



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RECEPTORES NORADRENÉRGICOS EN LAS CÉLULAS ESTELARES
HEPÁTICAS.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA
Biol. Exp. Gloria Elizabeth Giono Chiang

DIRECTORA:
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

ASESORES:
Dra. Marina Macías Silva
Dr. Javier Velázquez Moctezuma

REALIZACIÓN:
Laboratorio de Fisiología Celular
UAM-IZTAPALAPA

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular
UNAM

MÉXICO, D. F.

25/AGOSTO/2008

COMITÉ TUTORIAL

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

ASESORA

Dra. Marina Macías Silva
Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
mmacias@ifc.unam.mx

ASESOR

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
jvm@xanum.uam.mx

Este trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa; y en el Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Autónoma de México.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, con número de registro: 309-0, pertenece al Posgrado en Biología Experimental, forma parte de los Programas de PIFOP-CONACyT, clave C/PFPN-2002-35-32.

Para la realización de la Maestría en Biología Experimental la Bióloga Experimental Gloria Elizabeth Giono Chiang contó con el apoyo del CONACYT mediante la beca con No. De registro 198246, la cual fue otorgada durante el periodo 2005-2007.

El trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto "Modulación de la respuesta fibrogénica por neurotransmisores adrenérgicos en hígado y páncreas como resultado del daño producido por etanol" apoyado por el CONACYT, con clave 45921.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Receptores Noradrenérgicos en las Células Estelares Hepáticas”, con fecha de examen oral el día 25 de Agosto del 2008.

JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Departamento de Biología de la
Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana –
Iztapalapa

jvm@xanum.uam.mx



SECRETARIA

Dra. Marina Macías Silva

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México
mmacias@ifc.unam.mx



VOCAL

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Departamento de Biología de la
Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana –
Iztapalapa

aja@xanum.uam.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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio, por sus consejos y por ser un ejemplo a seguir. Esperando corresponder algún día a la confianza, generosidad y apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Javier Velázquez Moctezuma por sus valiosos consejos y la ayuda incondicional que siempre me ha otorgado, pero sobre todo por su gran amistad.

A la Dra. Marina Macías Silva por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir su talento y por los consejos que me dio para este trabajo.

Al Dr. Adolfo García Sáinz por las valiosas aportaciones que realizo a este trabajo y la gran ayuda que me brindo al recibirme en su laboratorio.

A los miembros de mi comité evaluador: Dr. Javier Velásquez, Dra. Marina Macías, Dr. Luis Gómez y Dra. Anabel Jiménez por los valiosos comentarios a este trabajo.

A mis Padres Magdalena y Rafaél por apoyarme en todo momento de manera incondicional, por su comprensión y por su esfuerzo para que yo logre alcanzar mis metas. Por todo el asombroso amor que me dan y espero poder corresponder .

A mis hermanos Héctor, Josué y Ricardo, y mis familiares quienes con su cariño siempre me inspiran a seguir luchando para llegar más lejos, para que también alcancen sus metas y sueños.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología Celular de la UAMI: M en B.E. Blanca Farfán Labonne, M en B.E. Argelia Valdés Arzate, M en B.E. Carmen Escobar, B.E. Berna Uribe , B. Karina Martinez Flores, B.E. Cynthia Licon Retama, B.E. Jorge A. Domínguez Bautista, B.E. Carmen Santos, B.E. Anselmo Estefes, B.E. Natalia Nuño Lámberti, Dra. Leticia Bucio Ortiz, Dra. Verónica Souza Arroyo, Dra. Elizabeth Hernández Pérez, Dr. Luis Gómez Quiroz, Dra. Verónica López Valencia, por su ayuda en todo momento.

A mis compañeros de los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM que me brindaron consejos y me ayudaron en la realización de este proyecto.

A todos mis amigos Edith, Lety, Eglé, Marja, Blanca, Lucía, Ivo, Natalia, Irán y Roberto, por un fabuloso apoyo moral, por sus consejos en las buenas y malas, y por estar siempre presentes sin importar la distancia.

Al posgrado en Biología Experimental. Dra. Mina Koningsberg F., coordinadora del posgrado y al Dr. Pablo Damian Matzumura, ex-coordinador del posgrado por su excepcional apoyo.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| I. ABREVIATURAS | 9 |
| II. RESUMEN | 11 |
| III. INTRODUCCIÓN | 12 |
| III.1. Células Estelares Hepáticas (HSC) | 13 |
| III.1.1. Cultivo primario de HSC y línea celular CFSC2G | 15 |
| III.2. Sistema Nervioso (SN) | 17 |
| III.3. Norepinefrina (NE) | 18 |
| III.3.1. Receptores adrenérgicos | 19 |
| III.4. Inervación hepática: SNA y su relación con las HSC | 23 |
| III.5. Modelos de interacción entre la NE y diferentes tipos celulares | 26 |
| III.5.1. Células cardíacas | 27 |
| III.5.2. Hepatocitos | 30 |
| III.5.3. Células de la epidermis | 34 |
| III.5.4. Fibroblastos | 38 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 39 |
| V. OBJETIVOS | 40 |
| V.1. Objetivo general | 40 |
| V.2. Objetivos particulares | 40 |

| | | |
|-----------|--|----|
| VI. | HIPÓTESIS | 41 |
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| VII.1. | Modelo | 41 |
| VII.2. | Aislamiento celular | 41 |
| VII.3. | Cultivo celular | 42 |
| VII.4. | Diseño experimental | 43 |
| VII.5. | Medición de calcio intracelular | 43 |
| VII.6. | Determinación de segundos mensajeros: AMPc | 44 |
| VII.7. | Análisis estadístico | 45 |
| VIII. | RESULTADOS | 46 |
| VIII.1. | Cultivo primario de HSC de rata | 46 |
| VIII.2. | Medición de calcio intracelular | 48 |
| VIII.2.1. | Células de la línea CFSC2G | 48 |
| VIII.2.2. | Células de Cultivo Primario | 52 |
| VIII.3. | Determinación AMPc | 55 |
| VIII.3.1. | Células de Cultivo Primario | 55 |
| VIII.3.2. | Células de la línea CFSC2G | 58 |
| IX. | DISCUSIÓN | 59 |
| X. | CONCLUSIONES | 66 |
| XI. | REFERENCIAS | 67 |

I. ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| α BCRYS | α -B-cristalina |
| α SMA | actina α de músculo liso |
| ACh | acetilcolina |
| AMPC | adenosina 3, 5 -monofosfato cíclico |
| AP-1 | proteína activadora 1 |
| ATF-2 | factor activador de la transcripción 2 |
| BDNF | Factor de crecimiento derivado del cerebro |
| β KPA | cinasa del receptor adrenérgico β |
| Bra | bradicidina |
| Ca ²⁺ | calcio |
| CCl ₄ | tetracloruro de carbono |
| Cdk | cinasas dependientes de ciclinas |
| COMT | catecol-o-metiltransferasa |
| CRE | elementos respondedores a AMPc |
| DAG | diacilglicerol |
| Endo | endotelina |
| ERK1/ERK2 | cinasas relacionadas con la señalización extracelular |
| Fem | fentolamina |
| GFAP | Proteína glial fibrilar |
| HGF | factor de crecimiento de hepatocitos |
| HSC | células estelares hepáticas |
| IP ₃ | inositol 1,4,5-trifosfato |
| JNK | cinasa de Jun |
| LPA | ácido lisofosfatídico |
| MAO | monoamino oxidasa |
| MAPK | proteínas cinasas activadas por mitogeno |
| MEC | matriz extracelular |
| MF | miofibroblastos |

| | |
|---------------|--|
| N-CAM | Moléculas de adhesión neural |
| NE | norepinefrina |
| NF-kB | factor nuclear kappa B |
| NGF | Factor de crecimiento neural |
| NT-3 y -4 | Neurotrofinas tipo 3 y 4 |
| PBS | Buffer salino de fosfatos |
| PDEs | fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos |
| PI3K | fosfoinositol 3 cinasa |
| PI-PLC | fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos |
| PKA | cinasa A dependiente de AMPc |
| PKC | proteína cinasa C |
| PP2A | fosfatasa de serina/treonina |
| Praz | prazosina |
| Prop | propranolol |
| SAPK | proteína activada por estrés |
| SN | sistema nervioso |
| SNA | sistema nervioso autónomo |
| SNC | sistema nervioso central |
| SNP | sistema nervioso periférico |
| SNS | sistema nervioso simpático |
| SOD-1 | superóxido dismutasa |
| SYN | Sinaptofisina |
| TGF- α | factor de crecimiento transformante α |
| TGF- β | factor de crecimiento transformante β |
| TIMP-1 | inhibidor de la metaloproteínasa tisular |
| tTG | transglutaminasa tisular |

II. RESUMEN

Las células estelares hepáticas (HSC) juegan un papel muy importante en el desarrollo del daño y la regeneración del hígado. El entendimiento de su activación por causa de un daño hepático resulta de gran importancia para poder tener nuevas estrategias terapéuticas. Para ello un modelo comúnmente utilizado son las células estelares hepáticas de rata. Se tienen líneas celulares obtenidas de hígados cirróticos de rata que presentan características bien definidas, y con frecuencia se utiliza el cultivo primario, ya que las células durante el cultivo presentan las características de células activadas de manera espontánea.

Actualmente existen algunos trabajos que plantean que el sistema nervioso está jugando un papel importante en los procesos de daño y regeneración hepática. Por ello consideramos que es relevante saber si en el modelo de células estelares de rata, éstas son capaces de responder a los estímulos del sistema nervioso. Siendo la norepinefrina (NE) uno de los principales neurotransmisores, además de que se ha encontrado elevada en pacientes con cirrosis hepática, decidimos estudiar si las células pueden responder a este neurotransmisor.

El objetivo del trabajo fue determinar si las HSC de cultivo primario de rata y de la línea celular CFSC2G eran capaces de reconocer el estímulo de la NE. Las HSC fueron cultivadas y tratadas con Fura-2AM para poder observar el calcio intracelular y con isoproterenol 10 μ M por 5 min para realizar la medición de AMPc.

En experimentos realizados para medir la liberación de calcio intracelular ante el estímulo de la NE encontramos que las células estelares activadas en cultivo primario y de la línea celular CFSC2G no presentan una respuesta a NE, mientras que en la medición de la producción de AMPc sí encontramos una respuesta estadísticamente significativa.

Por ello concluimos que la respuesta a NE en las HSC de cultivo primario de rata y de la línea celular CFSC2G es mediada por los receptores β adrenérgicos, con una producción de AMPc como segundo mensajero.

III. INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano de mayor tamaño del cuerpo. Es responsable de muchas funciones complejas que incluyen: la formación de bilis, el almacenamiento y metabolismo de carbohidratos, la formación de cuerpos cetónicos, la reducción y conjugación de las hormonas esteroides suprarrenales y gonadales, la desintoxicación de sustancias y toxinas, la elaboración de proteínas plasmáticas incluyendo la albúmina, la inactivación de polipéptidos hormonales, la formación de urea, y otras funciones importantes en el metabolismo de los lípidos (Ganong 1992; Taub 2004).

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático, estructura cilíndrica de unos cuantos milímetros de longitud y de 0.8 a 2 mm de diámetro. En el humano hay aproximadamente entre 50 000 a 100 000 lobulillos (Guyton 1987). El hígado está constituido por diversos tipos celulares, entre ellos los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Kupffer, las células “pit”, las células dendríticas y las células estelares (HSC) (Kmiec 2001).

Los hepatocitos constituyen la mayor población celular del hígado y se les puede atribuir la mayoría de las funciones hepáticas, también son el blanco principal de los agentes que producen daño. Las células endoteliales son una barrera de filtración importante entre los hepatocitos y las macromoléculas y las células sanguíneas presentes en el lumen sinusoidal, previniendo su contacto directo y determinando el intercambio de sustancias. También participan en las funciones inmunológicas del hígado. Las células de Kupffer, que también se encuentran en el sinusoides, son macrófagos residentes del órgano, que se encargan de la desintoxicación de agentes exógenos y sustancias endógenas, además de participar en la respuesta inmune así como en la producción de citocinas. Las células “pit” son las células asesinas naturales residentes del hígado. Las células dendríticas capturan y procesan antígenos, migran a los órganos linfoides y secretan citocinas que inician la respuesta inmune (Senoo 2004). Las HSC están situadas en el espacio de Disse; toman, almacenan y liberan el 80% del total de retinoides del cuerpo, principalmente vitamina A, la cual se encuentra en forma de gotas lipídicas (Arias *et al* 2001; Taub 2004).

El hígado puede ser dañado por diversos agentes etiológicos como los virus de la hepatitis B y C, el alcohol, diversos fármacos, los metales como el cobre y el hierro, enfermedades autoinmunes, etc., que generan diversos problemas. El hígado responde con inflamación, necrosis o bien con apoptosis de las células dañadas, y, en el caso de ser un daño crónico, fibrosis, cirrosis y posibilidad de llegar al cáncer (Zern 1993). Como consecuencia del daño repetido, el hígado realiza un proceso de remodelación similar al observado en otros órganos. Además de la regeneración de los hepatocitos, las células residentes no parenquimatosas como las HSC se transdiferencian hacia miofibroblastos (MF) que generan matriz extracelular (MEC) requerida para la adecuada reparación del tejido. Al persistir el daño, se acumulan los MF y la MEC, principalmente colágena tipo I, que conduce a la fibrosis. Con base en el papel de las HSC en la fibrogénesis, la inhibición de la acumulación de MF es frecuentemente considerada como una estrategia racional para el tratamiento de las enfermedades crónicas del hígado (Magness *et al.* 2004; Pinzani *et al.* 2004).

III.1. CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS.

Estas células han recibido diversos nombres, como el nombre del investigador que las describió, es decir células Ito, hasta por su forma característica, como células estelares hepáticas. También se les conoce como células perisinusoidales, pericitos hepáticos, lipocitos o almacenadoras de grasa (Friedman 1996; Arias *et al.* 2001). Constituyen entre el 5 y el 8% de las células del hígado. Su principal función, es la de ser almacenadoras de Vitamina A, por lo que aproximadamente un 20.5% de su volumen celular está constituido por gotas lipídicas principalmente de palmitato de retinil (Friedman 1996).

El origen embriológico de las HSC aún no ha sido del todo esclarecido. Tradicionalmente se considera que su origen es a partir del mesénquima (Senoo 2004), mientras que con base en estudios de microscopía, se ha propuesto que su origen sea endodérmico, aunque también pudiera ser mesodérmico; recientemente se planteó una nueva propuesta que sugiere que el origen de estas células es neuro-ectodérmico por la expresión de proteínas asociadas con el sistema nervioso

central (Geerts 2004). Se ha observado que las HSC expresan marcadores neuroendocrinos como sinaptofisina, proteína glial fibrilar, etc., y tienen receptores para neurotransmisores; además expresan marcadores característicos de adipocitos mientras que las HSC activadas expresan marcadores mitogénicos como la α actina de músculo liso (α -SMA), por lo que se encuentra en consideración que su origen puede ser de células de la cresta neural (Cassiman *et al.* 2002; Friedman 2004; Bataller *et al.* 2005).

Los cambios clave que sufren las HSC durante el desarrollo de la fibrosis son que aumenta su número en el tejido dañado, debido a que proliferan y cambian el tipo de proteína de MEC que producen, así como la cantidad; incrementan la producción de colágena tipo I, III y IV, comparado con el hígado normal en donde casi no se reproducen y producen colágena tipo III, IV y VI (Safadi *et al.* 2002; Ramadori *et al.* 2004).

Estudios realizados en los 80's demostraron que las HSC, más que los hepatocitos, secretan grandes cantidades de colágena en el hígado dañado (Maher *et al.* 1988). Como consecuencia del daño, las HSC se activan hacia células tipo MF, con el incremento en su proliferación, secreción de citocinas, síntesis de colágena y contractilidad. Estudios realizados en años recientes indican que también otros tipos celulares tales como fibroblastos portales y MF vasculares, tienen potencial pro-fibrogénico en el hígado dañado (Magness *et al.* 2004; Rippe *et al.* 2004).

La activación de las HSC es un proceso que consta de dos etapas: la iniciación y la perpetuación. En las etapas iniciales de la activación de las HSC existen cambios en la expresión génica y el fenotipo, son predominantes los eventos regulatorios transcripcionales asociados con la activación y traslocación de moléculas de señalización, existe una inducción temprana de genes; todo esto puede deberse a diversas señales que captan las HSC, entre ellas la comunicación con sus células vecinas o algunos cambios químicos que detectan, indicándole la presencia de un daño hepático. Algunos autores señalan que posteriormente ocurre una etapa de transición, en la que la célula expresa componentes de ambos estadios: el inactivo y el activo, y sugieren que en este estadio las HSC aún pueden regresar a su condición normal. Finalmente se presenta un proceso de perpetuación que implica la regulación autócrina y parácrina de eventos claves como el incremento en la proliferación, la atracción a ciertos químicos, la capacidad contráctil, la

formación de fibrogénesis, la quimioatracción con otras células, la pérdida de retinol o gotas de lípidos que contenía y la degradación de ciertos componentes de la MEC (Friedman 1996; Friedman 2000; Safadi and Friedman 2002; Hernández 2004; Senoo 2004). La generación de MF también se considera un proceso con 3 cambios de estado: preinflamatorio, inflamatorio y termina en postinflamatorio, donde ya tenemos a las HSC activadas (Gressner 1998).

Los mecanismos de activación de las HSC son cruciales para el entendimiento de la fibrosis hepática y han sido ampliamente estudiados, ya que estas células activadas son las principales productoras de la MEC y tienen la capacidad de autoperpetuar el daño (Hernández 2004).

En las HSC activadas han encontrado que se activa el factor nuclear kappa B (NF- κ B) de manera constitutiva y que está involucrado en la sobre-regulación de genes proinflamatorios tales como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión teniendo un papel antiapoptótico de supervivencia en estas células. El mecanismo puede involucrar la inhibición de la cinasa de Jun (JNK) y de la proteína activadora 1 (AP-1), que a su vez modula el inhibidor de la metaloproteinasa tisular (TIMP-1), que también es modulado por las proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPK) como las cinasas relacionadas con la señalización extracelular (ERK1/ERK2). Con esto podemos observar que los mecanismos moleculares de supervivencia y muerte y sus interacciones en las HSC son muy complejos y desconocidos (Elsharkawy *et al.* 2005).

