



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN**

**"RECEPTORES HORMONALES "**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO  
PRESENTA:**

**Muñoz Osornio Rafael**

**ASESORA: QFB MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.**

**2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: \_\_\_\_\_

Rafael Muñoz Osorio

FECHA: 22-sep-2005

FIRMA: 

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

" Receptores Hormonales "

que presenta el pasante: Rafael Muñoz Osorio  
con número de cuenta: 9226546-0 para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Julio de 2005

PRESIDENTE	<u>Dra. Luisa Martínez Aguilar</u>	<u>L. G. S. A.</u>
VOCAL	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<u>ERMS</u>
SECRETARIO	<u>QFB. Juan Chiu Chan</u>	<u>J. C.</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	<u>G. Escalante R.</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Lidia Rangel Trujano</u>	<u>L. Rangel T.</u>

## **Agradecimientos y Dedicatorias.**

Primeramente quiero agradecer y a la vez dedicar este trabajo a quienes con su incondicional apoyo y amor han contribuido a formar parte de lo que hasta este día soy. Gracias a Rafael y Dora.

También de manera especial extendiendo la dedicatoria:

A mis hermanos con quienes he compartido gran parte de mi vida. Beatriz, Mauricio y Alejandra.

A mis familiares y amigos, con quienes no quiero ni puedo hacer distinción alguna, así que no citare sus nombres, pero se que ellos bien saben el lugar tan especial que ocupan en mi.

A la profesora María Esther por su actitud y paciencia

A mis profesores que a través de sus ideas y conocimientos alimentaron mi formación intelectual, mi más sincero agradecimiento y respeto.

# ÍNDICE

## Capítulo1. GENERALIDADES

1.1 Receptor celular y señales químicas.....	8
1.2 Clasificación general de receptores de superficie celular.....	13
1.3 Funciones generales de receptores.....	15

## Capítulo2. HORMONAS Y SUS RECEPTORES

2.1 Hormonas.....	18
2.2 Clasificación de receptores hormonales por su localización celular.....	27
2.2.1 Receptores localizados en la membrana plasmática.....	28
2.2.1.1 Los receptores de membrana localizados en la superficie celular en general pertenecen a cuatro clases principales.....	28
2.2.1.2 Los efectos de muchas hormonas son mediados por segundos mensajeros.....	31
2.2.1.3 Las vías de señalización más comunes son iniciadas por distintos receptores de una clase.....	31
2.2.2 Receptores localizados intracelularmente.....	32
2.3 Receptor y ligandos específicos.....	34
2.3.1 Receptores unidos a proteínas G.....	34
2.3.2 Receptores con actividad enzimática.....	36
2.4 Receptores intracelulares (ej. receptor de glucocorticoides) .....	45

### **Capítulo3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES RELACIONADAS CON RECEPTORES**

3.1 Receptores acoplados a proteínas G.....	49
3.1.1 Segundos mensajeros.....	52
3.1.1.1 AMP cíclico.....	52
3.1.1.2 IP3, DAG, Calcio-calmodulina.....	53
3.2 Receptores con actividad enzimática.....	57
3.2.1 Transducción a través de tirosina cinasa: el receptor de insulina.....	57
3.2.2 Transducción a través de serina/treonina cinasa.....	59
3.2.3 Transducción a través de guanilato ciclasa.....	60
3.3 Receptores que se unen a enzimas itinerantes (ahora receptor de citocinas clase 1).....	63
3.4 Receptores citoplasmáticos.....	65
3.4.1 Mecanismo de acción de los glucocorticoides.....	66
3.4.1.1 Regulación positiva.....	67
3.4.1.2 Regulación negativa.....	68

### **Capítulo4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS DE EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE RECEPTORES.**

4.1. Identificación y purificación de receptores de superficie celular.....	70
4.1.1 Los receptores de hormona se detectan mediante ensayos de fijación.....	71

4.1.2 Los valores de $K_D$ para receptores de hormona de la superficie celular se aproximan a las concentraciones de hormona circulante.....	73
4.1.3 Las técnicas de afinidad permiten purificar proteínas receptoras...	74
4.1.4 Muchos receptores se pueden clonar sin purificación previa.....	75
4.2 ¿Cómo se descubren los nuevos receptores?.....	77
4.2.1 ¿Cómo identificar los factores de transcripción?.....	79



## **I.-OBJETIVOS.**

### **I.1.-GENERAL**

Elaborar una monografía actualizada del tema "Receptores Hormonales" a través de la búsqueda de información documental con la finalidad de determinar la importancia de las hormonas como mensajeros químicos, así como de sus receptores y mecanismos de transducción de señales.

### **I.2.-PARTICULARES**

1.2.1.-Resaltar las generalidades acerca de receptores celulares estableciendo conceptos bioquímicos útiles para este tema, con la finalidad que el lector se familiarice con los términos utilizados a lo largo del presente trabajo.

1.2.2.-Establecer la importancia de la relación existente entre localización y especificidad de un receptor con su hormona, esquematizando su clasificación y haciendo notar su estructura molecular para resaltar la importancia de estos conceptos.

1.2.3.-Conocer la importancia de la señalización celular (principalmente hormonas) y los mecanismos desencadenados mostrando las diferentes vías de transducción de señales, para hacer notar la diversidad biológica generada a través de la evolución.

1.2.4.-Realizar la compilación de información documental a través de la adquisición, revisión y análisis de textos editados en revistas científicas y libros; utilizando tecnología de búsqueda como: Internet y bibliotecas digitales.

