En su forma inactiva se encuentra en el citoplasma, donde está unido a proteínas inhibitorias, denominadas IκB, que evitan su translocación al núcleo y su unión a secuencias consenso de ADN para activar genes blanco. La activación de NF-κB necesita de la fosforilación de IκB y su subsecuente ubiquitinación, lo que da lugar a la digestión proteolítica de IκB [41].

La activación de este factor de transcripción por NE ya se ha encontrado en las células estelares hepáticas [80] y en general se sabe que los GPCR pueden activar a dicho factor como mecanismo para favorecer la proliferación celular [81]. En la figura 7.7 se observa que la NE activó a NF-κB en todos los tiempos estudiados. Sin embargo, en las células pretratadas con AC, hubo una disminución en la unión del factor a su secuencia específica de ADN, particularmente a 0.5 y 1 h de exposición a la NE. Esta disminución en la actividad de NF-κB podría estar relacionada con la activación de PP2A por AC, pues la inhibición de PP2A utilizando inhibidores químicos como el ácido ocadaico dan lugar a la fosforilación de IκB y la activación de NF-κB [82]. La inhibición parece ser reversible, pues en las células pretratadas con AC y expuestas luego a NE 2 h, se puede observar la unión del factor de transcripción a la sonda. Es necesario estudiar este mecanismo para comprender el efecto observado

Además de estudiar los efectos del AC sobre las vías de señalización mediadas por la NE y el HGF a nivel de fosforilación y nivel transcripcional, se hizo un ensayo de herida-cicatrización para estudiar el papel de la NE y el AC en esta respuesta. Este ensayo se utiliza para estudiar la migración celular *in vitro* en una monocapa de células y sirve para simular la reparación que se lleva a cabo *in vivo*.

La migración celular depende del reacomodo del citoesqueleto y la participación de vías de señalización como ERK1/2. La activación de esta vía es uno de los mecanismos que controlan la capacidad migratoria de los hepatocitos *in vitro* [83]. Además, la activación de ERK1/2 por los receptores adrenérgicos α_1 [84] y β [85] media la respuesta de migración celular en modelos de herida-cicatrización que utilizan otros tipos celulares. En concordancia con estos reportes, en la figura 7.8 se muestra que el tratamiento con NE favoreció la migración celular de los hepatocitos a las 24 y 48 h de tratamiento. De manera similar a lo que se muestra en las figuras anteriores, la respuesta mediada por NE fue inhibida cuando las células se pretrataron con AC. Este efecto puede deberse a la inhibición de la vía ERK1/2 que se observó anteriormente, además es posible que la exposición a AC haya alterado el citoesqueleto de los hepatocitos, pues la exposición de los hepatocitos a etanol da lugar a la acetilación, mediada por el AC, de α-tubulina y genera microtúbulos estables que inhiben la migración celular [86, 87].

8.2 EFECTO DEL AC SOBRE LA ACTIVACIÓN DE FOSFATASAS

En los resultados descritos se mostró que el AC inhibe respuestas mediadas por NE a nivel de proteínas de señalización, actividad transcripcional y migración celular. Además, en la figura 7.6 se mostró que el efecto inhibitorio del AC no está limitado a la fosforilación de ERK1/2 mediada por NE, sino que también afecta la respuesta mediada por HGF, por lo que el mecanismo inhibitorio activado por AC es independiente del ligando que activa las respuestas. Entre los posibles mecanismos que pueden mediar el efecto inhibitorio del AC se encuentran la internalización de receptores de membrana, inactivación de proteínas por formación de enlaces covalentes con AC y la activación de fosfatasas de proteínas por AC. Debido a que se sabe que la exposición a etanol induce la

activación de la fosfatasa PTEN [61], en este trabajo se estudió la activación de fosfatasas por AC.

Para evaluar la activación de fosfatasas de tirosina o PTP, se utilizó el inhibidor de PTP ortovanadato de sodio. Si el AC activa PTP, entonces se esperaba que al tratar a las células con ortovanadato y luego con AC y NE, la fosforilación de ERK1/2 sería mayor a la observada con ortovanadato solo, pues al estar inhibidas las PTP ya no se observaría el efecto inhibitorio del AC sobre la fosforilación de ERK1/2.