III.1.1. CULTIVO PRIMARIO DE HSC Y LÍNEA CELULAR CFSC2G.

El cultivo primario de HSC de rata y el uso de líneas celulares son herramientas muy útiles en el estudio de este tipo celular. Actualmente se conocen varios marcadores que se utilizan para diferenciar si las células se encuentran activadas o inactivadas (tabla A).

La línea celular CFSC2G, proveniente de hígado cirrótico de rata dañado con tetracloruro de carbono (CCl₄), presenta características principales de las HSC activadas, que más adelante se describen, después del segundo pasaje. Por ello resulta ser una herramienta útil en el estudio de este tipo celular (Greenwel *et al.* 1991). Estas células fueron donadas al laboratorio de la Dra. Concepción Gutiérrez por el Dr. M. Rojkind.

Dado que se han realizado múltiples trabajos para poder definir las características que se expresan en los varios tipos de HSC a continuación se presenta la tabla A que resume los resultados encontrados por los diversos autores (Greenwel *et al.* 1991; Cassiman *et al.* 2002; Cassiman and Roskams 2002; Ramadori and Saile 2004).

| Características | | HSC | | |
|-----------------|--|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| | | Cultivo primario de rata | | Línea celular CFSC2G |
| | | Primeros días (inactivadas) | Después de 7 días (activadas) | |
| | Gotas lipídicas | +++ | - | - |
| α-SMA | Actina α de músculo liso | + | +++ | ++ |
| N-CAM | Moléculas de adhesión neural | - | ++ | |
| GFAP | Proteína glial fibrilar | +/- | +++ | ++ |
| | Desmina | +/- | +++ | +++ |
| SYN | Elastina | | - | |
| | Sinaptofisina | - | + | |
| TGF-β1 | Factor de crecimiento transformante-β1 | +/- | + | + |
| | Fibronectina | | + | ++ |
| | Vimetina | | + | + |
| BDNF | Factor de crecimiento derivado del cerebro | + | + | |
| NGF | Factor de crecimiento neural | - | ++ | |
| αBCRYS | α-B-cristalina | + | ++ | |
| NT-3 y -4 | Neurotrofinas tipo 3 y 4 | - | + | |
| | Colágena tipo I | +/- | ++ | +++ |
| | Colágena tipo IV | ++ | - | - |

Tabla A.-Comparación entre HSC de cultivo primario de rata activadas e inactivadas y la línea celular CFSC2G.

III.2. SISTEMA NERVIOSO (SN).

Las subdivisiones estructurales básicas del sistema nervioso humano son el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El primero consta del cerebro y la médula espinal, el segundo de los nervios sensoriales y motores distribuidos en todo el cuerpo que envían información hacia y desde el cerebro y la médula espinal (Rains 2004). Los componentes sensoriales del sistema nervioso abastecen de información al sistema nervioso central acerca del ambiente interno y externo. El efecto integrado del procesamiento central es traducido finalmente en acciones por los componentes motores del sistema nervioso central y periférico (Purves *et al.* 2001).

El SNP está dividido en dos: el sistema nervioso somático que controla los movimientos musculares voluntarios; es independiente pero integrado al SNC que se encarga del procesamiento cognitivo previo a los movimientos voluntarios. El sistema nervioso autónomo (SNA) es la segunda división del SNP y controla los movimientos musculares involuntarios e inerva órganos internos, vasos sanguíneos y glándulas; éste se divide en simpático y parasimpático (Rains 2004), que difieren entre sí por el área desde donde emergen las fibras preganglionares, por la cercanía de esos ganglios con respecto al órgano hacia el cual se dirigen, por el neurotransmisor que regula a dicho órgano y por sus funciones (Gilman *et al.* 1998).

La división parasimpática, a su vez, presenta dos subdivisiones, la craneana y la sacra. La primera está constituida, por los pares craneanos III, VII, IX y X (Vago). La segunda por los nervios raquídeos que emergen de las regiones sacra y coccígea de la columna vertebral. En ambas subdivisiones, la primera neurona se ubica en el sistema nervioso central, es colinérgica y presenta un axón muy largo que inerva a la segunda neurona, la cual es como una interneurona, de axón

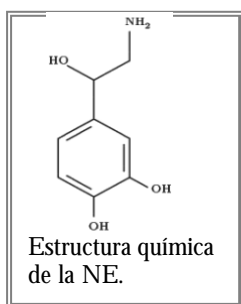
muy corto, ubicada en la pared misma del órgano visceral que inerva y libera como neurotransmisor acetilcolina (ACh) (Gilman and Winans 1998). La inervación parasimpática que llega al hígado deriva del nervio vago (Colle *et al.* 2004).

El sistema nervioso simpático (SNS) presenta fibras preganglionares que emergen del área toracolumbar. Los ganglios están, en comparación, muy lejanos de los órganos que inervan. La NE es su neurotransmisor. Su función, entre otras, es la de poner al organismo en la actitud de alerta o de agresión frente a una alarma (Gilman and Winans 1998).

III.3. NOREPINEFRINA (NE).

La NE al ser de los primeros neurotransmisores descubiertos y gracias a su estructura química ha podido ser estudiada a profundidad con cierta facilidad. Se ha logrado tener una gran cantidad de información sobre ella, como su síntesis, degradación y funciones principales (Iversen *et al.* 1981). Este neurotransmisor también es conocido como noradrenalina (Purves *et al.* 2001).

La NE es una catecolamina ya que esta formada por un grupo catecol y una amina. Su función principal es la comunicación entre el sistema nervioso central y el autónomo. También se le considera hormona o neurohormona ya que es producida y liberada por otras células que no forman sinapsis, como las células neurosecretoras y las de las glándulas endocrinas (Brown 1994).



and Iversen 1981).

La NE es sintetizada por las células nerviosas y liberada en la sinapsis celular. Se sintetiza a partir del aminoácido tirosina y es precursorada por una enzima llamada dopamina-β-hidroxilasa. Su liberación depende de la liberación de calcio en la neurona aferente. Su destrucción se lleva a cabo mediante recaptación, donde se ven implicadas las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-o-metiltransferasas (COMT) (Iversen

Se ha demostrado que la eliminación de NE del cerebro produce una disminución del impulso y la motivación, y se puede relacionar con la depresión. Además tiene que ver con los impulsos de ira y placer sexual. Un alto nivel de secreción de NE aumenta el estado de vigilia, incrementando el estado de alerta en el sujeto, así como también facilita la disponibilidad para actuar frente a un estímulo. Y, contrariamente, unos bajos niveles de ésta secreción causan un aumento en el sueño y, también, estos bajos niveles pueden ser una causa de la depresión (Purves *et al.* 2001).

Generalmente se considera que la respuesta que median los receptores a NE es antagónica entre los subtipos principales que más adelante se describen.

III.3.1. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.

Los receptores tienen dos funciones principales: el reconocimiento de transmisores específicos y la activación de efectores. Se pueden clasificar en dos tipos principales: ionotrópicos que abren los canales iónicos de manera directa (acción en milisegundos) y metabotrópicos que lo hacen de manera indirecta (acción en segundos o minutos) y se subclasifican en los receptores acoplados a proteínas G y los receptores de cinasas de tirosina (Kandel *et al.* 2001).

Se sabe que existe más de un tipo de receptores adrenérgicos, se presentan como principales los α y β adrenoreceptores que a su vez se subdividen como veremos más adelante. Existen antagonistas selectivos como la prazosina para los α -adrenoreceptores y el propranolol para los β -adrenoreceptores que nos permiten estudiar mejor sus acciones características. (Iversen and Iversen 1981).

La NE actúa exclusivamente mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G y canales iónicos (Purves *et al.* 2001). La respuesta mediada por canales iónicos se considera más rápida que la mediada por las proteínas G. La NE induce la acumulación de segundos mensajeros como el adenosina 3, 5-monofosfato cíclico (AMPC), el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), el diacilglicerol (DAG) y el movimiento de iones como el calcio (Ca²⁺), dependiendo del subtipo de receptor con el cual interactúa (Lodish *et al.* 2000). Las vías de los segundos mensajeros interaccionan entre sí, estas vías pueden generar una transmisión con consecuencias duraderas que pueden persistir durante días o semanas (Kandel *et al.* 2001).

Los receptores α adrenérgicos se subdividen en tipo 1 y 2. Resultados de estudios farmacológicos y fisiológicos han llevado a sugerir que existen múltiples subtipos de receptores α_1 y α_2 , análisis subsecuentes a la clonación sugieren que hay 3 subtipos de cada uno. El receptor α_{1D} ha sido vinculado con la activación de canales de Ca²⁺, mientras que el α_{1B} a la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PI-PLC) resultando en la liberación de DAG y de IP₃. Los 3 subtipos conocidos de α_2 están vinculados con la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa (Siegel 1999). Los receptores α adrenérgicos causan la contracción de células vasculares de músculo liso por lo que son importantes en el control de la presión sanguínea. El subtipo α_2 se conoce como autorreceptor ya que se encuentra presente en las células presinápticas de las terminales nerviosas, donde inhibe la propia liberación de NE por lo que representa un sistema de control por retroalimentación negativa (Iversen and Iversen 1981), y se ha encontrado en el tejido adiposo y el páncreas, mientras que el subtipo α_1 se ha visto en el músculo liso intestinal, corazón, glándulas salivares, tejido adiposo, glándulas sudoríparas y riñón (Purves *et al.* 2001). En la tabla B podemos ver las generalidades de los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgicos como son la farmacología y su estructura en el genoma humano. Los receptores α_1 están acoplados a proteínas G_q que estimulan la fosfolipasa C para generar IP₃ y DAG como segundos mensajeros, mientras que los α_2 se unen con G_i que inhibe la adenilato ciclasa (Lodish *et al.* 2000).

| | α_{1D} | α_{1B} | α_{1A} |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------|
| Farmacología: | | | |
| • Agonistas | Metoxamina, Fenilefrina, Cirazolina | | |
| • Antagonistas: | Prazosina, WB-4101, Fentolamina | | |
| ○ específicos | BMY7378, SKF105854 | | SNAP-5089, Indoramina |
| • Distribución | Aorta | Hígado, Vaso, células DDT ₁ , células MF-2 | Riñón |
| • Mecanismo efector | Canales de Ca ²⁺ | IP ₃ | ? |
| Estructura (clonación, humano): | | | |
| • número de aminoácidos | 560 | 515 | 466 |
| • número de cromosoma del gen humano | C2B | C5 | C8 |

Tabla B. - Subtipos de α_1 -adrenoreceptores.

Los receptores β adrenérgicos, que se encuentran en las células postsinápticas, estimulan la contracción de músculo cardíaco y causan la relajación de células de músculo liso del intestino y bronquios. El subtipo β_1 predomina en corazón, tejido adiposo, riñón y corteza cerebral, mientras que el subtipo β_2 en útero, páncreas, glándula salival, cerebelo, músculo liso traqueal, intestinal y de vasos sanguíneos, pulmón, y cerebros de aves y ranas. Por lo tanto estos dos tipos de receptores tienen diferente especificidad de agonismo y antagonismo de acuerdo al tipo celular sobre el que estén actuando (Iversen and Iversen 1981; Purves *et al.* 2001; Skeberdis 2004). Sin embargo, en algunos casos ambos subtipos coexisten en el mismo tejido, en ocasiones mediando la misma respuesta fisiológica. El subtipo β_3 tiene propiedades farmacológicas diferentes a los anteriores, se ha vinculado con obesidad hereditaria, control del metabolismo de los lípidos y desarrollo de la diabetes. Se expresa en el tejido adiposo café presente en roedores y humanos recién nacidos (Siegel 1999). Podemos ver las características generales de los subtipos de receptores β adrenérgicos en la tabla C.

| | b ₁ | b ₂ | b ₃ |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Farmacología: | | | |
| • Agonistas: | Isoproterenol | | |
| ○ específicos | Xamoterol, Dobutamina | Zinterol, Procaterol | BRL 37344, CGP 12177 |
| • Antagonistas: | Propranolol, Butoxamina, Dicloroisoprenalina | | |
| ○ específicos | Metoprolol, Alprenolol | ICI 118551 | SR 59230A |
| • Distribución | Corazón | Pulmón | Tejido adiposo |
| • Mecanismo efector | ?cAMP | ?cAMP | ?cAMP |
| • Proteína G | G _s | G _s , G _i | G _s , G _i |
| Estructura (clonación, humano): | | | |
| • número de aminoácidos | 477 | 410 | 402 |
| • número de cromosoma del gen humano | C10 | C5 | |
| • Intrones | No | No | Si |

Tabla C.- Subtipos de β -adrenoreceptores.

Los receptores β_1 adrenérgicos se encargan de la movilización de ácidos grasos de tejido adiposo, la fuerza de contracción de miocitos y la estimulación cardiaca; su estimulación crónica produce hipertrofia y apoptosis de los miocitos. Los β_2 regulan la broncodilatación, vasopresión, la inhibición de la contracción uterina y la glucogenólisis, y promueven la sobrevivencia de los miocitos. Los β_3 regulan la lipólisis (Siegel 1999; Richter *et al.* 2008). De cualquier forma los tres subtipos se encuentran presentes en el corazón humano en proporciones no estimadas, y dependiendo del estado patofisiológico y la edad, la densidad del subtipo β_1 se reduce, y en ocasiones también el subtipo β_2 , mientras que el β_3 aumenta. Esto puede ser debido a que los dos primeros subtipos se fosforilan mediante la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA) y la cinasa del receptor adrenérgico β (β ARK), mientras que el tercero no (Skeberdis 2004).

Los receptores β adrenérgicos estimulan la síntesis de AMPc como segundo mensajero, resultando en la activación de PKA (Siegel 1999; Lodish *et al.* 2000). Uno de los mecanismos emergentes para la especificidad de la señalización de los receptores β_1 y β_2 acoplados a proteína G es la degradación del AMPc a través de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) (Conti *et al.* 2007).

La mayoría de los autores concuerdan en que el subtipo β_2 es el receptor β adrenérgico que predomina en el hígado en las diversas cepas de ratas. En las ratas Wistar el número de receptores β adrenérgicos en la superficie de hepatocitos intactos aislados se demostró que es mayor de tres veces en hembras de 3 a 5 meses de edad que en machos (Cardani *et al.* 2001). Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que en ratones de la cepa CD1, la respuesta desplegada por NE en el hígado y en hepatocitos está mediada por receptores β adrenérgicos (Licona-Retama *et al.* 2007).

III.4 INERVACIÓN HEPÁTICA: SNA Y SU RELACIÓN CON LAS HSC.

El hígado humano posee un amplio suministro de nervios autónomos que se originan en el hipotálamo y entran al órgano con la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. Entre los mamíferos, el humano presenta la más elevada densidad de nervios intralobulares (Uyama *et al.* 2004). Las terminales de los nervios sensores están presentes en la cápsula hepática, vena central y conducto biliar, estos se encargan de registrar información de nocirreceptores, osmo y barorreceptores, así como receptores iónicos y metabólicos (Colle *et al.* 2004).

Poco se ha estudiado sobre la relación entre el hígado y el SNA. Se conoce más sobre la participación en la regulación fisiológica de las funciones y se ha comenzado a considerar que el sistema nervioso posee la capacidad de influir en las disfunciones hepáticas (Shimazu 1996). Por otro lado, también se ha visto que la denervación hepática (como en el caso de los transplantes) tiene muchas consecuencias en la microcirculación, proporción del flujo de sangre arterial y

portal, presión sanguínea, regulación de la glicemia y conducta digestiva, entre otros (Colle *et al.* 2004).

Se ha reportado que la NE afecta el metabolismo de la glucosa en los hepatocitos a través de su receptor α_1 -adrenérgico (Uyama *et al.* 2004). También que en ratas con hiperactividad del sistema nervioso simpático tratadas con CCl_4 se ve disminuida la apoptosis hepatocelular inducida por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), promoviendo la cirrosis en el animal (Hamasaki *et al.* 2001). En este modelo también encontraron que el CCl_4 incrementa la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica y la lipoperoxidación, pero disminuye la actividad de la superóxido dismutasa con lo que el daño hepático es más severo que en las ratas normales, por esto se considera que el sistema nervioso puede exacerbar el daño hepático (Hsu 1995).

En el trasplante hepático las concentraciones de NE disminuyen, aunque no se presentan efectos deletéreos en la secreción de bilis, regeneración o flujo sanguíneo y los efectos negativos conocidos son la resistencia a la insulina, hiperglicemia postprandial, incremento en la toma calórica, debido al cambio en el comportamiento de ingestión, y estimulación reducida de células progenitoras hepáticas en el canal de Hering (Colle *et al.* 2004). Caso contrario es en el consumo excesivo de alcohol, además del daño hepático que ocasiona, también puede inducir cambios transitorios en la actividad nerviosa; por ejemplo en pacientes cirróticos, la NE circulante se encuentra elevada y llega a valores parecidos a los de individuos que presentan infarto al miocardio, una enfermedad isquémica cardíaca (Falk-Symposium 1998).

En el hígado y el plasma de pacientes cirróticos se ha reportado una mayor presencia de NE que en el de personas con fibrosis (Acosta *et al.* 2000). Al encontrar una correlación entre el número de nervios colinérgicos y los fibroblastos en el hígado cirrótico se ha sugerido que la actividad parasimpática pudiera promover la síntesis de colágena y estar participando en el proceso de reparación del hígado (Shimazu 1996). Kiba (2002) plantea la idea de que sea el sistema nervioso central, mediante el sistema nervioso autónomo, quien regule la regeneración hepática y, recientemente Oben (2004) plantea que el sistema nervioso simpático posiblemente juega un papel en la regulación de la reparación hepática.

El grupo de Jude Oben ha realizado trabajos de investigación que los ha conducido a considerar que la fibrosis hepática podría desencadenarse por neurotransmisores del sistema nervioso autónomo, y han encontrado que las HSC producen y responden ante estos neurotransmisores del SNS promoviendo la fibrosis hepática. Las HSC expresan adrenoceptores, enzimas biosintéticas de catecolaminas, liberan noradrenalina y su crecimiento es inhibido con antagonistas de los adrenoceptores (Oben *et al.* 2003). Además demostraron que la NE induce la fibrogénesis hepática usando como modelo ratones deficientes en leptina (ob/ob) y con niveles reducidos de NE, ya que al administrarle este neurotransmisor se incrementa la fibrosis. Asimismo presentan que el daño está relacionado con el incremento de la actividad adrenérgica y que requiere NE para modular el fenotipo de las HSC, además que el mecanismo tiene componentes separados ya que con el neuropéptido Y, que es un agonista del receptor de la NE, sólo se induce la proliferación celular, mientras que la NE promueve la proliferación celular y la expresión del gen de colágena en las HSC, indicando que ambos procesos son independientes. Esto sugiere que la interrupción de neurotransmisores del SNS puede ser útil en el control de la respuesta al daño hepático que lleva a fibrosis (Oben *et al.* 2003; Oben *et al.* 2004).