## 1. GENERALIDADES.

### 1.1 Receptor celular y señales químicas. <sup>4,8,9,11,12,13,16,49,50.</sup>

La célula como entidad viviente se caracteriza entre otras cosas, por poseer una estructura molecular compleja, selectiva, permeable; que sirve como barrera entre el mundo vivo y lo no vivo. Esta estructura se denomina membrana celular o plasmática. Ella se caracteriza fundamentalmente por ser una estructura supramolecular que posee una bicapa de fosfolípidos a la que se asocian proteínas (ver figura 1.1.1)<sup>11</sup>.

La presencia de proteínas intrínsecas (constitutivas o íntimas) en una bicapa lipídica implica que estas moléculas poseen regiones constituidas predominantemente por residuos de aminoácidos de cadena lateral no polar, característica que permite a la proteína interactuar con la región hidrofóbica de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos membranales<sup>9</sup>.

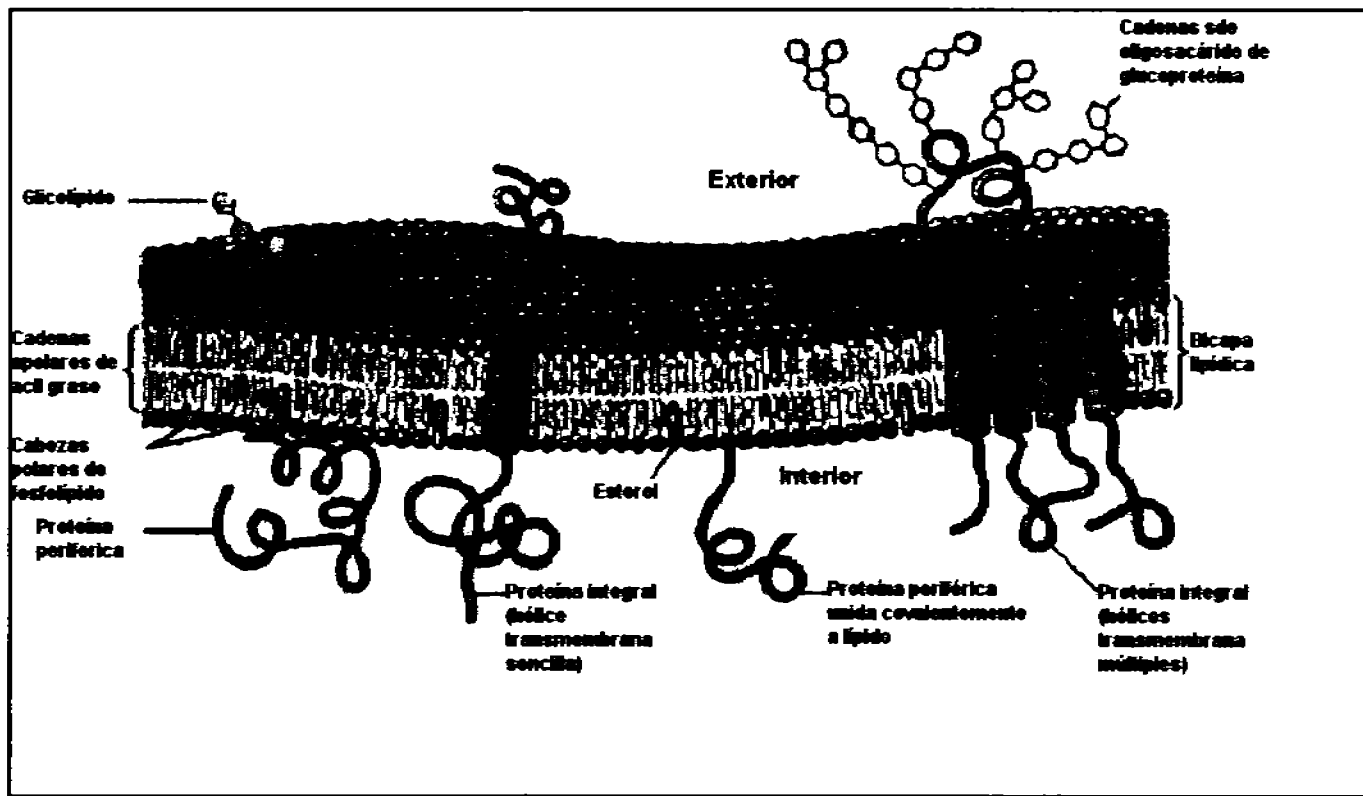


Figura 1.1.1 Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana. Las cadenas de acil grasas en el interior de la membrana forman una región hidrofóbica fluida. Las proteínas integrales flotan en este mar de lípidos, sostenidas por interacciones hidrofóbicas con sus cadenas laterales de aminoácidos apolares. Tanto las proteínas como los lípidos se pueden desplazar libremente en el plano de la bicapa, pero el movimiento de una cara de la bicapa a la otra está restringido. Las porciones de glúcido unidas a algunas proteínas y lípidos de la membrana plasmática están expuestas en la cara extracelular de la membrana <sup>11</sup>.

A las proteínas constitutivas de la membrana plasmática se pueden asociar azúcares (carbohidratos); situación que es importante en el reconocimiento intercelular. Ellos desempeñan función antigénica.

Una clase importante de proteínas de transmembrana (del latín *trans* preposición. inseparable.<sup>15</sup>) está formada por los receptores\*. Un receptor posee un sitio activo que reconoce algún ligando en la cara exterior de la membrana. Cualquiera que sea su naturaleza, el agente que se enlaza al *receptor* en la superficie externa de la célula se conoce como **ligando**<sup>8</sup>.