Para analizar ERK1/2 fosforilado se utilizó un anticuerpo dirigido contra ERK1/2 fosforilado únicamente en tirosina. En la figura 7.9 se observa que utilizando 3 diferentes concentraciones de ortovanadato, el cociente p-ERK/ERK fue mayor cuando las células tratadas con ortovanadato se expusieron además a AC y NE. De manera interesante, se observa que el ortovanadato por sí solo dio lugar a la fosforilación de ERK1/2 en forma dependiente de la dosis, y que la magnitud de esta fosforilación fue mayor a la observada cuando las células se expusieron a NE o HGF. Resultados similares se obtuvieron en una línea de fibroblastos estimulados con EGF, en los que la exposición previa a ortovanadato dio lugar a una mayor fosforilación de ERK1/2 [88]. Otro efecto de la inhibición de PTP es que el ortovanadato revierte la inhibición por contacto observada en cultivo primario de hepatocitos de rata, y en este caso el efecto está mediado por el aumento en la fosforilación de ERK1/2 [89].

También se analizó la activación de la fosfatasa de serina-treonina PP2A. En la figura 7.10 se observa que el AC indujo la asociación de PP2A con ERK1/2 a los 20 min de exposición; mientras que 1 h después, la asociación fue igual a la observada en el control. Es necesario realizar experimentos adicionales para dilucidar el mecanismo de activación de PTP y PP2A por AC. Finalmente, cabe la posibilidad de que la activación de fosfatasas sea un mecanismo de prevención para evitar la división de células dañadas a pesar de la estimulación con factores de crecimiento.

8.3 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL MODELO

Las funciones de la NE están mediadas por diversos subtipos de adrenoceptores. En el hígado, estos receptores regulan diferentes funciones como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Además, los receptores adrenérgicos contribuyen a la regulación de la división de hepatocitos y regeneración hepática [36, 48, 63]. El subtipo de receptores adrenérgicos expresados en el hígado varía entre las especies. En el hígado de conejos, perros, gatos y humanos se expresan principalmente los receptores α_{1A}, mientras que el subtipo α_{1B} se ha detectado en el hígado del pez *Ichtalurus punctatus* y roedores como rata, ratón y hámster. En el hígado del mono se ha detectado la coexpresión de los receptores α_{1A} y α_{1B} [90-96].

Para determinar qué receptores adrenérgicos median las respuestas a NE en el modelo utilizado, se utilizaron antagonistas de los receptores adrenérgicos α_1 y β, además de que se realizó RT-PCR para identificar los ARNm de los adrenoceptores α_1 y β.

Dado que tanto los adrenoceptores α_1 [97] como β [85] son capaces de activar vías de señalización que implican la fosforilación de ERK1/2, se utilizaron antagonistas de dichos adrenoceptores, para evaluar su efecto sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por NE. Utilizando los antagonistas prazosina y propranolol, en la figura 7.11 se mostró que ambos inhibieron la fosforilación de ERK1/2 mediada por NE, lo cual sugiere que ambos adrenoceptores se encuentran en los hepatocitos bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Por lo tanto, se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar qué mensajeros de los receptores adrenérgicos se encuentran en los hepatocitos, esperando encontrar al menos un subtipo de α_1 y uno de β. En la figura 7.12 se muestra que se encontraron los ARNm de los adrenoceptores α_{1A}, α_{1B}, β_2 y β_3. Este resultado concuerda con lo encontrado en la figura 7.11. Sin embargo, la presencia de un ARNm no garantiza que se exprese la proteína correspondiente, por ejemplo, en la línea HepG2 se detectaron los ARNm de los receptores α_{1A} y α_{1B}, pero no se encontró su expresión a nivel proteico [62]. Por otro lado, los experimentos utilizando antagonistas muestran que al menos un subtipo

de receptor α_1 y al menos un subtipo β se encuentran presentes, y es necesario determinar a nivel proteico qué subtipos se encuentran presentes.

La coexistencia de respuestas α_1 y β adrenérgicas ya se ha mostrado en cultivo primario de hepatocitos previamente [68, 98, 99]. Sin embargo, hay que tener presente que factores como el aislamiento de hepatocitos y la densidad celular en que son cultivados puede influir en el tipo de adrenoceptores que expresan. Por ejemplo, hepatocitos recién aislados de rata muestran actividad α_1, y no muestran respuesta β adrenérgica; pero 2 h después de aislados, las células comienzan a mostrar respuesta de tipo β, la cual se incrementa con el tiempo de cultivo [100]. En nuestro modelo las células fueron cultivadas toda la noche antes de realizar los experimentos descritos, porque aún después de 4 h de cultivo, muchas células no se habían adherido completamente a la caja de cultivo.