Dubuisson *et al.* (2002) observaron que la destrucción de fibras noradrenérgicas disminuye la fibrosis en ratas tratadas con CCl₄ y que el tratamiento con prazosina, un antagonista α -adrenérgico, en el mismo modelo también disminuye el desarrollo de la fibrosis por lo que proponen que la inhibición de la fibrogénesis del hígado puede darse por antagonistas noradrenérgicos o la destrucción de fibras adrenérgicas, inhibiendo la proliferación de las HSC y la producción de colágena de estas células activadas.

En el grupo de Cassiman (2001; 2002) estudiaron los receptores de neurotrofinas en el tejido, concluyendo que la expresión de las neurotrofinas y de sus receptores está relacionada con la remodelación del tejido. También realizaron trabajos en la fibrosis avanzada y en la cirrosis en donde sugiere que existe un cambio en las HSC ya que identifican tres distintos MF parecidos a mesénquima en la subpoblación del hígado.

Sancho-Bru y sus colaboradores (2006) investigaron sobre la NE en HSC humanas encontrando que induce la contracción celular y acciones proinflamatorias. Esto es principalmente mediado por los receptores α_1 adrenérgicos, que se encuentran sobreexpresados en el hígado

fibrótico humano, aunque los receptores β adrenérgicos también modulan algunos de los efectos. La NE tiene efectos en la concentración de Ca^{2+} intracelular presentándose numerosos picos; estimula vías de señalización intracelulares implicadas en la patogénesis de la inflamación y fibrosis hepática que incluyen NF- κ B, JNK/AP-1 y ERK. A pesar de esto no se encontraron efectos fibrogénicos directos sobre la expresión de colágena, lo cual puede deberse a que se usaron pasajes completamente activados de HSC que sobreexpresan la proteína y comúnmente los agonistas fibrogénicos fallan en incrementar esta expresión.

III.5. MODELOS DE INTERACCIÓN ENTRE LA NE Y DIFERENTES TIPOS CELULARES.

Como pudimos observar en el apartado anterior, no existe mucha información sobre la relación que existe entre la NE y las HSC, no hay modelos de las vías de respuesta intracelular que puedan presentarse en estas células. Por ello los modelos que se han estudiado en otros tipos celulares, que podrían presentar semejanzas con las HSC, donde describen la acción de la NE pueden resultar útiles al tratar de imaginar lo que pudiera estar sucediendo en las HSC. Estos modelos resultan interesantes por las diversas respuestas que tienen, por sus propias diferencias, y por que pueden darnos un indicio de qué podríamos buscar más adelante al intentar caracterizar la ruta de señalización de la NE en las HSC.

Podremos ver al comparar los siguientes tipos celulares diferentes a HSC que a pesar de que existen rutas “canónicas” de transducción de señales para NE, estas pueden presentar diferencias dependiendo del tipo celular, se puede presentar entrecruzamiento de las rutas por ejemplo: la activación de Ca^{2+} intracelular que puede estarse presentando también por la activación de los receptores β -adrenérgicos, y no solo mediante los receptores α -adrenérgicos, lo que se debe tener en cuenta al realizar la medición de Ca^{2+} intracelular.

III.5.1.CÉLULAS CARDIACAS.

La fibrosis cardiaca resulta de la proliferación de fibroblastos intersticiales y el incremento concomitante en la síntesis de componentes de la MEC y usualmente presenta complicaciones por la hipertrofia cardiaca (Akiyama-Uchida *et al.* 2002). Ya que las HSC son células tipo MF, como modelo son parecidas a las que estudian en estos problemas cardiacos.

Utilizando miocitos ventriculares de rata adulta Amin *et al* (2001) encontraron que la NE incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno e induce el RNAm de superóxido dismutasa (SOD-1), que tiene un papel importante en el crecimiento hipertrófico de los miocitos cardiacos en respuesta a receptores α_1 adrenérgicos.

En un estudio realizado en fibroblastos cardiacos primarios de rata, Akiyama-Uchida y sus colaboradores (2002) encontraron que la NE incrementa marcadamente la fosforilación inducida por el TGF- β del factor activador de la transcripción 2 (ATF-2), indicando un sinergismo en la señalización del TGF- β con la NE, la cual mediante este mecanismo incrementa la fibrosis cardiaca, predominantemente por la vía de la MAPK p38.

Iwai-Kanai y Hasegawa (2004) trabajando con miocitos cardiacos, encuentran que la NE induce la apoptosis celular a través de su receptor β -adrenérgico acoplado a proteínas G, las cuales estimulan la actividad de adenilil ciclasa que nos lleva a la producción de AMPc, seguido de la activación de PKA. En cambio, la interacción de NE con el receptor α -adrenérgico antagoniza con el efecto del receptor β , su efecto antiapoptótico es mediado por la vía MEK1-ERK como se observa en la figura A tomada del artículo de Iwai-Kanai (2004) y modificada por una servidora. La adenilil ciclasa puede ser activada directamente por la forskolina, un diterpeno aislado de plantas que ha sido usado en estudios de regulación y purificación enzimática. Todas las formas de la enzima que han sido identificadas están adheridas a la membrana y son estimuladas por

proteínas G_s y forskolina, y presentan distintos patrones de expresión en el cerebro y tejido periférico, y son similares en estructura (Siegel 1999).

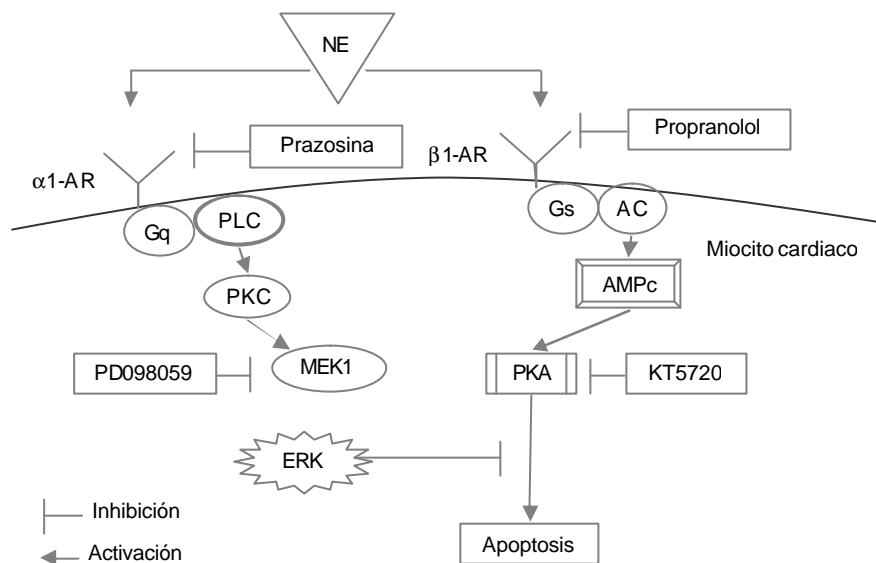


Figura A.- Agonistas α -adrenérgicos inhiben la apoptosis inducida por agonistas β -adrenérgicos en miocitos cardíacos.

Una actividad incrementada del receptor α_1 adrenérgico conduce a la preservación de las funciones cardíacas y limita el progreso del fallo cardíaco en una sobrecarga de presión, sin embargo una prolongada sobreactividad es dañina. En ratones con una marcada sobreexpresión del receptor se observó muerte prematura y desarrollo progresivo de fibrosis miocárdica (Chaulet *et al.* 2006).

En los miocitos cardíacos los subtipos de receptores predominantes son β_1 , β_2 y α_1 . Los α_1 se encuentran acoplados a la proteína G_q , los β_1 a G_s y los β_2 a G_s y G_i (Nikolov *et al.* 2007).

Los miocitos cardiacos de rata presentan un cambio de hiperplásicos a hipertróficos entre los días 3 y 4 después del nacimiento, durante la etapa fetal y los primeros días postnatales son activamente proliferativos, después se quedan arrestados en la fase G₁ y la mitosis es bloqueada irreversiblemente. Los receptores β adrenérgicos juegan un papel importante en la proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo temprano postnatal. La vía de p70 S6K se reduce al bloquear este receptor, aunque otras vías de señalización como p38 MAPK, ERK1/ERK2 y p44/p42 MAPK no se ven afectadas. Dosis crónicas subhipertensivas de NE o isoproterenol resultan en hipertrofia cardiaca (Tseng *et al.* 2001).

Los subtipos de receptores β adrenérgicos presentan efectos opuestos en los miocitos, por ejemplo el subtipo β_1 estimula el ritmo cardiaco y la fuerza de contracción, además su estimulación crónica produce hipertrofia y apoptosis, en cambio el subtipo β_2 tiene efectos cronotrópicos modestos y en estimulación crónica produce supervivencia celular. Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) juegan un papel importante en la especificidad de la señalización de AMPc al prevenir su libre difusión. Ambos subtipos de receptores forman complejos con PDEs pero esta interacción difiere en la variante, el modo y el efecto del complejo. Como podemos ver en la figura B los receptores β_1 forman un complejo con PDE4D de manera diferente a los receptores β_2 los cuales forman un complejo con β -arrestina y PDE, dependiendo de la variante reclutada así como de su estado de fosforilación se obtiene un mayor control en la acumulación de AMPc en el espacio submembranal. Por esto, las diferentes formas de interacción pueden proveer el punto de control de la especificidad de señal transmitida por el subtipo de receptor (Richter *et al.* 2008).

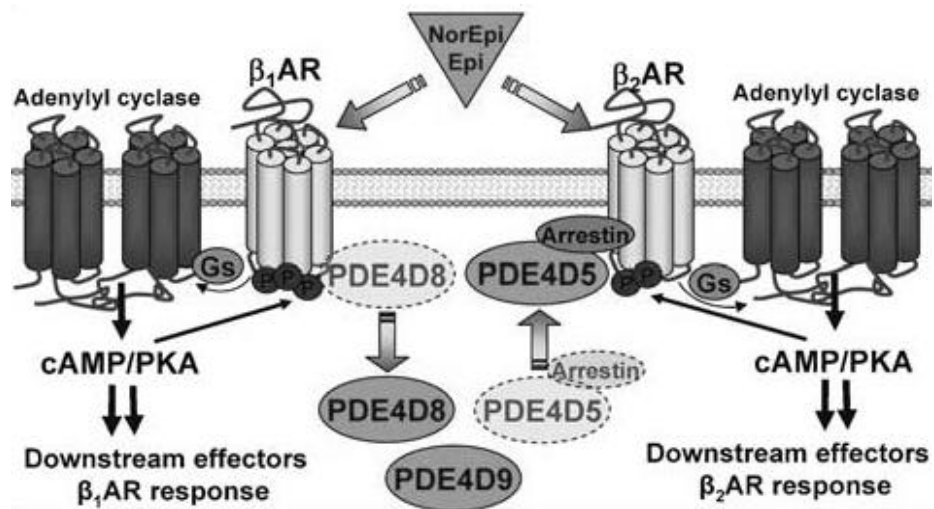


Figura B.- Esquema de las distintas formas de interacción entre PDE4 y los subtipos de receptores β adrenérgicos.

III.5.2. HEPATOCITOS.

Estudios en hepatocitos han demostrado la presencia de adrenoreceptores α y β . En cultivos primarios de hepatocitos de rata se ha examinado la influencia de estos receptores sobre las respuestas producidas por el factor de crecimiento transformante α (TGF- α). Este factor induce la síntesis de DNA y la proliferación de los hepatocitos, sus efectos son potenciados por agonistas específicos para los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos mientras que la mitogénesis que induce el TGF- α fue casi completamente inhibida por agonistas β_2 adrenérgicos. La acción de los receptores α_1 probablemente se encuentra mediada por el sistema PLC/DAG/PKC y/o la movilización de Ca^{2+} intracelular. Los efectos de los receptores α_2 son mediados por la reducción de AMPc. En contraste la modulación inhibitoria producida por los receptores β_2 se encuentran asociados al incremento de AMPc intracelular y el sistema de PKA sobre la vía de MAPK, esto lo podemos ver en la figura C (Kimura *et al* 1999) la cual ha sido modificada por su servidora.

En un estudio de hepatectomía parcial sugieren que la proliferación de los hepatocitos, en parte, se encuentra determinada por el balance en las señales que provienen de p42 MAPK, p38 SAPK (proteína activada por estrés), p46/54 SAPK y PKA. Este balance procede del cambio en las señales de catecolaminas de un receptor α_1 a β_2 adrenérgico. Después de la hepatectomía parcial se presenta un decremento en la señal α_1 adrenérgica reduciendo la activación de p42 MAPK, p38 SAPK y p46/54SAPK, por el contrario se encuentra un incremento en la activación mediada por los receptores β_2 adrenérgicos de p38 SAPK y p46/54 SAPK (Spector *et al.* 1997).

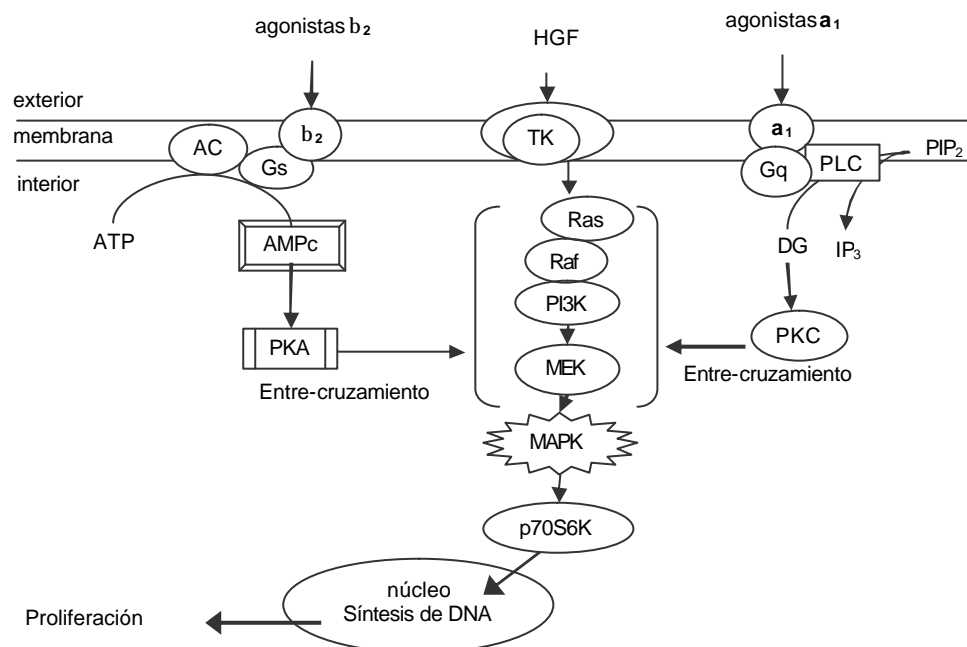


Figura C.- Posible modelo de entrecruzamiento entre la vía del receptor HGF/MAPK y la vía de los receptores adrenérgicos α_1 o β_2 .

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) estimula las MAPK en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta. Kimura y sus colaboradores (2007) han encontrado que agonistas de los α y β adrenoreceptores potencian la síntesis de DNA y la proliferación en hepatocitos tratados con HGF. Estudios en nuestro laboratorio han mostrado que la NE potencia el efecto del HGF

que se observa en la activación de las rutas de señalización que conducen a la reparación hepática, como son STAT3, y Erk. (Licona-Retama *et al.* 2007). En la figura C, tomada del artículo de Kimura *et al.* (2007) y modificada por su servidora, podemos ver el mecanismo que proponen. La MAPK p42 es rápidamente estimulada por HGF, esta activación se incrementa con el uso de metaproterenol que es un agonista β_2 adrenérgico, aunque su uso solo no presenta efectos significativos en la actividad de MAPK en los hepatocitos. El uso de análogos de AMPc también presenta este comportamiento, lo cual indica que la vía de señalización del receptor β_2 adrenérgico entrecruza con la vía de señalización del HGF potenciando el crecimiento hepático. De manera similar encontraron que el agonista α_1 adrenérgico fenilefrina potencia la activación de la MAPK por HGF mediante la vía de la proteína cinasa C (PKC). De cualquier forma los papeles de segundos mensajeros como IP_3 y DAG en el control de la síntesis de DNA y proliferación de los hepatocitos permanecen desconocidos.

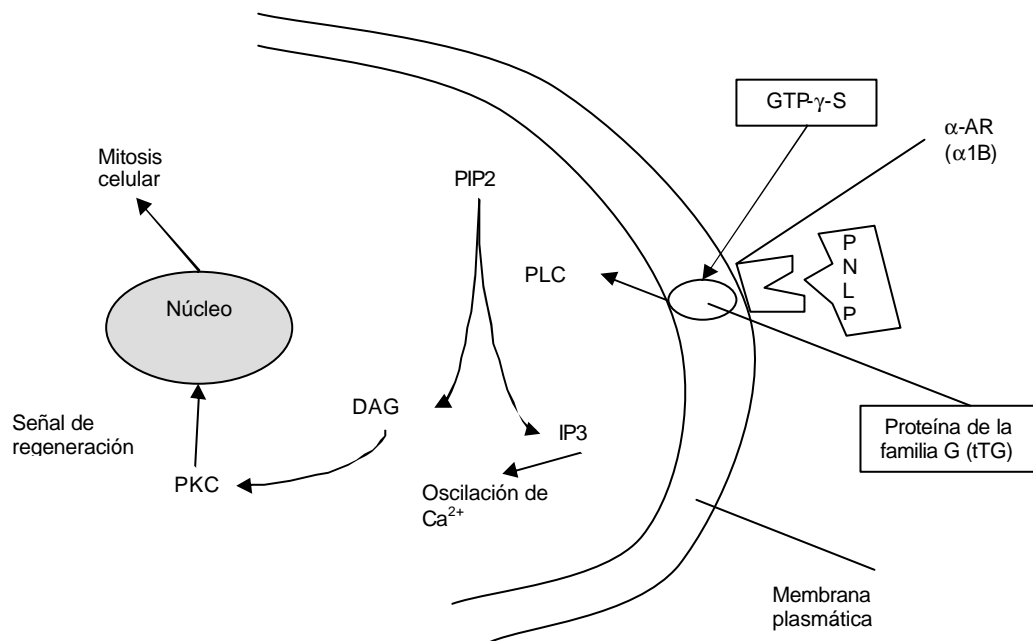


Figura D.- Esquema de la vía de señalización de proliferación celular y oscilación de calcio o cambios en el contenido de calcio citosólico inducidos por la activación del receptor adrenérgico α_1 .