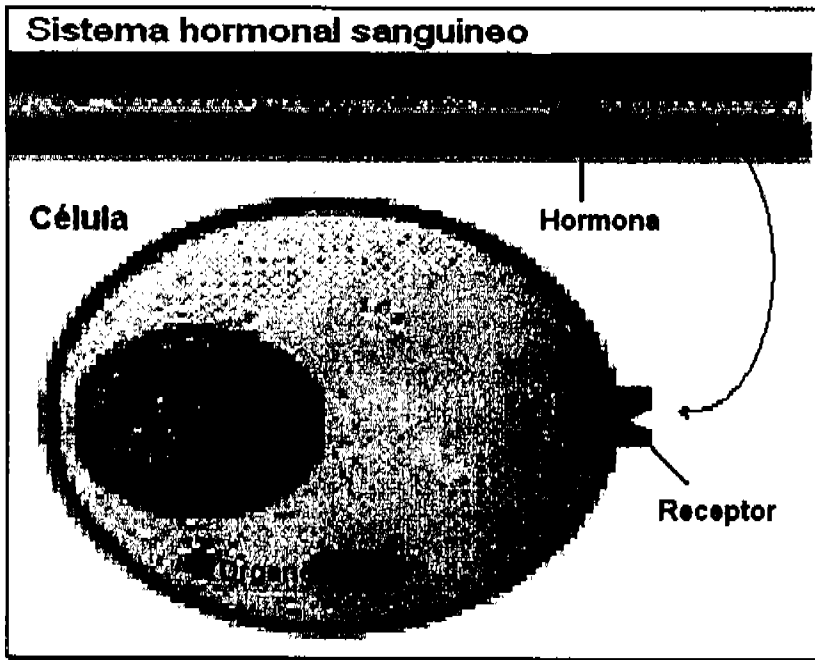
La unión al ligando provoca un cambio en la proteína, que retransmite al lado citoplásmico por un cambio conformacional en la proteína o incluso determina que la proteína entera se desplace al interior. Este cambio desencadena otros cambios dentro de la célula, proporcionando así una forma de responder al entorno. Este tipo de relación se llama **transducción de la señal**<sup>12</sup>.

El término "**emisión de señales celulares**" lleva implícito el concepto de que la célula responde a un estímulo de su ambiente transmitiendo información al compartimiento interno de esta. En la mayor parte de los casos, el estímulo es una molécula secretada en el espacio extracelular por otra célula, pero el estímulo también se origina como resultado del contacto con otra o con un sustrato no celular<sup>8</sup>.

---

\* En 1906 Langley estaba estudiando los efectos de dos sustancias, la nicotina y el curare, en una preparación experimental con células de músculo y nervio. Este investigador observó que dichas sustancias *competicionan* entre sí, lo que lo llevó a concluir que "el mutuo antagonismo del curare y la nicotina sobre el músculo sólo se puede explicar satisfactoriamente si se supone que ambos se combinan con una misma sustancia receptora, la cual recibe el estímulo, y al transmitirlo causa la contracción del músculo"<sup>3</sup>.

En las **señales endocrinas**, las moléculas señal, denominadas **hormonas**, actúan sobre una célula objetivo distante del sitio de síntesis por las células de los órganos endocrinos. En los animales, por lo general la hormona es transportada por el torrente sanguíneo desde el sitio de liberación hasta el objetivo(ver fig.1.1.2) considerado como tejido blanco, mismo que posee las células blanco o diana.



**Figura 1.1.2 Representación del sistema endocrino**, donde la hormona viaja a través del torrente sanguíneo para ser reconocida por un receptor de superficie celular localizado en la célula blanco o diana <sup>50</sup>.

Las células blanco, diana o target, se caracterizan fundamentalmente por poseer proteínas que sirven como receptores. Los receptores protéicos celulares se pueden señalar como de tres tipos:

1. De membrana
2. Citoplasmáticos
3. Nucleares.

De los que se generan conceptos y clasificaciones más precisos posteriormente.

Algunos compuestos actúan en dos o tres tipos de señales intercelulares, por ejemplo adrenalina y factor de crecimiento epidérmico<sup>13</sup>. Por ejemplo el primero se puede considerar como neurotransmisor o como hormona dependiendo de su mecanismo de acción, consideramos hormona a aquella molécula que es producida en glándula endocrina y enviada a torrente sanguíneo para ser llevada a su célula blanco y actuar; neurotransmisor equivale a moléculas que se sintetizan en neuronas y son enviadas por sinapsis a su célula blanco. La única diferencia entre una u otra es la vía de liberación para actuar en célula blanco.

Desde el punto de vista farmacológico el término receptor fue acuñado para denotar el componente del organismo con el cual se supone interactúa el agente químico<sup>4</sup>.

Desde el punto de vista farmacológico un receptor se define como el componente de una célula u organismo que interactúa con un fármaco e inicia la cadena de fenómenos bioquímicos que originan los efectos observados del fármaco<sup>2</sup>.

El término receptor se ha aplicado en forma práctica para denotar cualquier macromolécula celular con la cual se liga un fármaco para iniciar sus efectos.<sup>4</sup>

Es conveniente señalar que de acuerdo a esta última definición, el receptor liga únicamente fármacos, también lo hace con biomoléculas de diverso índole, señalando de manera importante el papel que desempeñan las hormonas, ya que las proteicas se ligan a receptores de membrana.

La afirmación de que el receptor de un fármaco puede ser cualquier componente macromolecular funcional del organismo ha tenido varias consecuencias importantes. Una de ellas consiste en que el medicamento es capaz de modificar la velocidad con que ocurre cualquier función corporal, y otra, que no genera efectos, sino modula funciones<sup>4</sup>.

Es importante señalar que la comunicación celular implica gran variedad de mecanismos regulados y dirigidos por diversas moléculas, ellos son los responsables de la coordinación de funciones corporales, existen neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, fármacos, entre otros. De todos estos compuestos a nosotros nos interesan las hormonas, que como se cito anteriormente han rebasado el concepto clásico.