La transición de la respuesta α_1 a β depende de la densidad de cultivo celular, y se puede inhibir cultivando las células a alta densidad [101]. Sin embargo, la densidad que según los autores citados inhibe la transición de α_1 a β es de al menos $1.5x10^5$ células/cm^2, que equivale a 4 veces la densidad de $3.5x10^4$ células/cm^2 utilizada en nuestro modelo, y que como se mencionó, corresponde a aproximadamente 90% de confluencia. En nuestro modelo, cuando se cultivan las células a una densidad mayor, éstas no se adhieren apropiadamente a la caja de cultivo, y frecuentemente muchas se despegan espontáneamente después de haberse adherido. En resumen, los resultados muestran que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, se encuentran tanto los receptores α_1 como β.

9. CONCLUSIONES

La regeneración hepática depende de mecanismos moleculares complejos. En este proceso participan factores de crecimiento como el HGF y neurotransmisores como la NE. Al unirse a su receptor, se activan diversas cascadas de señalización que dan lugar a la activación de factores de transcripción que regulan respuestas celulares como la sobrevivencia y proliferación celular. Sin embargo, en personas con consumo crónico de etanol dicha capacidad regenerativa se encuentra disminuida. En este trabajo se estudió el efecto del AC sobre las vías de sobrevivencia y proliferación reguladas por la NE.

Se demostró que tanto ERK1/2 como PI3K se activan en respuesta a la NE, por medio de mecanismos en los que participan tanto los receptores adrenérgicos de tipo α_1 como β. Sin embargo, después de la exposición a acetaldehído, la fosforilación de dichas proteínas por se ve disminuida. Además, se encontró que este efecto inhibidor también afecta la fosforilación mediada por el HGF.

También se examinó el efecto del AC sobre la respuesta a la respuesta a la NE en 1) la activación del factor de transcripción NF-κB, que tiene un papel fundamental en la sobrevivencia y proliferación, y 2) la migración celular. La exposición a AC disminuyó temporalmente la activación de NF-κB y hubo una disminución notable en la capacidad migratoria de las células.

Por lo tanto, se examinó si el AC activa a fosfatasas de proteínas. Se obtuvieron resultados que muestran la activación de fosfatasas de tirosina y la fosfatasa PP2A, que desfosforila residuos de serina y treonina.

En conclusión, los resultados muestran que el acetaldehído inhibe las vías de señalización que regulan la proliferación y sobrevivencia celular de los hepatocitos. La información obtenida es relevante para la comprensión de los efectos negativos del consumo de etanol sobre la regeneración hepática.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Lockhart, R.D., G.F. Hamilton, and F.W. Fyfe, Anatomía humana. 1a ed. 1986, México D.F.: Nueva Editorial Interamericana. 695.
2. Fawcett, D.W., Tratado de histología. 12 ed. 1995, Madrid: Interamericana McGraw-Hill. 1044.
3. Desmet, V.J., Organizational Principles, in The liver. Biology and pathobiology, I.M. Arias, Editor. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: New York.
4. Kmiec, Z., Cooperation of liver cells in health and disease. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2001. **161**: p. III-XIII, 1-151.
5. Bioulac-Sage, P., B.L. Bail, and C. Balabaud, Liver and biliary-tract histology, in The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, J. Rodes, Editor. 2007, Wiley-Blackwell.
6. Taub, R., Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
7. McCuskey, R.S., Anatomy of efferent hepatic nerves. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 821-6.
8. Berthoud, H.R., Anatomy and function of sensory hepatic nerves. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 827-35.
9. Puschel, G.P., Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 854-67.
10. Stumpel, F., et al., Connexin 32 gap junctions enhance stimulation of glucose output by glucagon and noradrenaline in mouse liver. Hepatology, 1998. **28**(6): p. 1616-20.
11. Delalande, J.M., P.J. Milla, and A.J. Burns, Hepatic nervous system development. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 848-53.
12. Bylund, D.B., et al., International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 121-36.
13. Goldsmith, Z.G. and D.N. Dhanasekaran, G protein regulation of MAPK networks. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3122-42.
14. Piascik, M.T. and D.M. Perez, Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(2): p. 403-10.
15. Randle, L.E., et al., alpha(1)-Adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. Br J Pharmacol, 2008. **153**(4): p. 820-30.
16. Cruise, J.L., Alpha 1-adrenergic receptors in liver regeneration. Dig Dis Sci, 1991. **36**(4): p. 485-8.
17. Andre, C., et al., beta2-adrenergic receptor-selective agonist clenbuterol prevents Fas-induced liver apoptosis and death in mice. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 1): p. G647-54.
18. Cardani, R. and T. Zavanella, Immunohistochemical localization of beta 1-adrenergic receptors in the liver of male and female F344 rat. Histochem Cell Biol, 2001. **116**(5): p. 441-5.
19. Ogihara, M., Expression of alpha 2-receptor-mediated responses by insulin in primary culture of rat hepatocytes. Jpn J Pharmacol, 1995. **68**(1): p. 11-8.