La proliferación de los hepatocitos estimulada por el receptor α adrenérgico parece actuar, al menos en parte, mediante la proteína de activación transglutaminasa tisular (tTG) como lo podemos observar en la figura D (Wu *et al.* 2000) modificada por su servidora. Esta proteína además de su actividad de entrecruzamiento de proteínas de matriz extracelular mediante uniones γ -glutamil-lisina, también puede funcionar como proteína G con actividad de GTPasa representada como G_{a_h} . En este papel se encuentra asociada a la subunidad B de 50 kDa, de la cual se disocia al ser estimulado el receptor α_{1B} adrenérgico y activa la PLC, que a su vez produce DAG e IP_3 y estos mensajeros median la activación de PKC y la elevación de Ca^{2+} intracelular, mientras que los eventos subsecuentes incluyen la activación del ciclo celular y la proliferación. Es probable que diferentes isoformas de PLC activen distintas vías de señalización llevando a diferentes consecuencias funcionales para la célula (Wu *et al.* 2000).

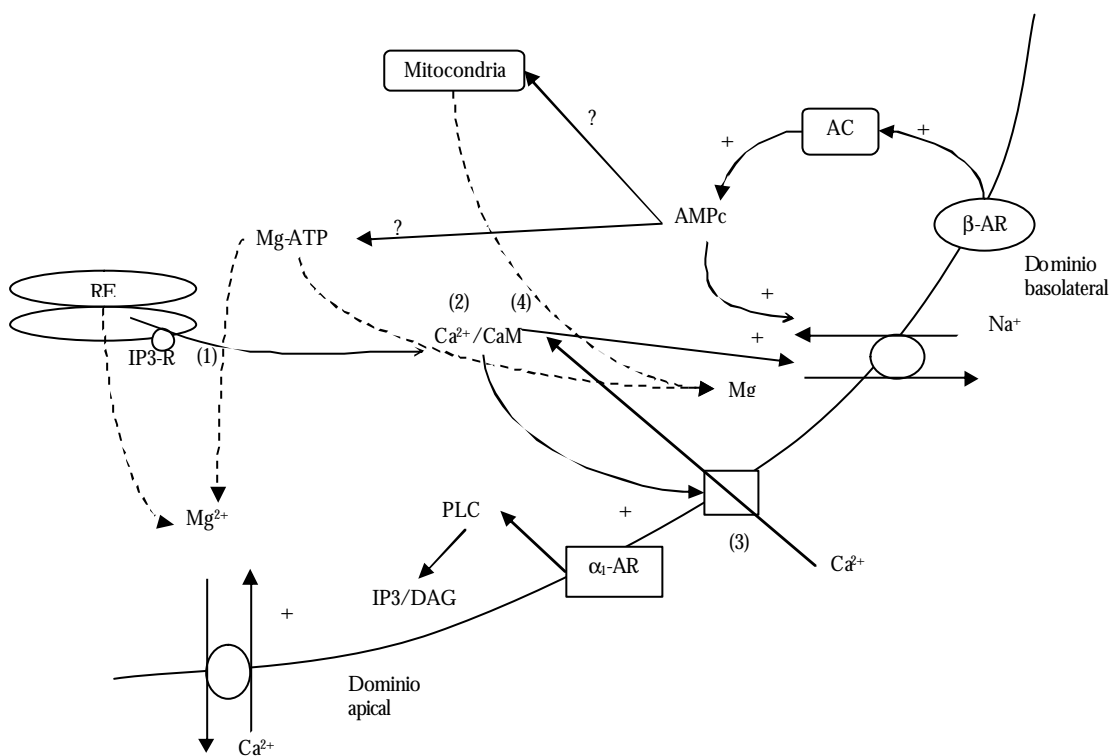


Figura E.- Diferentes mecanismos de extrusión de Mg^{2+} en células hepáticas activados por la estimulación de receptores adrenérgicos α_1 y β .

Otro modelo de respuesta a NE en hepatocitos ha sido propuesto por Fagan y colaboradores (2001), en donde relacionan la extrusión de magnesio con la respuesta al neurotransmisor como lo vemos en la figura E. En el caso del receptor α_1 , este activa a la PLC que a su vez genera DAG e IP_3 . El DAG activa a la PKC, mientras que el IP_3 interactúa con su receptor en el retículo endoplásmico donde provoca la liberación de Ca^{2+} , que a su vez incrementa la cantidad libre en citosol y estos cambios resultan en la extrusión de Mg^{2+} de los hepatocitos mediante la activación de vías dependientes e independientes de Na^+ . También presentan otro mecanismo mediado por los receptores β adrenérgicos, en donde el incremento de AMPc en el citosol activa la extrusión de Mg^{2+} . Las posibles reservas de donde puede estarse movilizando el Mg^{2+} después de la estimulación α_1 o β adrenérgica son la mitocondria, el retículo endoplásmico y los complejos citosólicos de ATP- Mg^{2+} .

III.5.3. CÉLULAS DE LA EPIDERMIS.

Los queratinocitos humanos son las células que se encargan de formar la epidermis y expresan sólo los receptores β_2 adrenérgicos, al igual que los fibroblastos dermales y los melanocitos (Pullar *et al.* 2006). Se han descrito muchas vías de señalización independientes de AMPc para estos receptores en diversos tipos celulares y también sucede en los queratinocitos. La señalización representada en la figura F, modificada por su servidora, es única para queratinocitos, en otros tipos celulares la activación con agonistas del receptor resulta en diferentes cascadas de señalización (Sivamani *et al.* 2007).

En estas células la activación del receptor adrenérgico β_2 da como resultado el decremento en la actividad de ERK, lo cual no se encuentra mediado por la vía de AMPc sino por su desfosforilación, que es realizada a través de la activación de la fosfatasa de serina/treonina (PP2A) por el receptor. Esto se encuentra en contradicción con la típica fosforilación de ERK y su activación, resultado de la activación del receptor en otros tipos celulares. La activación clásica mediante la vía de AMPc que también se ha descrito en los queratinocitos. La vía independiente de AMPc media el decremento en la migración de estas células resultado de la desfosforilación de ERK (Sivamani *et al.* 2007).

En los queratinocitos la activación del receptor β_2 adrenérgico disminuye la migración y la fosforilación de manera independiente de AMPc y de forma dependiente de PP2A disminuyendo la re-epitelialización de las heridas, pero mediante la vía dependiente de AMPc se regula la galvanotaxia de estas células, que al ser estimulada se pierde toda direccionalidad celular ante un campo eléctrico (Pullar *et al.* 2005).

El antagonismo de los receptores adrenérgicos promueve la re-epitelialización de las heridas al bloquear la respuesta en la epidermis, incrementando la habilidad de los queratinocitos de sanar la herida, incrementando la proporción de migración celular, el incremento en la fosforilación de ERK, incrementando la migración direccional mediada por el campo eléctrico, preservando una arquitectura pro-migratoria, manteniendo proporciones normales de proliferación y finalmente acelerando la re-epitelialización de la herida (Pullar *et al.* 2006).

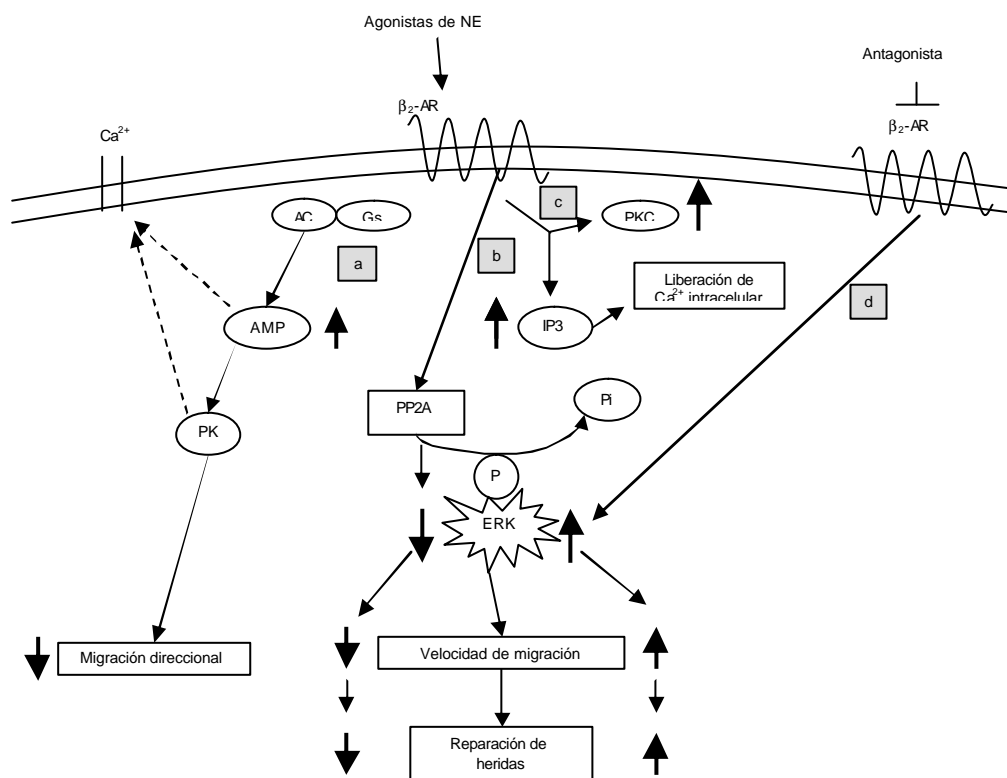


Figura F.- Vías de señalización del adrenoreceptor β_2 en queratinocitos.

Estudios realizados en queratinocitos y melanocitos han encontrado que las señales del receptor β_2 adrenérgico incrementan AMPc como segundo mensajero que a su vez lleva a la activación de la PKC y este incrementa la concentración de calcio intracelular. Se ha encontrado que después de exponer a los melanocitos a NE expresan receptores α_1 adrenérgicos indicando actividad transcripcional inducida por este neurotransmisor, activando la vía de señalización que inicia con IP_3 /DAG/PKC y lleva al incremento en la cantidad de dendritas y biosíntesis de melanina. En los melanocitos la vía activada por el receptor β_2 adrenérgico incrementa los niveles de AMPc/PI3K y respuestas de Rho-Rac que alteran la organización de actina, así como la densidad del receptor junto con un incremento en la melanogénesis. Por lo tanto, las catecolaminas mediante su receptor α_1 o β_2 adrenérgico pueden influenciar los procesos de pigmentación. Las vías activadas por los receptores adrenérgicos, al igual que las vías de receptores muscarínicos, parecen interactuar en los queratinocitos y melanocitos para equilibrar las señales estimulatorias e inhibitorias que regulan las funciones vitales de las células como lo observamos en la figura G (Grando *et al.* 2006)

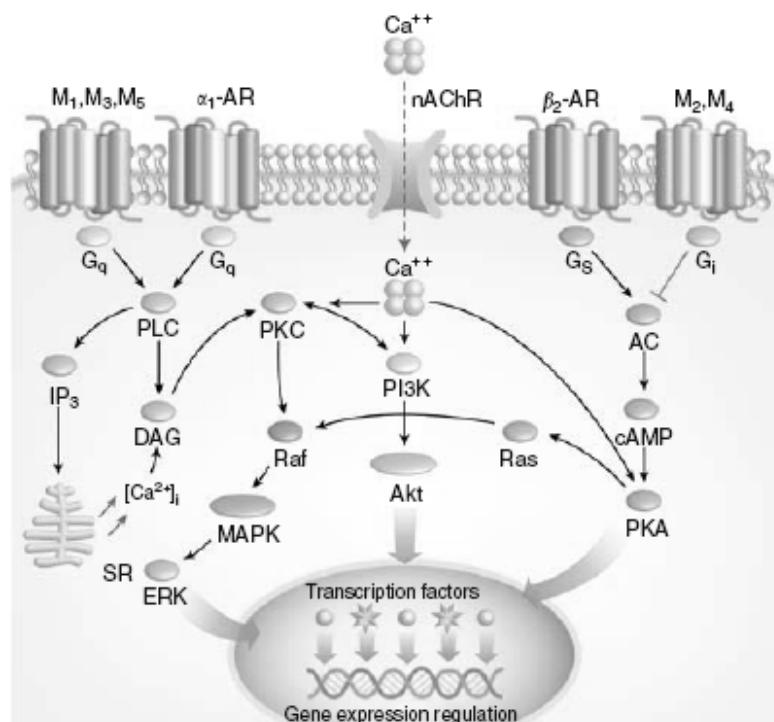


Figura G.-Entrecruzamiento entre vías de señalización adrenérgicas y colinérgicas mediado por el efecto inhibitorio o estimulatorio de segundos mensajeros comunes.

La activación del receptor β adrenérgico en distintos tipos celulares puede dar una respuesta muy diferente, por ello Pullar y colaboradores (2006) la estudiaron en los fibroblastos dermales encontrando en este caso que la respuesta fue pro-motogénica y pro-mitogénica. Esta respuesta resulta opuesta comparando los fibroblastos dermales con los queratinocitos. El receptor β adrenérgico incrementa la proliferación de los fibroblastos dermales y disminuye la contracción de los geles de colágena mediante la vía de señalización AMPc/PKA, también interviene en la migración de manera dependiente de Src y el subsecuente incremento de ERK mediante la transactivación del receptor a EGF. Por lo tanto, como podemos observar en la figura H modificada por su servidora, las divergentes vías de señalización que controlan la respuesta celular a los receptores β adrenérgicos en fibroblastos dermales son la vía dependiente de PKA que controla la proliferación, habilidad contráctil y conformación del citoesqueleto, mientras que la vía dependiente de Src regula la migración.

La activación del receptor en los queratinocitos resulta perjudicial para la re-epitelialización, y en los fibroblastos dermales puede contribuir con el retraso de la reparación de la herida, esto al trasladar la disminución en la contracción del gel a la contracción in vivo en donde no generaría la fuerza mecánica para iniciar la contracción y con ello la disminución del tamaño de la herida. El incremento en la proporción de fibroblastos debido a su migración y proliferación puede resultar en la acumulación anormal de grandes cantidades de fibroblastos llevando a una fibrosis y cicatrización indeseada (Pullar and Isseroff 2006).

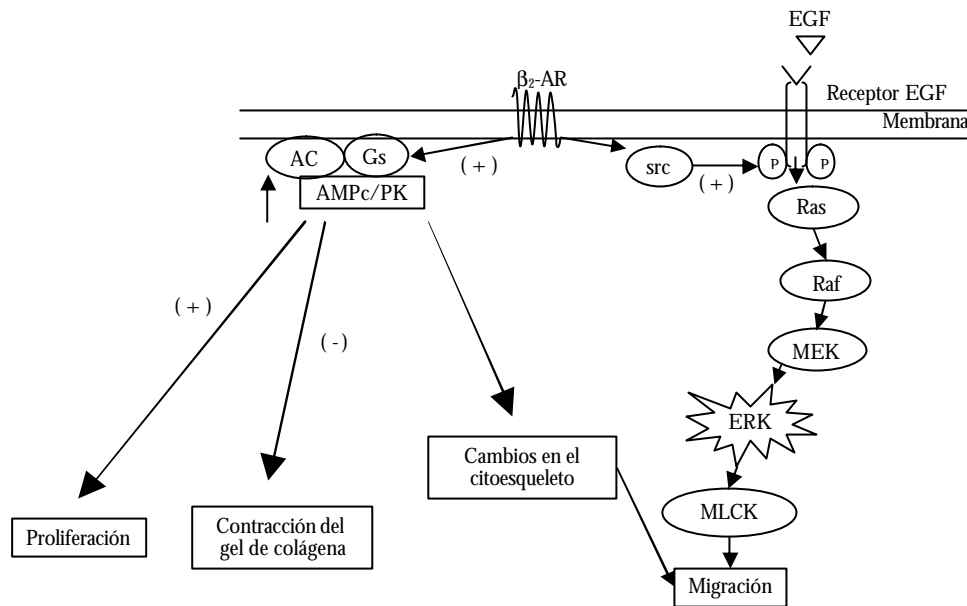


Figura H.-Representación simplificada de los divergentes mecanismos de señalización activados por el adrenoreceptor β_2 en fibroblastos dermales.

III.5.4 FIBROBLASTOS.

Los fibroblastos, como células del tejido conectivo, son capaces de transformarse en otros tipos celulares como células de músculo liso. Se ha reportado que los fibroblastos de rata expresan los tres subtipos de receptores α_1 adrenérgicos y su activación con NE estimula la migración y síntesis de proteínas, pero no la síntesis de DNA. Al estimular los receptores α_{1A} en células rat-1 se promueve el arresto del ciclo celular, sin causar apoptosis, incrementándose los niveles de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) y promotores de hipertrofia y diferenciación, presentándose un fenotipo con características de células de músculo liso por vías de señalización independientes de AMPc o EGF. Esto lleva a concluir que el arresto en el ciclo celular y la diferenciación son procesos cercanamente coordinados pero temporalmente separables (Saeed *et al.* 2004).

El receptor α_1 adrenérgico contribuye a la contracción del músculo liso vascular. En las células de músculo liso de aorta de rata genera crecimiento hipertrófico al activar las MAPK y promover la actividad de ERK y JNK (Piascik *et al.* 2001).

Con todos los modelos anteriores podemos darnos cuenta de que la respuesta a NE es muy variada dependiendo del tipo celular, y que definir el tipo de receptor que se expresa en las células nos ayuda mucho para poder comprender lo que está sucediendo en ellas e iniciar el proceso de estudio de la respuesta. Se ha estudiado poco el papel que juegan los neurotransmisores de origen simpático en las HSC, por lo que los resultados del presente proyecto contribuirán a sentar las bases para una mejor comprensión del proceso.