## 1.2 Clasificación general de receptores de superficie celular.

Un buen número de moléculas extracelulares, incluyendo las hormonas, los factores de crecimiento y los neurotransmisores, no entran a la célula para iniciar sus acciones biológicas, sino que más bien interactúan con diferentes receptores en la superficie de éstas. Estos receptores unen a las diferentes moléculas extracelulares, llamadas genéricamente ligandos, con alta especificidad y elevada afinidad<sup>4</sup> (Cabe mencionar que la especificidad y la afinidad son factores necesarios, más no son suficientes en la activación de los receptores, como se verá más adelante).

La unión de estos ligandos induce un cambio conformacional en el receptor que lo convierte de una forma inactiva a una forma activa, o estado activado. Una vez activado el receptor, directa o indirectamente como lo podría ser mediante factores de acoplamiento, la oligomerización de las diferentes subunidades del receptor o también mediante la asociación con otra proteína podrá activar o inhibir una cascada de sucesos moleculares que llevan a la respuesta biológica. Estos receptores, y las moléculas efectoras asociadas a éstos, constituyen la llamada vía de transducción de señales<sup>9</sup>. Éste es un punto clave de la comunicación celular, que a través de una serie de cascadas o eventos moleculares previamente coordinados van transformando la señal siempre dirigida hacia una respuesta biológica específica.

A continuación se muestra una clasificación general de los receptores que se encuentran en la superficie de las células.

**Tabla 1.2.1 Clasificación de los receptores de superficie<sup>9</sup>.**

<b>I. Proteína receptora acoplada al efecto a través de una proteína G</b>	
A. El efector es un canal iónico	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Canal de sodio – acetilcolina</li> <li>2. Canal de cloro – ácido <math>\gamma</math>-aminobutírico (GABA)</li> </ol>	
B. El efector es una enzima	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tirosina cinasa – factor de crecimiento epidermal (EGF)</li> <li>2. Cinasa serina/treonina – factor de crecimiento tumoral <math>\beta</math> (TGF- <math>\beta</math>)</li> </ol>	
<b>II. Proteína receptora acoplada al efecto a través de una proteína G</b>	
A. El efector es un canal iónico	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Canal de potasio</li> <li>2. Canal de calcio</li> </ol>	
B. El efector es una enzima	
<p>0 Adenilciclasa</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimuladora – tirotropina</li> <li>• Inhibidora - dopamina</li> </ul> <p>0 Fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimuladora – tirotropina</li> <li>• Inhibidora – <math>\zeta</math></li> </ul>	
<b>III. Proteína receptora acoplada a un efector citosólico sin proteínas acopladoras</b>	
A. El efector es una enzima	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tirosina – cinasa</li> </ol>	



### 1.3 Funciones generales de receptores.

Los receptores tienen dos componentes clave:

a) Dominio específico de unión a ligando donde se une estereoespecíficamente la hormona correcta para ese receptor.

b) Dominio efector que reconoce la presencia de la hormona unida al dominio del ligando y que inicia la generación de la respuesta biológica.

La unión de la hormona al ligando produce cambios finos pero críticos en el ambiente del sitio **efector** (que responde o distribuye estímulos activadores<sup>15</sup>), de manera que se inicia la transducción, puede haber interacción con otros componentes celulares para completar la señal del proceso.

Los receptores están compuestos principalmente por proteínas, pero tienen modificaciones secundarias de carbohidratos y pueden estar selectivamente inmersos en la membrana lipídica, también pueden estar fosforilados, o formar oligómeros por puentes de disulfuro o interacciones covalentes<sup>33</sup>.

Los receptores no son componentes estáticos de la membrana, es decir, el número de receptores está en constante flujo y cambio, de acuerdo con el ciclo celular y con el estado de diferenciación celular<sup>5</sup>.

La especificidad, actividad, y diversidad son características esenciales que dan reconocimiento, transformación y control respectivamente, encontrados en los receptores tanto de superficie, como intracelulares, que definen tan sólo una parte de este intrincado sistema de señalización.

La cantidad de receptores para un determinado ligando varía en distintos estados fisiológicos. Generalmente la concentración de hormona presente regula la cantidad de receptores específicos en las células diana, blanco o target. Un aumento sostenido del nivel de hormona provoca disminución del número de receptores disponibles o su inactivación. Este fenómeno es denominado regulación "hacia abajo" ("down regulation") o "desensibilización". El fenómeno contrario, aumento del número de receptores en la membrana externa, regulación "hacia arriba" o "up regulation", se produce cuando hay deficiencia del ligando específico. Las variaciones en número de los receptores se producen ya sea por

exocitosis o bien endocitosis mediada por receptor; en tanto que la activación o inactivación puede mediarse por modificaciones covalentes (como fosforilaciones o desfosforilaciones) que alteran su conformación<sup>49</sup>.

El proceso de endocitosis, que se esquematiza en la figura. 1.3.1 conlleva la unión del complejo polipéptido-receptor (A) en cavidades recubiertas, que son invaginaciones de la membrana plasmática en el citoplasma que acaban separándose de la membrana para formar vesículas recubiertas (B y C). Las vesículas se liberan de sus cubiertas y se fusionan entre sí, formando vesículas denominadas **receptosomas** (D). Los receptores y ligandos del interior de estos receptosomas pueden tener diferentes destinos. Los receptores pueden ser devueltos a la superficie celular tras la fusión con el aparato de Golgi (E). Alternativamente, las vesículas pueden fusionarse con lisosomas para la degradación tanto de la hormona como del receptor. Además, algunos complejos hormona-receptor se separan en el lisosoma y sólo se degrada la hormona, mientras que el receptor es devuelto intacto a la membrana (F). En algunos sistemas, el receptor también puede concentrarse en cavidades recubiertas en ausencia de ligando exógeno y experimentar así un ciclo hacia dentro y fuera de la célula en un modo constitutivo independiente de ligando. El componente proteico principal de las vesículas recubiertas es la *clatrina* una proteína no glucosilada. La clatrina puede formar estructuras en rejilla flexibles que pueden actuar como armazones para la gemación vesicular. La finalización del proceso de gemación da como resultado que la vesícula madura pueda entrar en el ciclo<sup>49</sup>.