20. Rossby, S.P. and L.E. Cornett, Steady state levels of hepatic alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors and gene transcripts during development of the male rat. J Cell Physiol, 1991. **147**(1): p. 55-61.
21. Van Ermen, A., et al., Influence of age on the beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat liver. Mol Pharmacol, 1992. **42**(4): p. 649-55.
22. Lieber, C.S., Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. Ann Med, 1994. **26**(5): p. 325-30.
23. Vasiliou, V., A. Pappa, and T. Estey, Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 279-99.
24. Nagy, L.E., Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 55-78.
25. Pritchard, M.T. and L.E. Nagy, Ethanol-induced liver injury: potential roles for egr-1. Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(11 Suppl): p. 146S-150S.
26. Walsh, K. and G. Alexander, Alcoholic liver disease. Postgrad Med J, 2000. **76**(895): p. 280-6.
27. Lluis, J.M., et al., Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. Gastroenterology, 2003. **124**(3): p. 708-24.
28. Zimmerman, B.T., et al., Mechanisms of acetaldehyde-mediated growth inhibition: delayed cell cycle progression and induction of apoptosis. Alcohol Clin Exp Res, 1995. **19**(2): p. 434-40.
29. Roman, J., et al., Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14684-90.
30. Gomez-Quiroz, L.E., et al., Differential modulation of interleukin 8 by interleukin 4 and interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 122-30.
31. Diehl, A.M., Recent events in alcoholic liver disease V. effects of ethanol on liver regeneration. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(1): p. G1-6.
32. Block, G.D., et al., Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. J Cell Biol, 1996. **132**(6): p. 1133-49.
33. Hasuike, S., et al., Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(11): p. 1753-61.
34. Coutant, A., et al., PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1079-88.
35. Nilssen, L.S., et al., Differential role of MAP kinases in stimulation of hepatocyte growth by EGF and G-protein-coupled receptor agonists. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(3): p. 588-92.
36. Cruise, J.L., K.A. Houck, and G.K. Michalopoulos, Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. Science, 1985. **227**(4688): p. 749-51.

37. Melien, O., et al., Ca2+-mediated activation of ERK in hepatocytes by norepinephrine and prostaglandin F2 alpha: role of calmodulin and Src kinases. BMC Cell Biol, 2002. **3**: p. 5.
38. Han, C., et al., Alpha-1 adrenergic receptor transactivates signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) through activation of Src and epidermal growth factor receptor (EGFR) in hepatocytes. J Cell Physiol, 2008. **216**(2): p. 486-97.
39. Fausto, N. and J.S. Campbell, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. Mech Dev, 2003. **120**(1): p. 117-30.
40. Lemire, J.M., N. Shiojiri, and N. Fausto, Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. Am J Pathol, 1991. **139**(3): p. 535-52.
41. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, Liver regeneration. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S45-53.
42. Matsumoto, K. and T. Nakamura, Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. Crit Rev Oncog, 1992. **3**(1-2): p. 27-54.
43. Tarla, M.R., et al., A molecular view of liver regeneration. Acta Cir Bras, 2006. **21 Suppl 1**: p. 58-62.
44. Morley, C.G. and V.L. Royse, Adrenergic agents as possible regulators of liver regeneration. Int J Biochem, 1981. **13**(9): p. 969-73.
45. Sakaguchi, T. and L. Liu, Hepatic branch vagotomy can block liver regeneration enhanced by ursodesoxycholic acid in 66% hepatectomized rats. Auton Neurosci, 2002. **99**(1): p. 54-7.
46. Ikeda, O., et al., Autonomic Regulation of Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Mice. J Surg Res, 2008.
47. Colle, I., et al., Transplanted liver: consequences of denervation for liver functions. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 924-31.
48. Cruise, J.L., et al., Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1189-94.
49. Cruise, J.L., et al., Regulation of hepatocyte growth: alpha-1 adrenergic receptor and ras p21 changes in liver regeneration. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 195-201.
50. Kimura, M. and M. Ogihara, Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(3): p. 1146-54.
51. Roux, P.P. and J. Blenis, ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
52. Pimienta, G. and J. Pascual, Canonical and alternative MAPK signaling. Cell Cycle, 2007. **6**(21): p. 2628-32.
53. Chen, Z., et al., MAP kinases. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
54. Pearson, G., et al., Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
55. Sun, H. and N.K. Tonks, The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 480-5.