IV.JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha considerado que los neurotransmisores, como la NE, se encuentran involucrados en los procesos de daño y regeneración del hígado, así como de otros tejidos y órganos, y no solo juegan el papel de simple señalización del sistema nervioso para obtener una respuesta específica.

En el caso de la regeneración en diferentes tipos celulares se ha encontrado que dependiendo del tipo de receptor que está involucrado podemos tener una respuesta que potencie o que disminuya la duplicación celular o la capacidad de migración, por esto es muy importante caracterizar si las HSC de rata son capaces de responder a este neurotransmisor y que tipo de receptor se encuentra involucrado en este proceso.

Por otro lado algunos reportes indican el incremento de NE en pacientes cirróticos y como la cirrosis hepática ocupa el 4º lugar como causa general de muerte a nivel nacional resulta importante estudiar si las HSC, principales productoras de MEC, serían capaces de responder ante este estímulo.

Se tiene evidencia de que algunos neurotransmisores, como la NE podrían estar modulando la respuesta de las HSC ante una agresión. Se ha reportado en fibrosis cardiaca que la NE potencia el efecto producido por el TGF- β , citocina pro-fibrogénica, incrementando el

desarrollo de la fibrosis. Dado que las HSC juegan un papel relevante en el desarrollo de la fibrosis durante el daño hepático resulta esencial el estudiar si la presencia de NE puede afectar la respuesta de estas células ante la agresión, para ello es necesario saber si las HSC de rata tienen los receptores que les permitan responder a la NE.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

- Determinar si las células estelares hepáticas de rata son capaces de incrementar los niveles de segundos mensajeros en respuesta al estímulo de la norepinefrina.

V.2. Objetivos particulares.

- Determinar el tipo de receptor presente α_1 , α_2 o β adrenérgico, en el cultivo primario de HSC de rata y en la línea celular CFSC2G.
- Determinar el segundo mensajero que participa en la ruta de transducción de señales activada por el neurotransmisor en el cultivo primario de HSC de rata y en la línea celular CFSC2G.
- Determinar si existen diferencias entre los resultados encontrados en las células de la línea CFSC2G y el cultivo primario de HSC de rata.

VI. HIPÓTESIS

➤ Las Células Estelares Hepáticas de rata presentan al menos un tipo de receptor a norepinefrina el cual es capaz de incrementar la concentración de algún segundo mensajero como respuesta a su estimulación con el neurotransmisor.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. MODELO.

Se utilizaron HSC de cultivo primario obtenidas de rata macho Wistar de más de 500 g y HSC de la línea CFSC2G obtenidas a partir de hígado cirrótico de rata que fueron donadas por el Dr. Marcos Rojkind de la George Washington University, Washington, DC, USA..

VII.2. AISLAMIENTO CELULAR.

Las HSC se aislaron de acuerdo al método de Apte *et al*, (1998) modificado por la Dra. Marina Macías Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con cloroformo y colocadas en una charola para la disección. Se limpió con alcohol etílico al 70% el área abdominal, se retiró la piel, luego el tejido muscular y se movieron los intestinos dejando la cavidad abdominal libre y la vena porta visible. Se realizó una incisión en la vena y se introdujo la cánula. Se permitió el libre flujo de la solución salina (GBSS) sin Ca^{2+} . Se sacrificó la rata y se retiró el hígado colocándolo en el sistema de perfusión.

Después de lavar bien el hígado con el GBSS sin Ca^{2+} se perfundió con 25 ml de GBSS con Ca^{2+} . Se realizaron las digestiones enzimáticas primero con pronasa 0.7% por 10 min, se lavó con 30 ml de GBSS con Ca^{2+} , se continuó con colagenasa IV 0.0175% por 15 min. Posteriormente se colocó en una caja de petri con 10 ml de DNAsa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se cortó finamente. Se incubó con agitación a 37°C , 190 rpm, durante 15 min.

Luego se pasó la solución a tubos falcon de 50 ml y se procedió a las centrifugaciones. Primero se centrifugó a $82 \times g$ a 10°C por 1 min, se recuperó el sobrenadante y se repitió la centrifugación. Todos los sobrenadantes se centrifugaron a $1041 \times g$ a 10°C por 10 min. Se recuperó la capa superficial más clara después de desechar casi todo el sobrenadante. Se homogenizaron las células obtenidas y se colocaron sobre la solución de Nycodenz, llevándose a centrifugar a $48000 \times g$, 22°C por 45 min. Las HSC se recolectaron de la interfase y se resuspendieron con 20 ml de búfer de fosfatos salinos (PBS), se centrifugaron a $1041 \times g$, a 10°C por 7 min. El botón celular se resuspendió en PBS y se volvió a centrifugar a $426 \times g$ a 10°C durante 7 min.

Finalmente el botón celular se resuspendió en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino 10%, penicilina-estreptomicina 1%, Amphotericina B 0.1% y Sulfatrim 0.01% y se colocaron en cajas de Petri estéril a una concentración de 3.5×10^6 células por caja de 10 cm. El medio se cambió al día siguiente.

VII.3. CULTIVO CELULAR.

Las células de cultivo primario se sembraron en cajas de Petri de cultivo estériles en el medio DMEM utilizado en el aislamiento celular. El medio de cultivo se cambió durante la primera semana todos los días y en la segunda cada dos días. Las células no se resembraron, recién aisladas se colocaron directamente en las cajas en que permanecieron hasta su uso.

Las células de la línea CFSC2G se mantuvieron con medio MEM suplementado con suero de ternera 8%, antibiótico-antimicótico 1%, aminoácidos no esenciales 1% y glutamina 1% cambiándose cada tercer día y resembrándolas cada vez que llegaron a confluencia.

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5% CO₂ y 90% de humedad con una temperatura de 37° C. Las células de cultivo primario se emplearon entre los días 7 y 14 de cultivo ya que en este tiempo presentan marcadores de HSC activadas.

VII.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para los experimentos de calcio intracelular las HSC fueron tratadas con el indicador fluorescente para poder observar el Ca²⁺, y se leyó en un espectrofluorómetro adicionándole los diversos estímulos: NE 10µM, bradicidina 1µM, fentolamina 10µM, ácido lisofosfatídico (LPA) 1µM, vasopresina 1µM, propranolol 1µM, prazosina 1µM, endotelina 1µM tritón 10% y EGTA 0.5M.

En la medición de AMPc se realizó una curva de tiempo con forskolina 1µM a los 1, 2, 5, 10 min para obtener el punto con la mayor respuesta, después se realizó una prueba con NE 10µM a los 5 min y con pretratamiento por 1 min con propranolol 10µM. Finalmente se utilizó isoproterenol 10µM por 5 min debido a las complicaciones para obtener un mayor número de células estelares de cultivo primario.

VII.5. MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

Esta prueba nos permite observar la respuesta a NE midiendo la movilización del calcio intracelular, ya que los receptores adrenérgicos se encuentran acoplados a proteínas G y movilizan el calcio.

Se permitió que las células llegaran a 98% de confluencia, entonces se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio sin suero por 24 h. Después se volvieron a lavar para incubar por 1 h a 37°C con 4 ml de solución KHB (D-Dextrosa 10mM, Hepes 20 mM, BSA 0.05%, NaCl 120mM, KH₂PO₄ 10.55%, MgSO₄ 19.1%, KCl 4.75mM, pH 7.4) + 266 µl/100 ml CaCl₂ (7.85 %) + 40 mg ácido plurónico + 4 µl Fura-2AM (5 µM). Se realizaron 3 lavados con PBS y se trataron con 1 ml de tripsina para despegarlas por no más de 4 min. Se recuperaron las células en 10 ml de KHB y

se homogenizaron en tubos falcon de 15 ml. Se centrifugaron por 5 min a 1200 x g, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en la misma solución, repitiendo este proceso 2 veces más. Al final se agregó un volumen de 6 ml.

Para realizar la medición se introdujo en el espectrofluorómetro (Aminco-Bowman, serie 2) una celda de 2.5 ml de plástico con magneto con 2 ml de células, se inició la lectura del trazo con una λ de excitación de 340 y una λ de emisión a 510, se adicionaron las hormonas descritas en el diseño experimental, se agregaron 60 μ l de Tritón 100-X al 10% para medir la fluorescencia máxima y finalmente se adicionaron 40 μ l de EGTA 0.5M para medir la fluorescencia mínima. Las concentraciones de Ca^{2+} intracelular fueron calculadas usando el software de Aminco-Bowman.

VII.6. DETERMINACIÓN DE SEGUNDOS MENSAJEROS: AMPc.

Los receptores adrenérgicos se encuentran acoplados a proteínas G y los del tipo β activan el AMPc. La PKA es una proteína que se pega al AMPc, en los términos de este ensayo hay “dos tipos” de AMPc, “el frío” (la muestra) y el tritiado [^3H]. Este ensayo es de competencia, ya que se unirá a la PKA el AMPc que se encuentre en mayor concentración, por lo que habrá mayor cantidad de AMPc frío y por otro lado una menor del [^3H] y viceversa. El proceso consta de dos fases.

En la primera las placas de 6 pozos se lavaron 2 veces con PBS. Se dejaron en 0.5 ml de solución amortiguadora KHB-Glu. Se incubaron en agitación el tiempo del estímulo. A las cajas en agitación suave se les fue agregando: 10 μ l de Mix (3-isobutil-1-metil-xantina) 1×10^{-2} M, y se dejó unos 5 seg, luego 10 μ l de hormona estímulo como se indican en el diseño experimental durante 5 min. El estímulo terminó al agregar a cada pozo 50 μ l HCl 2N. Inmediatamente las placas se pasaron al agua en ebullición durante 2 min. Se enfriaron en hielo. Se agregó 15 μ l de NaH_2PO_4 1 M pH 6 a cada pozo. Después se neutralizaron con 50 μ l de NaOH 2 M Se

levantaron con gendarme y se homogenizaron con micropipeta para recuperar en tubos eppendorf. Se centrifugó 10 min a 1200 x g. En este paso se pudieron dejar a -20°C.

En la segunda parte se preparó una curva patrón con AMPc frío para poder calcular la cantidad de AMPc presente en las muestras y se realizó la reacción de PKA. En cada tubo eppendorf marcado como: curva (del 0 → 5 por triplicado) o muestra (triplicado), se pusieron: 30 µl de NaH₂PO₄ 500 mM a pH 6 40µl de muestra o curva patrón, 10 µl de AMPc [³H] (20 Ci/mmol), 10 µl de PKA y se agitaron en Vortex e incubaron en baño de hielo por 60 min. Se agregaron, pasados los 60 min, 0.5 ml de carbón activado a cada tubo. Se centrifugaron por 13 min a 1200 x g. Se recuperaron 450 µl del sobrenadante en viales. Se les agregó 2 ml de líquido de centelleo (TRITOSOL) y se determinaron por 1 min en el contador de centelleo.

VII.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se empleó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa NPSS 11.0. Se consideró para tener un nivel de significancia una $p \leq 0.05$. Esta prueba permite comparar el lote control contra los demás tratamientos, y, a su vez, los lotes experimentales entre ellos. Seguido de este análisis se realizó una prueba no paramétrica de Z para comparaciones múltiples de Kruskal Wallis con una probabilidad ≤ 0.05 (Daniel, 2002).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. CULTIVO PRIMARIO DE HSC DE RATA.

Se realizó la obtención de células estelares hepáticas de hígado de rata.

En la figura 1 se presentan las imágenes de las células a los 0, 1, 7 y 14 días de cultivo y con aumentos de 10X, 20X y 32X.

Podemos observar que las células recién aisladas y en el primer día de cultivo presentan gotas lipídicas grandes, cuyo contenido principal es palmitato de retinil, que ocupan la mayor parte del volumen celular. Conforme pasan los días van perdiendo estas vesículas. En el día 7, cuando ya presenta el fenotipo de HSC activadas, se observan prolongaciones citoplasmáticas que les permiten estar en contacto unas con otras y ya no es posible observar las gotas lipídicas. Finalmente al alcanzar la confluencia el día 14, las células ocupan todo el espacio superficial de la caja de petri, por lo que están estrechamente en contacto y resulta difícil diferenciar donde termina una y comienza la otra célula, ya han perdido completamente las gotas lipídicas y se ven bastante expandidas.

Estos cambios perceptibles microscópicamente concuerdan con la activación reportada en el cultivo primario por diversos autores (Greenwel *et al.* 1991; Apte *et al.* 1998; Gressner 1998; Friedman 1999; Cassiman and Roskams 2002; Safadi and Friedman 2002; Friedman 2004; Hernández 2004; Ramadori and Saile 2004; Senoo 2004). Las células mostraron microscópicamente un fenotipo fibroblastoide lo cual comprueba que se encuentran ya en un estado activado. Además, en el laboratorio de la Dra. Marina Macías se han realizado pruebas para confirmar la activación de las células a los 7 y 14 días de cultivo.

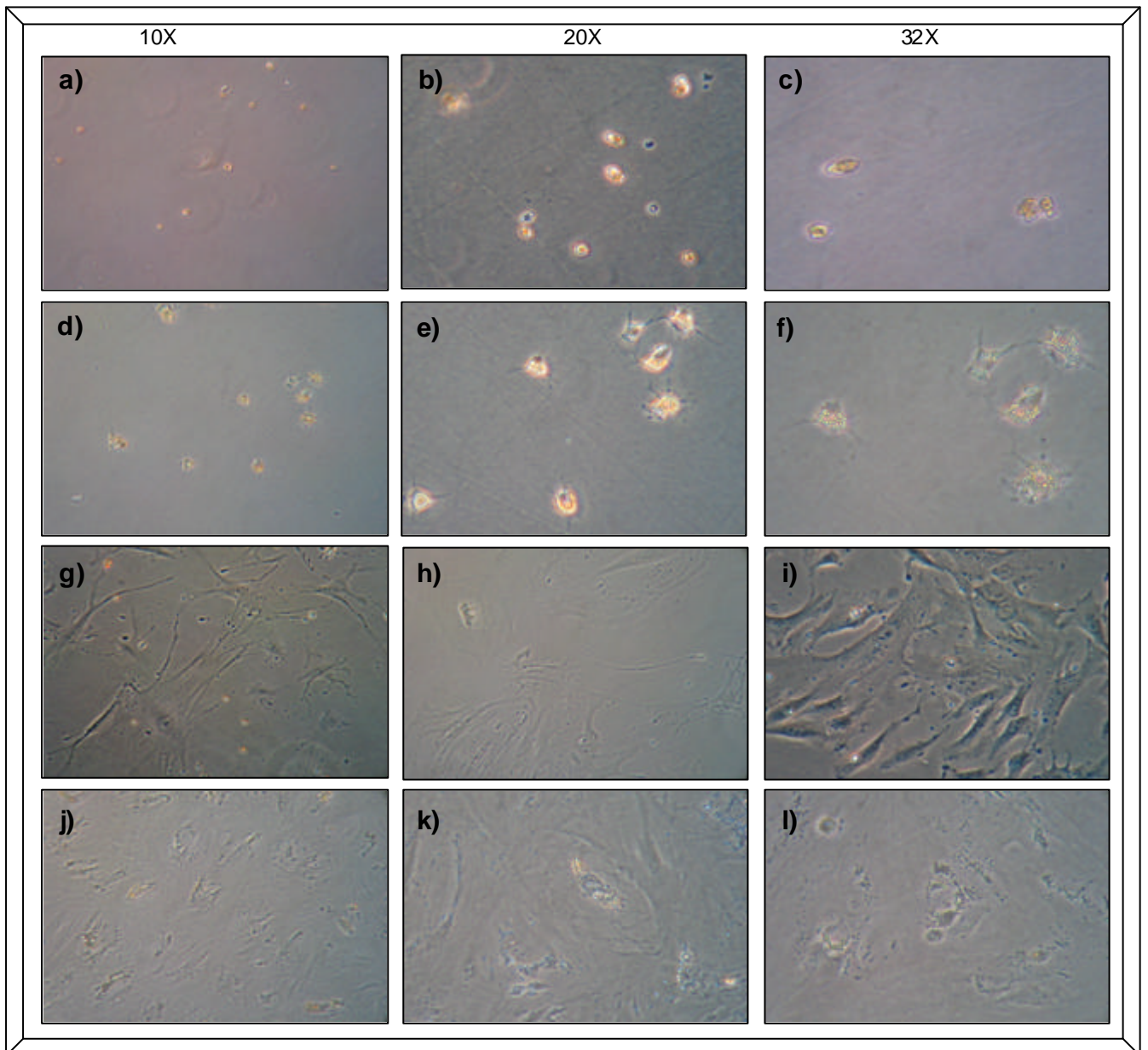


Figura 1.- Fotos de las células estelares hepáticas en cultivo primario recién aisladas a), b) y c) que presentan grandes concentraciones de gotas lipídicas por lo que son altamente refringentes, el primer día d), e) y f) en donde ya se han pegado a la caja y aún conservan las gotas que se observan claramente en todo su citoplasma, a los 7 días g), h) e i) que ya presentan muchas prolongaciones que les permiten estar en contacto entre las células y ya han perdido las gotas, y a confluencia el día 14 j), k) y l) donde se han expandido y ya no es posible distinguir claramente los bordes de las células pues se encuentran pegadas unas a otras y no presentan gotas lipídicas.

VIII.2. MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

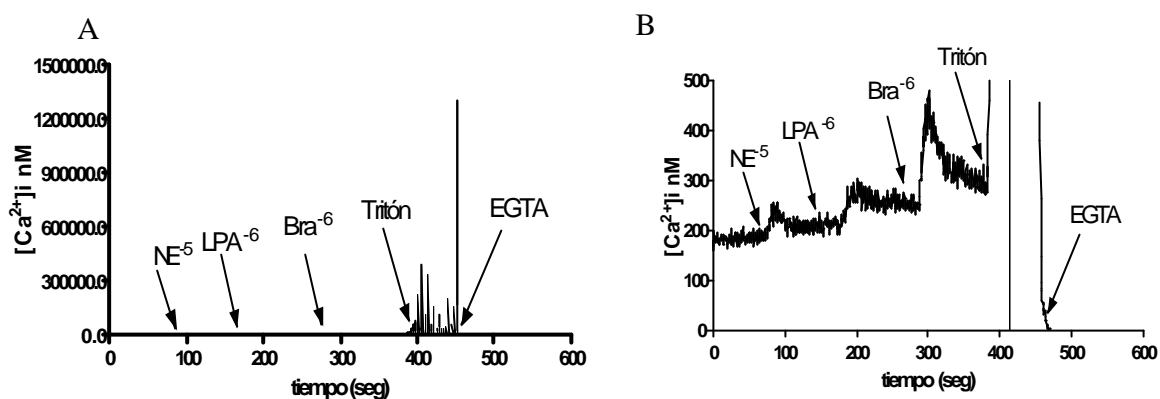
Se realizó la medición de calcio intracelular utilizando las células de la línea CFSC2G y células estelares de cultivo primario, para observar si las células eran capaces de dar una respuesta inducida por la NE.