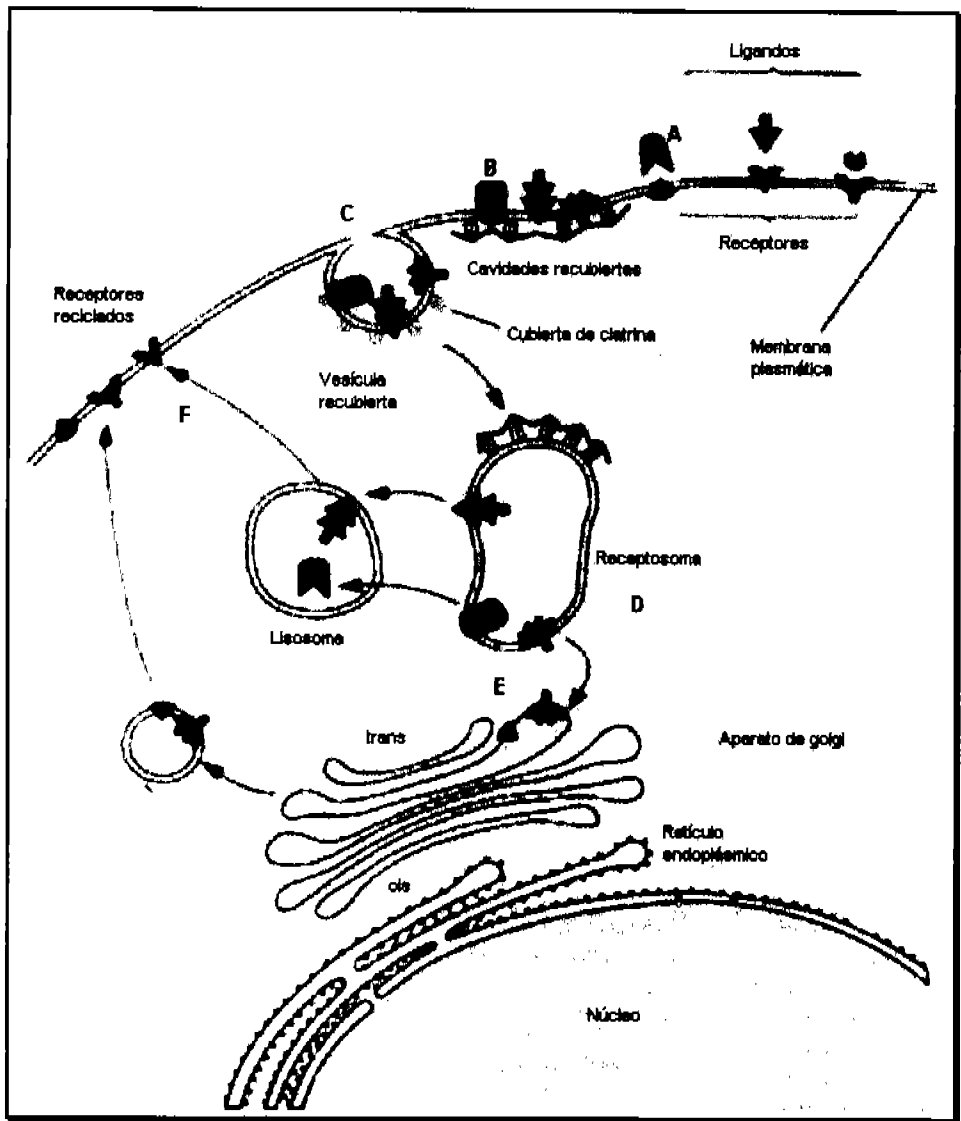


Figura 1.3.1 Esquema que resume la ruta morfológica de la endocitosis de receptores en las células<sup>49</sup>.

La unión de los fármacos con los receptores comprende todos los tipos conocidos de interacciones: iónica, por enlaces de hidrógeno, hidrófobas, por fuerzas de Van der Waals, y covalentes<sup>4</sup>.

## 2. HORMONAS Y SUS RECEPTORES.

### 2.1 Hormonas \* 1,4,3,5,7,8,10,13,14,16,17,18,20,22,27,29,30,32,35,44,47,49,61

Las hormonas son sustancias orgánicas producidas por las glándulas y tejidos endocrinos que, por lo general, pasan al torrente sanguíneo y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de secreción. Las hormonas son auténticos "mensajeros químicos"<sup>49</sup>.

En las últimas décadas, la consideración de **hormona** como "mensajero químico" de acción distante ha rebasado su concepto clásico, de forma que también se consideran hormonas otras de acción sobre células o tejidos vecinas (paracrina), incluso sobre la propia célula o tejido productor (autocrina), sobre glándulas exócrinas (exocrina) o sobre organismos ajenos a través del medio ambiente (ferocrina)<sup>49</sup>.

Según sus propiedades de solubilidad y la localización de sus receptores, las moléculas mensajeras se clasifican en<sup>13</sup>.