56. Guenin, S., et al., PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: a mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 49-57.
57. Xing, Y., et al., Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. Cell, 2008. **133**(1): p. 154-63.
58. Chen, J., B.L. Martin, and D.L. Brautigan, Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. Science, 1992. **257**(5074): p. 1261-4.
59. Janssens, V. and J. Goris, Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
60. Papeleu, P., et al., Isolation of rat hepatocytes. Methods Mol Biol, 2006. **320**: p. 229-37.
61. He, J., S. de la Monte, and J.R. Wands, Acute ethanol exposure inhibits insulin signaling in the liver. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1791-800.
62. Kost, D.P., et al., Patterns of alpha-1-adrenergic receptor expression in regenerating and neoplastic hepatic tissue. Pathobiology, 1992. **60**(6): p. 303-8.
63. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, Liver regeneration. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
64. Sasaki, Y. and J.R. Wands, Ethanol impairs insulin receptor substrate-1 mediated signal transduction during rat liver regeneration. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(1): p. 403-9.
65. Clemens, D.L., Effects of ethanol on hepatic cellular replication and cell cycle progression. World J Gastroenterol, 2007. **13**(37): p. 4955-9.
66. Strubelt, O., et al., Hepatotoxicity of acetaldehyde in rats. Toxicol Lett, 1987. **39**(1): p. 77-84.
67. Leblais, V., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca2+ influx in cardiomyocytes. Circ Res, 2004. **95**(12): p. 1183-90.
68. Kimura, M., H. Okamoto, and M. Ogihara, Activation of mitogen-activated protein kinase by hepatocyte growth factor is stimulated by both alpha1- and beta2-adrenergic agonists in primary cultures of adult rat hepatocytes. J Pharmacol Sci, 2007. **103**(4): p. 398-407.
69. Gerhardt, C.C., et al., Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. Mol Pharmacol, 1999. **55**(2): p. 255-62.
70. Lee, Y.J., A.R. Aroor, and S.D. Shukla, Temporal activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase by acetaldehyde in rat hepatocytes and its loss after chronic ethanol exposure. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(3): p. 908-14.
71. Eriksson, C.J., Determination of hepatic acetaldehyde and its biphasic relationship to the ethanol concentration in rats. Adv Exp Med Biol, 1980. **132**: p. 459-67.
72. Nuutinen, H.U., et al., Blood acetaldehyde concentration gradient between hepatic and antecubital venous blood in ethanol-intoxicated alcoholics and controls. Eur J Clin Invest, 1984. **14**(4): p. 306-11.