VIII.2.1. CÉLULAS DE LA LÍNEA CFSC2G.

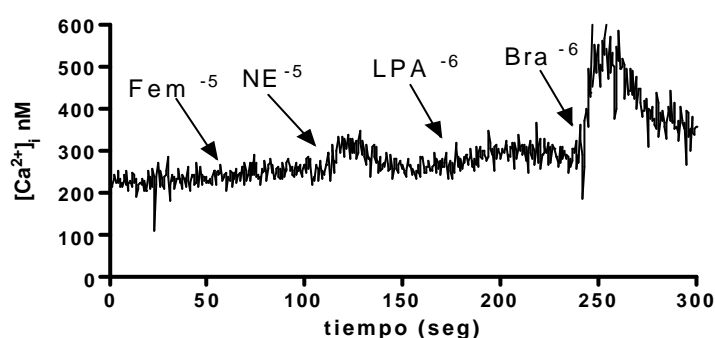
Las células de la línea CFSC2G cargaron el indicador fluorescente Fura 2AM, lo que se observa en la gráfica 1 (A), donde al utilizar tritón se obtiene una alta concentración de calcio, y con el uso de EGTA se abate. Y en la gráfica 1 (B) podemos ver la ampliación de la misma gráfica, donde se presenta el pico que se obtiene al estimular con NE 10 μM que es el menor a comparación de los diferentes estímulos probados y requiere un corto periodo de tiempo para presentarse este pico. Con bradicidina se obtiene la mayor respuesta de las células, por lo que se decidió utilizar como control positivo, mientras que presentan una baja respuesta a otros estímulos como LPA y vasopresina.

Para observar si el pico que se presentó al realizar las mediciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células estelares debido a NE era mediado por los receptores α adrenérgicos se utilizó el antagonista fentolamina. En la gráfica 2 se puede ver que se sigue manteniendo el pico después del pretratamiento con el antagonista a una concentración 10 μM , por lo que se descarta que pueda ser mediado por este receptor, además en la gráfica 3 podemos

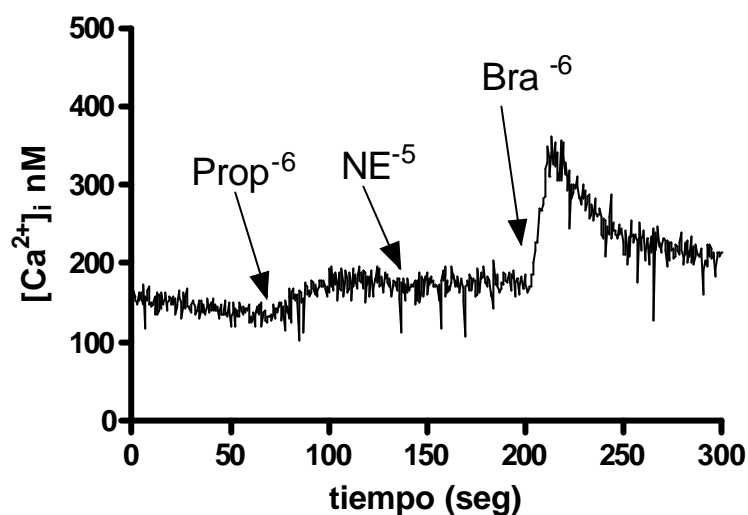
observar que al utilizar el antagonista β adrenérgico propranolol, antes de dar el estímulo con NE, se inhibe el pico. Esto resulta muy importante ya que concuerda con los antecedentes presentados en la introducción, que nos expresan que los receptores α adrenérgicos son los que estimulan la movilización de Ca^{2+} intracelular, mientras que los receptores β adrenérgicos no presentan esta respuesta o lo hacen de manera mínima.



Gráfica 1. Movilización de calcio intracelular en células estelares CFSC2G estimuladas con diferentes agentes. La gráfica B es un aumento de la otra. Las flechas indican el momento en que se adicionó el estímulo. Esta es una gráfica representativa de 5 experimentos. Podemos observar que el indicador fluorescente ha penetrado en las células ya que con tritón 10% obtenemos un valor elevado y con EGTA 0.5M se abate totalmente, y que la membrana celular no se encuentra muy maltratada por el procedimiento ya que es capaz de responder a diversos estímulos.



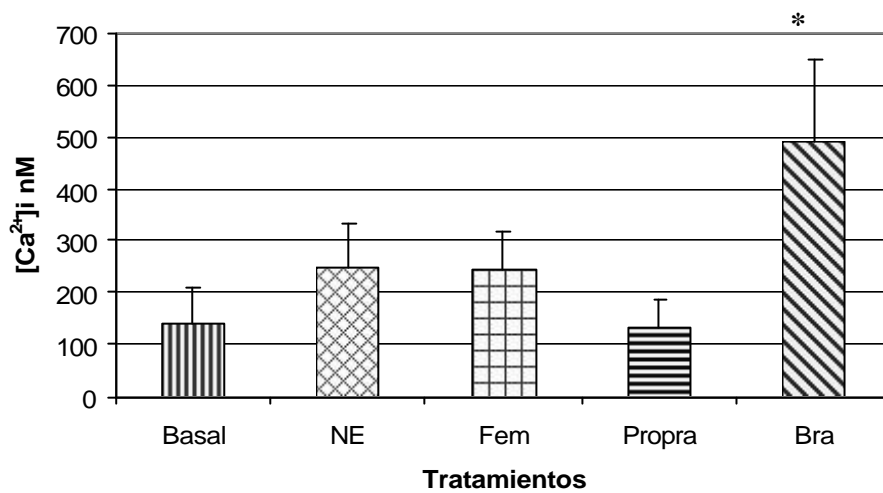
Gráfica 2. Movilización de Ca^{2+} en las células estelares CFSC2G estimuladas con Fentolamina 10 μM , NE 10 μM , LPA 10 μM y bradicidina 10 μM . La gráfica es representativa de 5 diferentes experimentos. Se preincubó por 60 segundos con fentolamina que es un antagonista α adrenérgico y luego se procedió a dar el estímulo con NE observando su pico a los pocos segundos. El estímulo al que mejor responden las células es Bradicidina.



Gráfica 3. Movilización de Ca²⁺ en las células estelares CFSC2G estimuladas con propranolol 1 μM, NE 10 μM y Bradicidina 1 μM. Esta gráfica es representativa de 5 diferentes experimentos. El pico que se presenta después de la estimulación con NE es abatido con la preincubación por 60 seg de propranolol. Las células siguen estando en buenas condiciones ya que son capaces de responder a bradicidina.

En todos los experimentos se obtuvieron resultados similares, en la gráfica 4 se muestra que la respuesta de las células CFSC2G a NE no es estadísticamente significativa. Las células son capaces de responder a bradicidina, (que se utilizó como control positivo) de manera estadísticamente significativa. Además, el pretratamiento con fentolamina no logra inhibir ese pico que se presenta después de la estimulación con NE, mientras que la preincubación con propranolol sí lo evita.

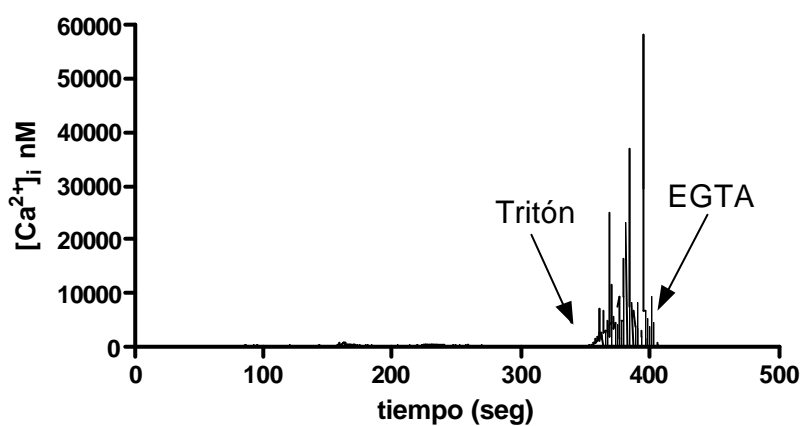
Podemos considerar que la respuesta a NE no es mediada por los receptores α adrenérgicos dado que no se presenta una elevación en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Por otro lado, la respuesta a NE mediante los receptores β adrenérgicos de manera canónica concuerda con una baja o nula respuesta de calcio ya que estos receptores lo estimulan pobremente y presentan otros mediadores como segundos mensajeros, por lo que comenzamos a pensar que estos son los que se están presentando en los modelos presentados en esta tesis.



Gráfica 4. Movilización de Ca²⁺ en las células estelares CFSC2G estimuladas con NE 10 μM, fentolamina 10 μM + NE 10 μM, propranolol 1 μM + NE 10 μM y Bradicidina 1 μM. Las células fueron estimuladas con los diversos agentes y pretratadas por unos 60 seg con fentolamina y propranolol antes de dar el estímulo con NE. Existe una tendencia a mantener el pico que se presenta después del tratamiento con NE con el pretratamiento con fentolamina y a disminuirlo con la preincubación con propranolol. Cada valor representa la media ± D.E. de 5 experimentos independientes. * Diferencia significativa con respecto al basal (p<0.05).

VIII.2.2. CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO.

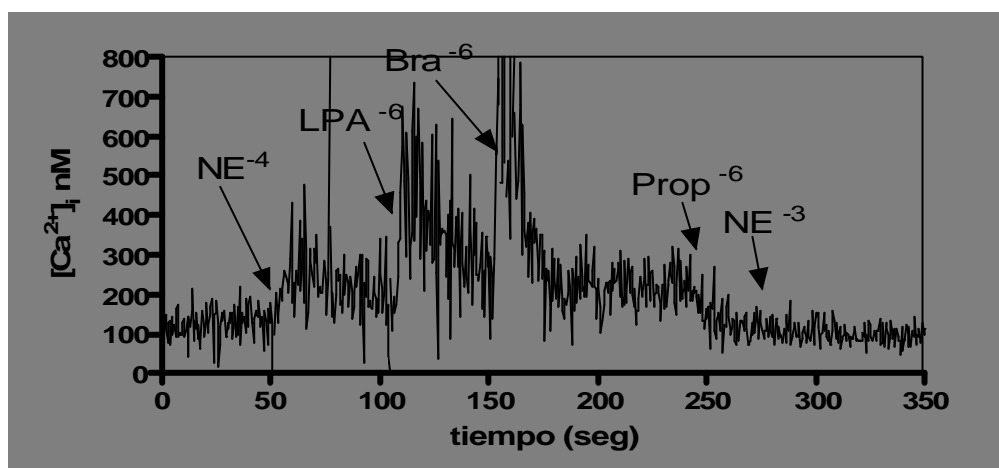
Las células estelares obtenidas de cultivo primario no cargaron el indicador fluorescente de la forma original, por lo que se tuvo que utilizar el ácido plurónico para permitir que el indicador penetrara en las células. Esto se observa en la gráfica 5, donde al utilizar tritón se obtiene una alta concentración de calcio, y con el uso de EGTA ésta se abate.



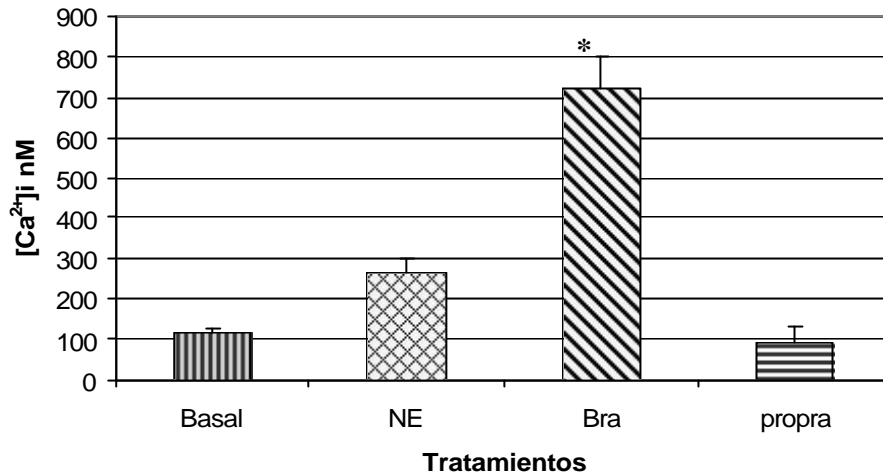
Gráfica 5. Carga de fura-2AM en células de cultivo primario con ayuda de ácido plurónico. Esta es una gráfica representativa de 5 experimentos. Podemos observar que al utilizar en la incubación inicial el indicador fluorescente fura 2AM con 40 mg de ácido plurónico se logró la penetración del indicador en las células ya que con tritón 10% obtenemos un valor elevado y con EGTA 0.5M se abate totalmente.

En todos los casos el pico que se presenta después de la estimulación con NE en las células de cultivo primario es menor que a los otros estímulos utilizados, como podemos verlo en la gráfica 6. Las células respondieron mejor a endotelina, bradicidina y ácido lisofosfatídico. Después del uso de propranolol se bloquea completamente ese pico.

Los resultados fueron similares en todos los experimentos, en la gráfica 7 se muestra que la respuesta de las células de cultivo primario a NE no es estadísticamente significativa. Las células son capaces de responder a bradicidina de manera estadísticamente significativa. El pretratamiento con propranolol por unos 60 seg inhibe el pico que se presenta después del tratamiento con NE. Dado que no se presenta una movilización de calcio intracelular estadísticamente significativa consideramos que la respuesta a NE no es mediada por los receptores α adrenérgicos, ya que estos de manera anónica activan la movilización de Ca^{2+} intracelular.

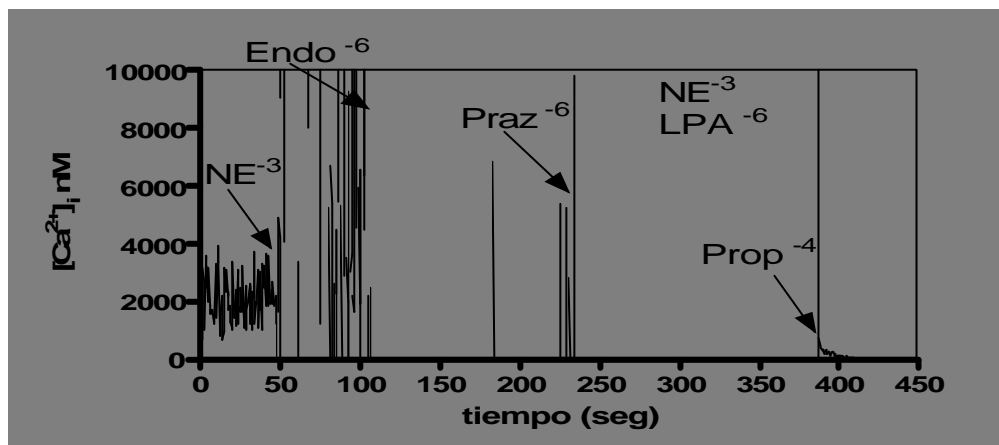


Gráfica 6. Movilización de calcio en células de cultivo primario estimuladas con NE 0.1 M, LPA 1 μM , Bradicidina 1 μM y propranolol 10 μM + NE 1 M. Las flechas indican el momento en que se adicionó el estímulo. Esta es una gráfica representativa de 3 experimentos diferentes. El pico que se presenta después del estímulo con NE fue el menor. Se preincubó por 60 segundos con propranolol que es un antagonista β adrenérgico y luego se procedió a dar el estímulo con NE observando que no se presentó ese pico.



Gráfica 7. Movilización de Ca²⁺ en las células estelares de cultivo primario de rata estimuladas con NE 10 μM, Bradicidina 1 μM y propranolol 10 μM 60 seg + NE 10 μM. Cada valor representa la media ± D.E. de 3 experimentos independientes. * Diferencia significativa con respecto al basal (p<0.05).

Finalmente, en la gráfica 8 nos damos cuenta de que no se puede utilizar la prazosina en esta técnica, ya que autofluoresce afectando la lectura de la concentración de la concentración de Ca²⁺ intracelular.



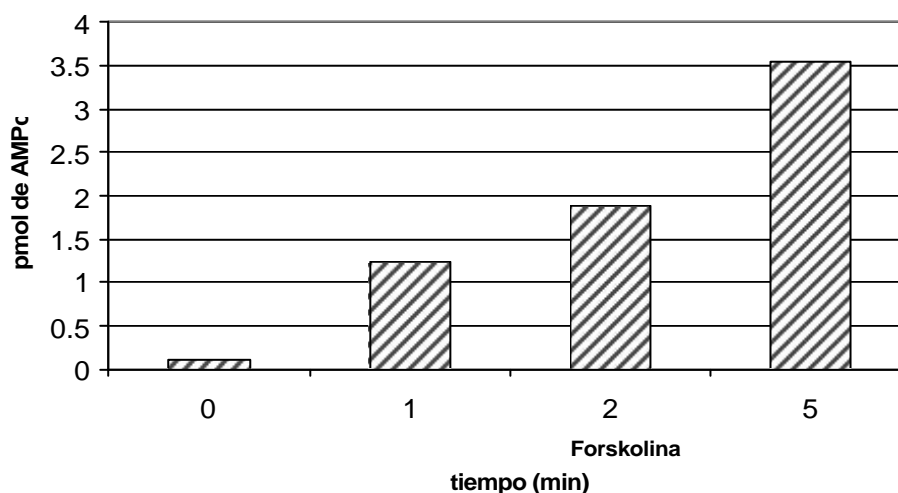
Gráfica 8. Movilización de calcio en células de cultivo primario estimuladas con NE 1 M, endotelina 1 μM, prazosina 1 μM, propranolol 0.1 M y LPA 1 μM. Este experimento se realizó una sola vez, debido a que la prazosina autofluoresce y no es posible tener una lectura adecuada de la respuesta.