- *Moléculas lipofílicas*; son aquellas capaces de difundirse a través de la membrana plasmática e interactuar con receptores del citosol o del núcleo; por ejemplo las hormonas esteroideas, la tiroxina y los derivados del ácido retinoico. Después de atravesar la membrana plasmática, estas hormonas interactúan con receptores intracelulares, formando complejos capaces de incrementar o disminuir la transcripción de genes específicos; estos complejos también contribuyen a la estabilidad de ciertos RNA mensajeros. Generalizando, estos compuestos ejercen su efecto por horas o días y contribuyen al crecimiento y diferenciación de tejidos específicos<sup>13</sup>.
- *Moléculas hidrofílicas*; son aquellas que no pueden difundirse a través de la membrana plasmática e interactúan con receptores localizados en la superficie celular; por ejemplo, péptidos como la insulina, o proteínas como

---

\* Hacia 1913 Paul Ehrlich formula su postulado clásico *corpora non agunt nisi fixata*: las sustancias no actúan a menos que se fijen. Estos conceptos sientan las bases de mucho de lo que se sabe hoy día sobre la acción hormonal<sup>3</sup>.

la hormona de crecimiento y pequeñas moléculas cargadas como la acetilcolina y otras derivadas de algunos aminoácidos como la epinefrina, la histamina, la serotonina y la dopamina, algunas de las cuales funcionan como hormonas o como neurotransmisores. Muchas de estas moléculas modifican la actividad de una o más enzimas ya presentes en la célula. En estos casos, el efecto de la molécula ligada a la superficie celular es casi inmediato, pero persiste sólo por un periodo pequeño; sin embargo, el efecto de algunos factores tróficos se puede extender por varios días, pues también pueden regular los patrones de expresión genética de la célula blanco<sup>13</sup>.

- *Moléculas lipofílicas con receptores de superficie*; los ejemplos principales de este grupo son las prostaglandinas, moléculas derivadas del ácido araquidónico, de las cuales hay por lo menos 16 tipos distintos. Varias prostaglandinas actúan como mediadores locales. Ciertos miembros de este grupo provocan la agregación plaquetaria y desempeñan un papel importante en el fenómeno de coagulación<sup>13</sup>.

La afinidad puede definirse como una medida de la facilidad de interacción entre dos sustancias, en este caso entre el receptor y el mensajero<sup>3</sup>.

Una **hormona** es una señal química producida por ciertas células de un organismo multicelular y recibida por células del mismo organismo<sup>14</sup>.

Las hormonas se pueden dividir en dos grupos de acuerdo con una de sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad en agua) y también en la manera como actúan o mecanismo de acción, el primero de ellos es el de las hormonas hidrosolubles que generalmente ejercen su acción en la superficie de la membrana plasmática; al segundo pertenecen las hormonas liposolubles que de manera general podemos decir que ejercen su acción directamente en la parte interior de la célula.

Las hormonas hidrosolubles se unen a la membrana plasmática de la célula blanco, se fijan a la superficie celular se comunican con los procesos metabólicos intracelulares a través de moléculas intermediarias, llamadas segundos

mensajeros (la hormona misma es el primer mensajero), que se generan como consecuencia de la interacción entre ligando y receptor.

Las hormonas esteroides (liposolubles) regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrica, las respuestas al estrés y la función reproductiva, además de regular distintas conductas. Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol en células específicas del ovario, del testículo, la corteza suprarrenal, la placenta y el sistema nervioso central<sup>16</sup>.

La naturaleza de la respuesta depende de la célula que la genera. La misma hormona puede causar distintas respuestas en diferentes tipos de células. Que una célula responda o no a una hormona depende de si tiene receptores para ella y cómo lo haga depende de qué tipo de célula se trate<sup>14</sup>.

Las propiedades fisicoquímicas de las principales hormonas se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2.1.1 Propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de las principales hormonas (1, 5, 14, 10, 44, 47).

<i>Tejido secretante o glándula</i>	<i>Hormonas*</i>	<i>Naturaleza química</i>	<i>Blanco</i>	<i>Peso molecular (Daltones)</i>	<i>Principales acciones</i>
<b>Hipotálamo</b>	Hormona liberadora de tirotrifina (TRH)	Péptido	Hipófisis anterior	362	Estimula la liberación de tirotrifina y prolactina
	Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)	Péptido	Hipófisis anterior	1182	Estimula la liberación de hormonas foliculoestimulante y luteinizante
	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Péptido	Hipófisis anterior	4758	Estimula la liberación de adrenocorticotropina
	Hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH)	Péptido	Hipófisis anterior	44 aminoácidos	Estimula la liberación de hormona del crecimiento
	Hormona liberadora de prolactina	Péptido	Hipófisis anterior		Estimula la liberación de prolactina

	Somatostatina (hormona inhibidora de la liberación de hormona del crecimiento) (SRIF)	Péptido	Hipófisis anterior		Inhibe la liberación de hormona del crecimiento; interfiere en la liberación de tirotrófina
	Hormona inhibidora de la liberación de prolactina (PIF)	Amina	Hipófisis anterior		Inhibe la liberación de prolactina
	Hormona inhibidora de la liberación de la hormona estimulante de los melanocitos	Péptido	Hipófisis anterior		Inhibe la liberación de la hormona estimulante de los melanocitos
	Oxitocina, hormona antidiurética	Péptido	(Véase hipófisis posterior)	1007	Almacenadas y liberadas por la hipófisis posterior
<b>Hipófisis anterior</b>	Hormona estimuladora de tiroides	Glucoproteína	Glándula tiroides	300000	Estimula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas
	Adrenocorticotrofina (ACTH)	Polipéptido	Corteza suprarrenal	4100	Estimula la síntesis y liberación de hormonas corticosuprarrenales (cortisol, andrógenos y aldosterona)
	Hormona luteinizante (LH)	Glucoproteína	Gónadas	30000	Estimula la secreción de hormonas sexuales por parte de los ovarios y testículos
	Hormona foliculoestimulante (FSH)	Glucoproteína	Gónadas	103	Maduración de espermatozoos en las células de Sertoli en los testículos. Desarrollo folicular y síntesis de estrógenos en ovarios