73. Chen, J., et al., Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. Biochem J, 1998. **334 (Pt 3)**: p. 669-76.
74. Koteish, A., et al., Ethanol induces redox-sensitive cell-cycle inhibitors and inhibits liver regeneration after partial hepatectomy. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(11): p. 1710-8.
75. Hsu, M.K., et al., Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 375-82.
76. Clemens, D.L., et al., Relationship between acetaldehyde levels and cell survival in ethanol-metabolizing hepatoma cells. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1196-204.
77. Mapoles, J.E., et al., Acetaldehyde exposure causes growth inhibition in a Chinese hamster ovary cell line that expresses alcohol dehydrogenase. Alcohol Clin Exp Res, 1994. **18**(3): p. 632-9.
78. Holownia, A., et al., Acetaldehyde cytotoxicity in cultured rat astrocytes. Brain Res, 1999. **833**(2): p. 202-8.
79. Schuchmann, M. and P.R. Galle, Dead or alive -- NF-kappaB, the guardian which tips the balance. J Hepatol, 2002. **36**(6): p. 827-8.
80. Sancho-Bru, P., et al., Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(5): p. G877-84.
81. New, D.C. and Y.H. Wong, Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. J Mol Signal, 2007. **2**: p. 2.
82. Sun, S.C., S.B. Maggirwar, and E. Harhaj, Activation of NF-kappa B by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of I kappa B alpha at phosphatase 2A-sensitive sites. J Biol Chem, 1995. **270**(31): p. 18347-51.
83. Sun, C.K., et al., Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation. Carcinogenesis, 2008. **29**(11): p. 2096-105.
84. Sang, R.L., et al., alpha(1)-Adrenergic receptor stimulation of cell motility requires phospholipase D-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. Chem Biol Drug Des, 2007. **69**(4): p. 240-50.
85. Ghoghawala, S.Y., et al., Beta2-adrenergic receptor signaling mediates corneal epithelial wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(5): p. 1857-63.
86. Joseph, R.A., et al., Microtubule acetylation and stability may explain alcohol-induced alterations in hepatic protein trafficking. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1745-53.
87. Kannarkat, G.T., D.J. Tuma, and P.L. Tuma, Microtubules are more stable and more highly acetylated in ethanol-treated hepatic cells. J Hepatol, 2006. **44**(5): p. 963-70.
88. Hornberg, J.J., et al., Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. Febs J, 2005. **272**(1): p. 244-58.
89. Machide, M., et al., Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/hepatocyte growth factor receptor and LAR protein-tyrosine phosphatase. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8765-72.

90. Gonzalez-Espinosa, C., et al., Inverse alpha(1A) and alpha(1D) adrenoceptor mRNA expression during isolation of hepatocytes. Eur J Pharmacol, 1999. **384**(2-3): p. 231-7.
91. Garcia-Sainz, J.A., et al., Species heterogeneity of hepatic alpha 1-adrenoceptors: alpha 1A-, alpha 1B- and alpha 1C-subtypes. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **186**(2): p. 760-7.
92. Garcia-Sainz, J.A., et al., Guinea pig hepatocyte alpha 1A-adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. Eur J Pharmacol, 1992. **227**(3): p. 239-45.
93. Garcia-Sainz, J.A., et al., Characterization of the hepatic alpha 1B-adrenoceptors of rats, mice and hamsters. Life Sci, 1994. **54**(25): p. 1995-2003.
94. Garcia-Sainz, J.A., M.T. Romero-Avila, and M.E. Torres-Marquez, Characterization of the human liver alpha 1-adrenoceptors: predominance of the alpha 1A subtype. Eur J Pharmacol, 1995. **289**(1): p. 81-6.
95. Garcia-Sainz, J.A. and M.T. Romero-Avila, Characterization of the alpha 1A-adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using 5-[3H]methylurapidil. Mol Pharmacol, 1993. **44**(3): p. 589-94.
96. Garcia-Sainz, J.A., A. Garcia-Caballero, and C. Gonzalez-Espinosa, Characterization of the alpha 1-adrenoceptors of cat liver. Predominance of the alpha 1A-adrenergic subtype. Life Sci, 1996. **59**(3): p. 235-42.
97. Romanelli, A. and G. van de Werve, Activation of mitogen-activated protein kinase in freshly isolated rat hepatocytes by both a calcium- and a protein kinase C-dependent pathway. Metabolism, 1997. **46**(5): p. 548-55.
98. Kunos, G., et al., Inverse regulation of hepatic alpha 1B- and beta 2-adrenergic receptors. Cellular mechanisms and physiological implications. Ann N Y Acad Sci, 1995. **757**: p. 261-71.
99. Kimura, M. and M. Ogihara, Stimulation by transforming growth factor-alpha of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by alpha- and beta-adrenoceptor agonists. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(1): p. 171-80.
100. Nakamura, T., et al., Acquisition of a beta-adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture. J Biol Chem, 1983. **258**(15): p. 9283-9.
101. Kajiyama, Y. and M. Ui, Switching from alpha 1- to beta-subtypes in adrenergic response during primary culture of adult-rat hepatocytes as affected by the cell-to-cell interaction through plasma membranes. Biochem J, 1994. **303 (Pt 1)**: p. 313-21.