VIII.3. DETERMINACIÓN DE AMPc.

Con la finalidad de conocer si el segundo mensajero del receptor β -adrenérgico en nuestros modelos es AMPc se decidió determinarlo utilizando las células de la línea CFSC2G y células de cultivo primario.

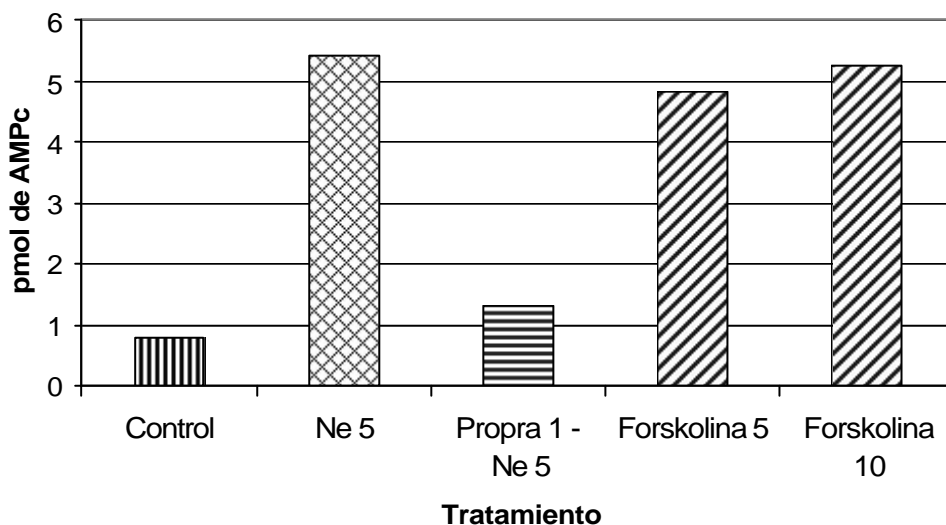
VIII.3.1. CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO.

Primero se hizo un curso temporal con forskolina 1 μ M pues estimula directamente la adenilil ciclasa y así se pudo observar la respuesta máxima de las células. Encontrando que a los 5 min las células de cultivo primario presentan la mayor producción de AMPc como se observa en la gráfica 9. La forskolina se utilizó siempre como control positivo.



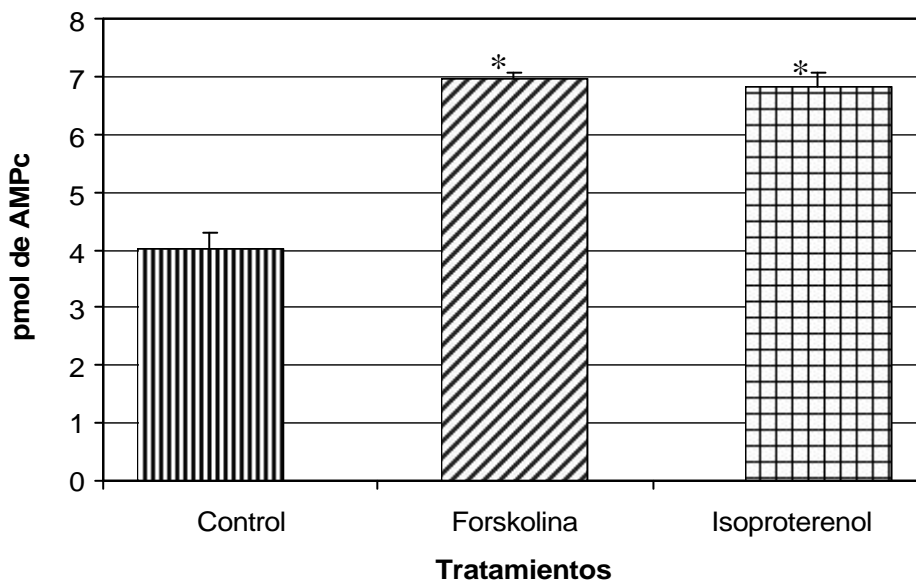
Gráfica 9. Respuesta máxima de AMPc a forskolina. Las células fueron estimuladas por diferentes tiempos con forskolina 1 μ M para poder determinar en que tiempo la cantidad de AMPc producido era mayor. Este experimento se realizó una sola vez.

Dado que las células respondieron mejor al tratamiento con forskolina por 5 min se decidió probar el estímulo de forskolina a los 10 min observando una respuesta similar en la gráfica 10, por lo que se decidió que el tiempo de 5 min era adecuado para realizar los experimentos. Para comprobar que la respuesta al estímulo era mediada por los receptores β adrenérgicos se puso propranolol y después de 1 min el estímulo de NE durante 5 min obteniendo la inhibición de la respuesta.



Gráfica 10. Producción de AMPc en respuesta a NE, propranolol + NE y forskolina. La respuesta que se presenta a NE 10 μ M es inhibida con el pretratamiento de propranolol 10 μ M por 1 min. La respuesta de AMPc a forskolina 1 μ M se mantiene en valores similares a los 5 a 10 min. El experimento fue realizado una sola vez.

Debido a las complicaciones para obtener mayor número de células estelares de cultivo primario para poder seguir realizando las pruebas de manera similar a la presentada en la gráfica 10, se decidió utilizar al isoproterenol para poder observar la respuesta a los receptores β -adrenérgicos, ya que es un agonista bastante estudiado. En la gráfica 11 observamos los resultados obtenidos con las células estelares hepáticas de cultivo primario que responden muy bien a isoproterenol, ya que alcanzan el pico máximo de estimulación que se obtiene con forskolina, por lo que entre estos tratamientos no hay una diferencia estadísticamente significativa, pero ambos con respecto al control sí presentan diferencias significativas por lo que están estimulando la producción de AMPc como segundo mensajero.



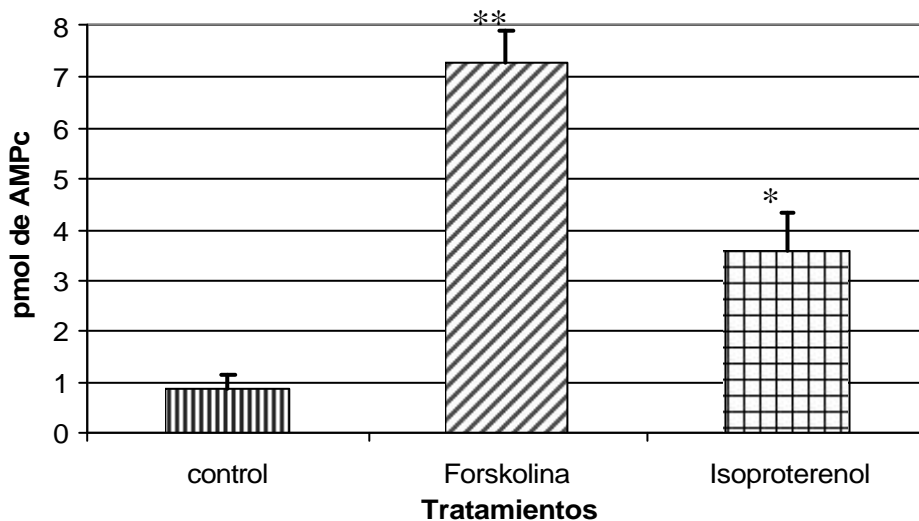
Gráfica 11. Respuesta máxima de AMPc a forskolina e isoproterenol en las células de cultivo primario. Las células fueron tratadas por 5 min con forskolina 1 μ M o con isoproterenol 10 μ M. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos independientes. * Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.01$).

VIII.3.2. CÉLULAS DE LA LÍNEA CFSC2G.

Para poder realizar posteriores comparaciones entre ambos modelos utilizamos las mismas condiciones que determinamos para el cultivo primario, estas condiciones son:

- El uso de isoproterenol para observar la respuesta de los receptores β -adrenérgicos en lugar de la NE.
- El tiempo de 5 min de duración del estímulo.

En la gráfica 12 vemos los resultados obtenidos con la línea celular y podemos observar que responden muy bien a isoproterenol, aunque en menor medida que la respuesta dada por el cultivo primario, ya que no alcanzan los valores obtenidos con forskolina. Los tratamientos con isoproterenol y con forskolina presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control y también entre ellos, por lo tanto ambos estimulan la producción de AMPc aunque en este caso no se logra el punto máximo alcanzado con el control positivo.



Gráfica 12. Respuesta máxima de AMPc a forskolina e isoproterenol en la línea celular CFSC2G. Las células fueron tratadas por 5 min con forskolina 1 μ M o con isoproterenol 10 μ M. Cada valor representa la media \pm D.E. de 5 experimentos independientes. * Diferencia significativa con respecto al control, ** con respecto al control y a isoproterenol ($p < 0.01$).

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que las células estelares de cultivo primario de rata y de la línea celular CFSC2G son capaces de responder a NE mediante los receptores β adrenérgicos utilizando como segundo mensajero al AMPc.

Existen trabajos que plantean la idea de que el SNS, sobre todo mediante la NE, puede estar jugando un papel importante en la respuesta de las HSC ante un proceso de daño y regeneración hepática. Por ejemplo, al correlacionar el número de nervios colinérgicos y los fibroblastos en el hígado cirrótico se ha sugerido que la actividad parasimpática pudiera estar promoviendo la síntesis de colágena y estar participando en el proceso de reparación del hígado (Shimazu 1996).

Un grupo que ha realizado varios trabajos con respecto a esta hipótesis es el de Jude Oben, quienes usando como modelo ratones deficientes en leptina y con niveles reducidos de NE demostraron que al administrarles el neurotransmisor se incrementó la fibrosis; llegaron a concluir que la NE promueve la proliferación celular y la expresión del gen de colágena en las HSC, sugiriendo que la interrupción de la señal del SNS podría ser útil en el control de la respuesta al daño hepático (Oben *et al.* 2003; Oben *et al.* 2003; Oben and Diehl 2004; Oben *et al.* 2004). Sin embargo, a pesar de presentar respuestas muy interesantes en los diversos trabajos que han realizado, no han demostrado que las HSC presenten los receptores para NE ni qué subtipo es el que está presente en ellas.

Los trabajos realizados por otros grupos como el de Dubuisson (2002), Cassiman (2001, 2002, 2002) y Sancho-Bru (2006) concuerdan con la idea de que al inhibir los neurotransmisores del SNS, ya sea mediante la destrucción de las fibras noradrenérgicas o con el uso de antagonistas, se reduce el desarrollo de la fibrosis hepática lo cual puede ser dado por la disminución en la proliferación de las HSC o de la producción de colágena de estas células activadas. Sin embargo

presentan controversias por el tipo de receptor que puede estar participando en este proceso, parte de lo cual se puede deber a las diferencias en el modelo utilizado.

Dependiendo del subtipo de receptor con el cual interactúa la NE, los segundos mensajeros varían entre AMPc, IP₃, DAG y la movilización de Ca²⁺ (Lodish *et al.* 2000). Los subtipos de receptores α_1 se vinculan con la activación de los canales de Ca²⁺, mientras que los receptores α_2 , mejor conocidos como autorreceptores, con la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa (Siegel 1999). Los receptores β adrenérgicos estimulan la síntesis de AMPc como segundo mensajero, resultando en la activación de PKA (Siegel 1999; Lodish *et al.* 2000). La mayoría de los autores concuerdan en que el subtipo β_2 es el receptor adrenérgico que predomina en el hígado de diversas cepas de ratas (Cardani and Zavanella 2001). Sin embargo, no existen estudios claros que permitan definir el subtipo de receptor adrenérgico presente en las HSC de hígado de rata, por ello resultan muy importantes los resultados presentados en este proyecto para poder clarificar un poco más este hecho.

En los resultados presentados en este trabajo, al no encontrar una respuesta estadísticamente significativa de Ca²⁺ ante la estimulación por NE en las HSC se descartó la idea de que los receptores fueran del subtipo α_1 adrenérgicos, ya que este subtipo activa los canales de este ión (Siegel 1999).

Partiendo de la idea de que los receptores β adrenérgicos utilizan como segundo mensajero (pequeña molécula intracelular, producida por una estimulación celular, capaz de regular procesos celulares posteriores) al AMPc, el evaluar su activación en los modelos estudiados resultaba ser de suma importancia para comprobar que el subtipo de receptor presente es el β adrenérgico y que sí es capaz de transmitir su señal para desencadenar una respuesta celular. Nuestros resultados fueron los esperados, ya que tanto en la línea celular CFSC2G como en el cultivo primario de HSC de rata encontramos incrementado este segundo mensajero concordando con la literatura revisada (Siegel 1999; Lodish *et al.* 2000). Además, esto también concuerda con los resultados que plantean Cardani y Zavanella (Cardani and Zavanella 2001)

donde expresan que la mayoría de los autores aceptan que el subtipo β_2 es el receptor adrenérgico que predomina en el hígado de diversas cepas de ratas.

Sin embargo, existen datos controversiales con respecto a los resultados que se presentan en este proyecto, los cuales discutiremos a continuación.

vom Dahl y sus colaboradores (1999) realizaron algunos experimentos con HSC de rata y midieron calcio intracelular por microscopía de fluorescencia invertida de una manera similar a la técnica utilizada en la presente tesis, usando el indicador fluorescente Fura-2AM. Encontraron que el Ca^{2+} intracelular se incrementaba al utilizar fenilefrina y con el uso de fentolamina esta respuesta se abatía completamente por lo que ellos concluyen que la respuesta es mediada por receptores α adrenérgicos.

Esto difiere de los presentes resultados, ya que los experimentos realizados muestran que no hay respuesta a Ca^{2+} , por lo que en este caso la respuesta no es mediada por receptores α adrenérgicos. Estas diferencias pueden deberse a varias razones en cuanto al modelo:

- a) Ellos utilizan ratas Wistar macho con un peso entre 160-230 g, por lo que son jóvenes, mientras que en este trabajo las utilizamos con un peso mayor a 550 g y por lo tanto más viejas. Consideramos que el envejecimiento de las ratas podría ser un factor que este afectando la capacidad de respuesta de las HSC. Esta idea también concuerda con otro trabajo, en donde presentan que existe un incremento en la capacidad de respuesta de los receptores β_2 adrenérgicos en ratas senescentes (24-25 meses) en comparación con ratas jóvenes (4-7 meses) (Sanghani *et al.* 1994; Cardani and Zavanella 2001).
- b) Utilizan las HSC entre 24 y 48 hrs después del aislamiento por lo que no están completamente activadas, ya que el proceso de activación tarda y a partir de los 7 días es cuando se consideran totalmente activadas, y en la presente tesis las utilizamos entre los 7 y 14 días.

- c) En su técnica ellos no tienen que despegar las células, algo que en este trabajo sí se realizó y que puede estar afectando ligeramente la membrana. Aunque no lo consideramos muy importante ya que las células si son capaces de responder bien a otros factores utilizados como control como bradicidina o endotelina.

Dado que los trabajos anteriores presentan la presencia de los receptores α adrenérgicos en las células estelares a las 24 y 48 hrs después del aislamiento, y en los resultados del presente trabajo encontramos que al analizarlas a los 14 días se presentan los receptores β adrenérgicos se podría pensar que con la diferenciación que sufren las HSC en cultivo se puede estar presentando también un proceso de cambio en el tipo de receptores adrenérgicos que están activados, es posible que cuando las células son quiescentes tienen receptores α y cuando se encuentran completamente activadas cambian a β . Esto se ha visto en otros modelos como el de hepatocitos, en donde el balance en las señales que controlan la proliferación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial procede del cambio en las señales de catecolaminas de un receptor α_1 a β_2 adrenérgico donde se presenta un decremento en la señal α_1 adrenérgica y por el contrario se encuentra un incremento en la activación mediada por los receptores β_2 adrenérgicos (Spector *et al.* 1997) regulando de esta forma la proliferación de los hepatocitos. De manera similar podría estar participando el receptor β adrenérgico mediante el incremento del AMPc en la regulación de la proliferación de las HSC.

Además, existen trabajos realizados en fibrosis avanzada y en la cirrosis en donde se sugiere que existe un cambio en las HSC ya que identifican tres tipos distintos de MF parecidos en la subpoblación del hígado sugiriendo un estado transitorio (Cassiman *et al.* 2001; Cassiman *et al.* 2002; Cassiman and Roskams 2002). Esto puede estar correlacionado con el porqué de las diferencias de los subtipos de receptores encontrados, ya que finalmente debemos considerar que el modelo de activación de las HSC en cultivo podría estar induciendo el cambio de expresión de estos receptores en las células.

Sancho-Bru y sus colaboradores (2006) trabajando con HSC humanas encontraron que la NE estimulaba la liberación de Ca^{2+} intracelular al observar que se superaba el valor basal en más de un 50% y también advirtieron que la respuesta presentaba numerosos picos. Ellos preincubaron con prazosina o propranolol y sólo el primer antagonista fue capaz de inhibir la respuesta por lo que concluyen que esta es mediada por receptores α adrenérgicos, además realizan RT-PCR encontrando el mensajero de los receptores α_{1A} , α_{2B} y β_2 adrenérgicos. Estos resultados difieren con los del presente trabajo en cuanto a la medición de Ca^{2+} intracelular ya que no se encontró una respuesta mediada por receptores α adrenérgicos lo cual puede deberse a la diferencia de especies (Humano vs. Rata).

Los resultados muestran que la respuesta de la línea fue menor que la del cultivo primario en cuanto a la producción de AMPc. Esto puede deberse a las diferencias entre ambos modelos, ya que las células estelares de la línea fueron obtenidas de hígados de ratas cirróticas mientras que el cultivo primario es de animales sanos. De cualquier manera en ambos tipos celulares y con las dos técnicas encontramos que la respuesta es mediada por receptores β adrenérgicos.

Al encontrar una activación de AMPc en ambos tipos celulares, inducida por la estimulación de los receptores β adrenérgicos es posible especular sobre su participación en la activación de la respuesta celular. Uno de los procesos en donde podría estarse presentando un papel importante es en la proliferación, como en los hepatocitos que ya se mencionó con anterioridad, en donde los niveles incrementados de AMPc llevan a la modulación de la expresión génica mediante los elementos respondedores a AMPc (CRE) (Della Fazia *et al.* 1997).