	Hormona del crecimiento (GH)	Proteína	Huesos, hígado, músculos	22000	Estimula la síntesis de proteínas y crecimiento total
	Prolactina	Proteína	Glándulas mamarias	23 000	Estimula la producción de leche
	Hormona estimulante de melanocitos (MSH)	Péptido	Melanocitos	232	Controla la pigmentación de la piel
	Endorfinas y encefalinas	Péptidos	Neuronas de la médula espinal	3465	Disminuyen las sensaciones dolorosas
<b>Hipófisis posterior</b>	Oxitocina	Péptido	Útero, mamas	1007	Estimula la secreción de leche, induce el parto con contracciones uterinas
	Hormona antidiurética (ADH) (vasopresina)	Péptido	Riñones		Estimula la absorción de agua y constricción de arteriolas
<b>Tiroides</b>	Triyodotironina (T <sub>3</sub> ) y L-tiroxina (T <sub>4</sub> )	Aminoácido yodado (amina)	Muchos tejidos	T <sub>4</sub> 777 T <sub>3</sub> 651	Crecimiento del esqueleto, consumo de oxígeno, producción de calor, aprovechamiento de proteína, grasa y carbohidratos; maduración perinatal del SNC.
	Calcitonina	Péptido	Huesos	3418	Estimula la formación de huesos, disminuye la [Ca <sup>2+</sup> ] del suero
<b>Paratiroides</b>	Hormona paratiroidea	Proteína	Huesos		Absorbe hueso, incrementa la [Ca <sup>2+</sup> ] en suero
<b>Corteza suprarrenal</b>	Cortisol (glucocorticoides)	Esteroides	Músculos, sistema inmunitario, otros tejidos	363	Mediana la respuesta al estrés, gluconeogénesis; antiinflamatoria, inmunosupresión, capacidad de reacción vascular a catecolaminas
	Aldosterona (mineralocorticoides)	Esteroides	Riñones	360	Incrementa la reabsorción renal de Na <sup>+</sup> , secreción de K <sup>+</sup> y secreción de H <sup>+</sup> .

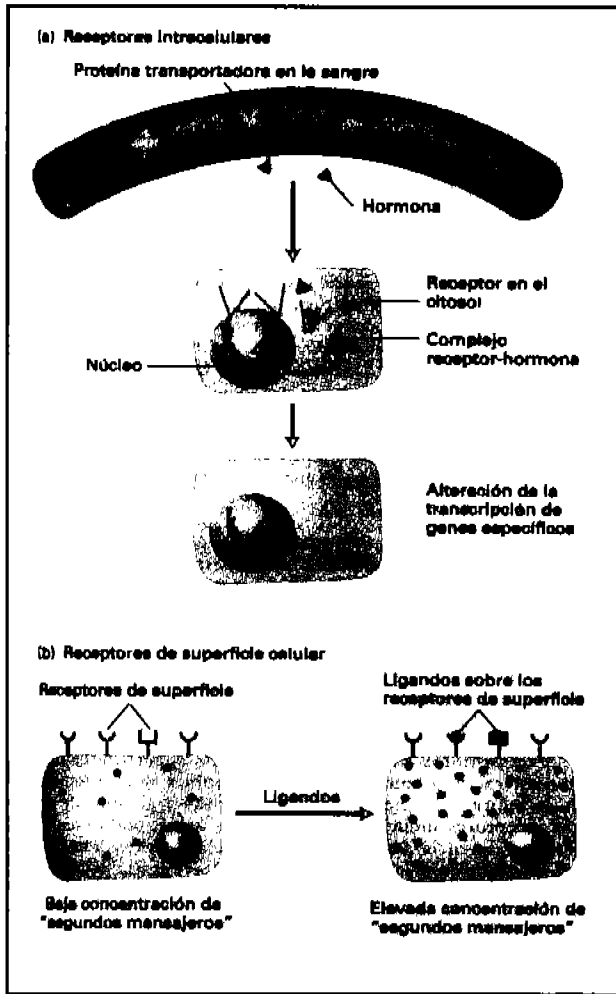
	Dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (andrógenos suprarrenales)	Esteroides			Véase acciones de testosterona de los testículos (más adelante).
<b>Testículos</b>	Testosterona	Esteroides	Varios tejidos	288	Estimulan el desarrollo y el mantenimiento del comportamiento sexual masculino y de sus caracteres sexuales secundarios, espermatogénesis.
<b>Folículo ovárico</b>	Estradiol	Esteroides	Mamas, útero, otros tejidos	262	Crecimiento y desarrollo del sistema reproductivo femenino; fase folicular del ciclo menstrual; desarrollo de mamas; mantenimiento del embarazo; secreción de prolactina, comportamiento sexual femenino.
<b>Ovario cuerpo amarillo</b>	Progesterona	Esteroides	Útero	314	Fase lútea del ciclo menstrual; mantenimiento del embarazo; ayuda a mantener los caracteres sexuales femeninos.
<b>Placenta</b>	Gonadotropina coriónica humana (HCG)	Péptido			Estimula la síntesis de estrógeno y progesterona en el cuerpo amarillo durante el inicio del embarazo.
	Lactógeno placentario humano (HPL) o somatomamotropina coriónica humana	Péptido			Acciones similares a la hormona de crecimiento y prolactina durante el embarazo.
	Estriol	Esteroides			Véase acciones del estradiol de los ovarios (antes)
	Progesterona	Esteroides		314	Véase acciones de progesterona de los ovarios (antes)
<b>Páncreas</b>	Insulina (células $\beta$ )	Proteína	Músculos, hígado, grasa, otros tejidos.	5600	Estimula la captación y metabolismo de glucosa, glucogénesis