En este proceso de proliferación existen datos muy interesantes que involucran al AMPc en las HSC, en donde a diferencia de los hepatocitos y otros tipos celulares como los fibroblastos dermales que en respuesta al estímulo de la NE mediante el receptor β adrenérgico llevan a la proliferación de las células, tienen la inhibición de la proliferación celular mediada por la elevación en los niveles de AMPc en las HSC activadas bajo el estímulo de endotelina-1 (Mallat *et al.* 1996) o mediada por proteínas de unión a CRE (Houghlum *et al.* 1997). Por ello resultaría importante el poder definir el papel que está jugando el incremento del AMPc en respuesta a NE en las HSC en

cuanto a la proliferación celular, de acuerdo a los trabajos realizados por Dubuisson (2002) y Cassiman (2001, 2002, 2002) la propuesta sería la confirmación de la inhibición de la proliferación de las HSC, aunque actualmente existen trabajos contradictorios con respecto a este papel como los de Oben (2003, 2004).

Existen datos que presentan un posible papel del AMPc como promotor de la relajación de las HSC, mientras que la contracción de las HSC es estimulada por sustancias vasoactivas causantes del incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Kawada *et al.* 1993), esto resulta muy interesante en comparación de los resultados encontrados en la presente tesis, ya que al estimular con NE se presenta una activación de AMPc, la cual podría estar participando en este papel fisiológico de relajación de las HSC. Esto podría ser similar al papel mencionado de la NE en los fibroblastos dermales, en donde mediante la vía de señalización AMPc/PKA el receptor β adrenérgico disminuye la contracción de los geles de colágena, controlando así la actividad contráctil de estas células (Pullar and Isseroff 2006). Además existen investigaciones sobre la NE en HSC humanas, en donde presentan que la NE induce la contracción celular mediada por los receptores α_1 adrenérgicos y la elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Sancho-Bru *et al.* 2006).

Sin embargo, resulta necesario comprobar la vía de transducción de señales y la respuesta que tienen las HSC ante el estímulo con NE y la activación de AMPc, ya que como hemos visto en los diversos modelos celulares, depende mucho del tipo celular para presentar una respuesta específica y además se pueden estar presentando respuestas opuestas partiendo de vías similares. Como sucede por ejemplo en la apoptosis en los miocitos cardiacos, mediada por la NE a través de su receptor β -adrenérgico acoplado a proteínas G, las cuales estimulan la actividad de adenilil ciclasa que nos lleva a la producción de AMPc, seguido de la activación de PKA (Iwai-Kanai and Hasegawa 2004), al contrario de su papel importante en la proliferación durante el desarrollo temprano postnatal de los miocitos (Tseng *et al.* 2001). Este cambio en la forma de responder a NE utilizando la misma vía de señalización podría estarse presentando de manera similar en las HSC dependiendo de su estado de diferenciación como ya lo hemos mencionado.

La migración direccional es otro papel fisiológico que podría estarse presentando en las HSC después de la estimulación con NE mediante los receptores β adrenérgicos. Esto se ha visto en los queratinocitos, encontrando que la galvanotaxia de ellos es dependiente del AMPc (Pullar and Isseroff 2005). Este proceso resulta muy interesante teniendo en cuenta que las HSC activadas tienen la capacidad de migrar hacia el sitio de daño en el hígado, por lo que la NE podría estar involucrada en este proceso.

Además, las variaciones en la especificidad del tipo de respuesta que genera el AMPc en las células estelares podrían estar siendo moduladas por el tipo de PDEs con que interactúe el subtipo de receptor β adrenérgico, como sucede con los miocitos (Conti and Beavo 2007; Richter *et al.* 2008).

Finalmente, los resultados obtenidos muestran que las HSC de rata, activadas en cultivo primario y las células de la línea CFSC2G presentan una respuesta a NE mediada por los receptores β adrenérgicos y teniendo al AMPc como segundo mensajero.

X. CONCLUSIONES

El subtipo de receptor adrenérgico que está mediando la respuesta celular ante el estímulo de la NE es de tipo β adrenérgico, ya que tanto en las células estelares de línea CFSC2G y del cultivo primario de rata se presenta el incremento en los niveles de AMPc que funciona como segundo mensajero de los receptores β adrenérgicos.

Las células estelares hepáticas de la línea CFSC2G y de cultivo primario de rata presentan una respuesta a NE que no es medida por el incremento en calcio intracelular de manera estadísticamente significativa. Por lo tanto la respuesta que se puede presentar en estas células estelares ante el estímulo de NE no es mediada por los receptores α_1 adrenérgicos.

Además, dado que se encontraron niveles incrementados de AMPc ante la estimulación con NE en las HSC de la línea CFSC2G y en el cultivo primario de rata, se desecha la posibilidad de que los receptores α_2 adrenérgicos pudieran estar participando, ya que estos receptores inhiben la activación de AMPc.

XI. REFERENCIAS

- Acosta, F., J. Diaz, T. Sansano, C. G. Palenciano, M. Reche, R. Beltran, V. Roques, R. Robles, F. S. Bueno, P. Ramirez and P. Parrilla (2000). "Evolution of the plasma concentration of norepinephrine in cirrhotic patients during liver transplantation." Transplant Proc **32**(8): 2659-60.
- Akiyama-Uchida, Y., N. Ashizawa, A. Ohtsuru, S. Seto, T. Tsukazaki, H. Kikuchi, S. Yamashita and K. Yano (2002). "Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts." Hypertension **40**(2): 148-54.
- Amin, J. K., L. Xiao, D. R. Pimental, P. J. Pagano, K. Singh, D. B. Sawyer and W. S. Colucci (2001). "Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **33**(1): 131-9.
- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola and J. S. Wilson (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut **43**(1): 128-33.
- Arias, I. M., J. L. Boyer, F. V. Chisari, N. Fausto, D. Schachter and D. A. Shafritz (2001). The Liver Biology and Pathobiology. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." J Clin Invest **115**(2): 209-18.
- Brown, R. (1994). An introduction to Neuroendocrinology. USA, Cambridge University Press.
- Cardani, R. and T. Zavanella (2001). "Immunohistochemical localization of beta 1-adrenergic receptors in the liver of male and female F344 rat." Histochem Cell Biol **116**(5): 441-5.
- Cassiman, D., C. Deneff, V. J. Desmet and T. Roskams (2001). "Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors." Hepatology **33**(1): 148-58.
- Cassiman, D., L. Libbrecht, V. Desmet, C. Deneff and T. Roskams (2002). "Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers." J Hepatol **36**(2): 200-9.
- Cassiman, D. and T. Roskams (2002). "Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research." J Hepatol **37**(4): 527-35.
- Colle, I., H. Van Vlierberghe, R. Troisi and B. De Hemptinne (2004). "Transplanted liver: consequences of denervation for liver functions." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**(1): 924-31.
- Conti, M. and J. Beavo (2007). "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling." Annu Rev Biochem **76**: 481-511.

- Chalet, H., F. Lin, J. Guo, W. A. Owens, J. Michalicek, S. H. Kesteven, Z. Guan, O. W. Prall, B. M. Mearns, M. P. Feneley, S. F. Steinberg and R. M. Graham (2006). "Sustained augmentation of cardiac alpha1A-adrenergic drive results in pathological remodeling with contractile dysfunction, progressive fibrosis and reactivation of matricellular protein genes." J Mol Cell Cardiol **40**(4): 540-52.
- Della Fazia, M. A., G. Servillo and P. Sassone-Corsi (1997). "Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM." FEBS Lett **410**(1): 22-4.
- Dubuisson, L., A. Desmouliere, B. Decourt, L. Evade, C. Bedin, L. Boussarie, L. Barrier, M. Vidaud and J. Rosenbaum (2002). "Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism." Hepatology **35**(2): 325-31.
- Elsharkawy, A. M., F. Oakley and D. A. Mann (2005). "The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis." Apoptosis **10**(5): 927-39.
- Fagan, T. E. and A. Romani (2001). "alpha(1)-Adrenoceptor-induced Mg²⁺ extrusion from rat hepatocytes occurs via Na(+)-dependent transport mechanism." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(6): G1145-56.
- Falk-Symposium (1998). Liver and Nervous System. Falk Symposium 103. K. H. D. Häussinger. UK, Kluger Acad.
- Friedman, S. L. (1996). "Hepatic stellate cells." Prog Liver Dis **14**: 101-30.
- Friedman, S. L. (1999). "Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview." Alcohol Clin Exp Res **23**(5):904-10.
- Friedman, S. L. (2000). "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury." J Biol Chem **275**(4): 2247-50.
- Friedman, S. L. (2004). "Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis." Hepatology **40**(5): 1041-3.
- Ganong, W. (1992). Fisiología Médica. México, D. F., Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V.
- Geerts, A. (2004). "On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal?" J Hepatol **40**(2): 331-4.
- Gilman, S. and S. Winans (1998). Neuroanatomía y neurofisiología clínicas de Manter y Gatz. México, El Manual Moderno, S. A. de C. V.
- Grando, S. A., M. R. Pittelkow and K. U. Schallreuter (2006). "Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance." J Invest Dermatol **126**(9): 1948-65.

- Greenwel, P., M. Schwartz, M. Rosas, S. Peyrol, J. A. Grimaud and M. Rojkind (1991). "Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6." Lab Invest **65**(6): 644-53.
- Gressner, A. M. (1998). "The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts." Cell Tissue Res **292**(3): 447-52.
- Guyton, A. (1987). Fisiología Humana. México, D. F., Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V.
- Hamasaki, K., M. Nakashima, S. Naito, Y. Akiyama, A. Ohtsuru, Y. Hamanaka, C. T. Hsu, M. Ito and I. Sekine (2001). "The sympathetic nervous system promotes carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats by suppressing apoptosis and enhancing the growth kinetics of regenerating hepatocytes." J Gastroenterol **36**(2): 111-20.
- Hernández, P. (2004). "Activación de células estelares y su importancia en la fibrosis hepática." Rev de Ciencias Clínicas **5** (Núm. 1): 39-47.
- Houglum, K., K. S. Lee and M. Chojkier (1997). "Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on serine 133." J Clin Invest **99**(6): 1322-8.
- Hsu, C. T. (1995). "The role of the autonomic nervous system in chemically-induced liver damage and repair--using the essential hypertensive animal model (SHR)." J Auton Nerv Syst **51**(2): 135-42.
- Iversen, S. D. and L. L. Iversen (1981). Behavioral Pharmacology. New York, Oxford University. 2nd edit. 64-117.
- Iwai-Kanai, E. and K. Hasegawa (2004). "Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis." Mol Cell Biochem **259**(1-2): 163-8.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz and T. M. Jessell (2001). Principios de Neurociencia. Madrid España, McGraw-Hill Interamericana.
- Kawada, N., T. A. Tran-Thi, H. Klein and K. Decker (1993). "The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus." Eur J Biochem **213**(2): 815-23.
- Kiba, T. (2002). "The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis--recent developments." Digestion **66**(2): 79-88.
- Kimura, M. and M. Ogihara (1999). "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 **291**(1): 171-80.

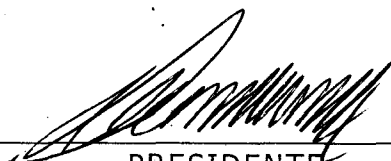
- Kimura, M., H. Okamoto and M. Ogihara (2007). "Activation of mitogen-activated protein kinase by hepatocyte growth factor is stimulated by both alpha1- and beta2-adrenergic agonists in primary cultures of adult rat hepatocytes." J Pharmacol Sci **103**(4): 398-407.
- Kmiec, Z. (2001). "Cooperation of liver cells in health and disease." Adv Anat Embryol Cell Biol **161**: III-XIII, 1-151.
- Licona-Retama, C., L. E. Gómez-Quiroz, A. Valdes-Arzate, L. Bucio-Ortiz, V. Souza, E. Hernández, G. Robles-Díaz and M. C. Gutiérrez-Ruiz (2007). "La Norepinefrina potencia la respuesta del factor de crecimiento de hepatocitos en el proceso de reparación hepática." Rev de Gastroenterología de México **Vol. 72**(Supl. 2): 175.
- Lodish, H., A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell (2000). *Molecular Cell Biology*. W. H. F. a. C. c. biology. New York.
- Magness, S. T., R. Bataller, L. Yang and D. A. Brenner (2004). "A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations." Hepatology **40**(5): 1151-9.
- Maher, J. J., D. M. Bissell, S. L. Friedman and F. J. Roll (1988). "Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer." J Clin Invest **82**(2): 450-9.
- Mallat, A., A. M. Preaux, C. Serradeil-Le Gal, D. Raufaste, C. Gallois, D. A. Brenner, C. Bradham, J. Maclouf, V. Iourgenko, L. Fouassier, D. Dhumeaux, P. Mavier and S. Lotersztajn (1996). "Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors." J Clin Invest **98**(12): 2771-8.
- Nikolov, E. N. and T. T. Ivanova-Nikolova (2007). "Dynamic integration of alpha-adrenergic and cholinergic signals in the atria: role of G protein-regulated inwardly rectifying K⁺ channels." J Biol Chem **282**(39): 28669-82.
- Oben, J. A. and A. M. Diehl (2004). "Sympathetic nervous system regulation of liver repair." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**(1): 874-83.
- Oben, J. A., T. Roskams, S. Yang, H. Lin, N. Sinelli, Z. Li, M. Torbenson, S. A. Thomas and A. M. Diehl (2003). "Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice." Biochem Biophys Res Commun **308**(2): 284-92.
- Oben, J. A., T. Roskams, S. Yang, H. Lin, N. Sinelli, M. Torbenson, U. Smedh, T. H. Moran, Z. Li, J. Huang, S. A. Thomas and A. M. Diehl (2004). "Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters." Gut **53**(3): 438-45.

- Oben, J. A., S. Yang, H. Lin, M. Ono and A. M. Diehl (2003). "Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 685-90.
- Piasecki, M. T. and D. M. Perez (2001). "Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions." J Pharmacol Exp Ther **298**(2): 403-10.
- Pinzani, M. and K. Rombouts (2004). "Liver fibrosis: from the bench to clinical targets." Dig Liver Dis **36**(4): 231-42.
- Pullar, C. E. and R. R. Isseroff (2005). "Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field." J Cell Sci **118**(Pt 9): 2023-34.
- Pullar, C. E. and R. R. Isseroff (2006). "The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms." J Cell Sci **119**(Pt 3): 592-602.
- Pullar, C. E., A. Rizzo and R. R. Isseroff (2006). "beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis." J Biol Chem **281**(30): 21225-35.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara and S. M. Williams (2001). Neuroscience. Chapter 1: Neural Signaling. Sinauer Associates, Inc. 2nd edit.
- Rains, G. D. (2004). Principios de neuropsicología humana. México, McGrawHill Interamericana editores. S.A. de C.V.
- Ramadori, G. and B. Saile (2004). "Portal tract fibrogenesis in the liver." Lab Invest **84**(2): 153-9.
- Richter, W., P. Day, R. Agrawal, M. D. Bruss, S. Granier, Y. L. Wang, S. G. Rasmussen, K. Horner, P. Wang, T. Lei, A. J. Patterson, B. Kobilka and M. Conti (2008). "Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4." EMBO J **27**(2): 384-93.
- Rippe, R. A. and D. A. Brenner (2004). "From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells." Gastroenterology **127**(4): 1260-2.
- Saeed, A. E., J. H. Parmentier and K. U. Malik (2004). "Activation of alpha1A-adrenergic receptor promotes differentiation of rat-1 fibroblasts to a smooth muscle-like phenotype." BMC Cell Biol **5**(1): 47.
- Safadi, R. and S. L. Friedman (2002). "Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation." MedGenMed **4**(3): 27.
- Sancho-Bru, P., R. Bataller, J. Colmenero, X. Gasull, M. Moreno, V. Arroyo, D. A. Brenner and P. Gines (2006). "Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(5): G877-84.

- Sanghani, M. P. and P. J. Scarpace (1994). "Atypical beta-adrenergic receptors in rat liver: evidence for transient expression during aging." J Gerontol **49**(2): B60-4.
- Senoo, H. (2004). "Structure and function of hepatic stellate cells." Med Electron Microsc **37**(1): 3-15.
- Shimazu, T. (1996). Liver Inervation, John Libbey and Company Ltd.
- Siegel, G. J. A., Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler, Michael D. (1999). Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. A. S. f. Neurochemistry. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Sivamani, R. K., S. T. Lam and R. R. Isseroff (2007). "Beta adrenergic receptors in keratinocytes." Dermatol Clin **25**(4): 643-53, x.
- Skeberdis, V. A. (2004). "Structure and function of beta3-adrenergic receptors." Medicina (Kaunas) **40**(5): 407-13.
- Spector, M. S., K. L. Auer, W. D. Jarvis, E. J. Ishac, B. Gao, G. Kunos and P. Dent (1997). "Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes." Mol Cell Biol **17**(7): 3556-65.
- Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 836-47.
- Tseng, Y. T., R. Kopel, J. P. Stabila, B. G. McGonnigal, T. T. Nguyen, P. A. Gruppuso and J. F. Padbury (2001). "Beta-adrenergic receptors (betaAR) regulate cardiomyocyte proliferation during early postnatal life." FASEB J **15**(11): 1921-6.
- Uyama, N., A. Geerts and H. Reynaert (2004). "Neural connections between the hypothalamus and the liver." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**(1): 808-20.
- vom Dahl, S., J. G. Bode, R. M. Reinehr, I. Monnighoff, R. Kubitz and D. Haussinger (1999). "Release of osmolytes from perfused rat liver on perivascular nerve stimulation: alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and nonparenchymal liver cells." Hepatology **29**(1): 195-204.
- Wu, J., S. L. Liu, J. L. Zhu, P. A. Norton, S. Nojiri, J. B. Hoek and M. A. Zern (2000). "Roles of tissue transglutaminase in ethanol-induced inhibition of hepatocyte proliferation and alpha 1-adrenergic signal transduction." J Biol Chem **275**(29): 22213-9.
- Zern, M. A., Reid, L. M. (1993). Extracellular matrix: chemistry, biology, and pathobiology with emphasis on the liver. New York, Dekker. Vol. XIV 121-148.

"Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Receptores Noradrenérgicos en las Células Estelares Hepáticas", con fecha de examen oral el día 25 de Agosto del 2008.

JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Departamento de Biología de la
Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana –
Iztapalapa
jvm@xanum.uam.mx



SECRETARIA

Dra. Marina Macías Silva

Departamento de Biología Celular
Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México
mmacias@ifc.unam.mx



VOCAL

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Departamento de Biología de la
Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana –
Iztapalapa
aja@xanum.uam.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