<b>Riñón</b>	Glucagon (células $\alpha$ )	Proteína	Hígado	3483	Estimula la degradación de glucógeno y eleva la glucemia.
	Somatostatina	Péptido	Tracto digestivo, otras células del páncreas.		Inhibe la liberación de insulina y glucagon; disminuye la secreción, la motilidad y la absorción en el tracto digestivo
	Renina	Péptido			Cataliza la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I
	1,25-dihidroxicolecalciferol	Esteroides			Incrementa la absorción intestinal de $Ca^{2+}$ ; mineralización de hueso.
<b>Médula suprarrenal</b>	Epinefrina, norepinefrina	Aminoácidos modificados (aminas)	Corazón, vasos sanguíneos, hígado, células grasas.	183	Estimulan reacciones de lucha o huida; aumenta la frecuencia cardíaca, redistribuye la sangre en los músculos, elevan la glucemia.
<b>Corteza suprarrenal</b>	1. Glucocorticoides (cortisol)	Esteroides	Músculos, sistema inmunitario, otros tejidos	363	Median la respuesta al estrés; reducen el metabolismo de la glucosa; aumentan el metabolismo de las proteínas y las grasas; reducen la inflamación y la respuesta inmunitaria.
	2. Mineralocorticoides (aldosterona)	Esteroides	Riñones	360	Estimulan la excreción de $K^+$ y la reabsorción de $Na^+$ .
<b>Revestimiento del estómago</b>	Gastrina	Péptido	Estómago	2098	Liberación de jugos digestivos; estimula los movimientos que mezclan alimento con jugos gástricos.
<b>Revestimiento del Intestino delgado</b>	Secretina	Péptido	Páncreas	3055 (porcina)	Estimulan la secreción de una solución de bicarbonato por los conductos pancreáticos
	Colecistocinina	Péptido	Páncreas, hígado y vejiga urinaria	3946	Estimula la secreción de enzimas digestivas por el páncreas y de otros jugos digestivos por el hígado; estimula las contracciones de la vesícula y los conductos.
	Motilina	Péptido		27000	Inicia la motilidad intestinal interdigestiva, eleva la liberación de insulina.
<b>Pineal</b>	Enterogastrona	Poli péptidos	Estómago		Inhibe las actividades digestivas del estómago.

	Melatonina	Aminoácidos modificados	Hipotálamo	232	Involucrada en los ritmos biológicos.
<b>Muchos tipos de células</b>	Prostaglandinas	Ácidos grasos modificados	Varios tejidos	355	Poseen numerosas acciones diversas.
<b>Corazón</b>	Hormona natriurética auricular	Péptido	Riñones		Aumenta la excreción del ion Na <sup>+</sup> .
<b>Células del tejido adiposo</b>	Leptina	Péptido	Hipotálamo	167 aminoácidos	Rol principal en la regulación de la homeostasis del peso corporal, efecto sobre el apetito, reservas de grasas, implicancia en diversas vías metabólicas.

## 2.2 Clasificación de receptores hormonales por su localización celular.

Los receptores hormonales de acuerdo con la localización que tienen en la célula se clasifican en dos principales grupos: Los de membrana y los intracelulares (ver figura 2.2.1)<sup>13</sup>. A su vez cada uno de éstos tiene una subclasificación.



**Figura 2.2. 1** (a) Las hormonas esteroides, tiroxina y los retinoides son lipófilos, por lo que son llevadas por proteínas transportadoras de la sangre. Después de disociarse de los transportadores, estas hormonas se difunden a través de la membrana celular y se unen a receptores específicos en el citosol o en el núcleo. (b) Las hormonas polipeptídicas y las catecolaminas (p. ej., adrenalina) son hidrosolubles, mientras que las prostaglandinas son liposolubles; todas se fijan a receptores de superficie celular.<sup>13</sup>

### 2.2.1 Receptores localizados en la membrana plasmática:

1. Acoplados a proteínas G
  - Tiene como efector a adenilil ciclasa
  - Tiene como efector a Fosfolipasa C
  
2. Receptores con actividad enzimática
  - Tiene como efector a proteínas SH2
  - Tiene como efector a guanilil ciclasa

#### 3. Receptores con actividad enzimática intrínseca (citocinas)

(En el año 2003, se reportan modificaciones a la clasificación anterior, indicándose que los receptores con actividad enzimática intrínseca corresponden citocinas clase 1)<sup>27</sup>.

#### 2.2.1.1 Los receptores de membrana localizados en la superficie celular en general pertenecen a cuatro clases principales.

La unión de un ligando a alguno de estos receptores induce la formación de un segundo mensajero, a diferencia de la fijación de ligando a otros receptores. Por conveniencia se clasifican estos receptores en cuatro clases, de los cuales tres son hormonales<sup>13</sup>.

- **Receptores acoplados a proteína G** (figura 2.2.2 a): la fijación del ligando activa una proteína G, que a su vez activa o inhibe una enzima que genera un segundo mensajero específico o modula un canal iónico, lo cual genera un cambio de potencial de membrana. Son ejemplos los receptores de adrenalina, serotonina y glucagon<sup>13</sup>.
- **Receptores ligados a tirosina cinasa** (figura 2.2.2-c): estos receptores carecen de actividad catalítica intrínseca, pero la fijación del ligando estimula la formación de un receptor dimerico que luego interactúa con una tirosinacinas proteica del citosol o más y las activa. Los receptores de

muchas citocinas, los interferones y el factor de crecimiento humano pertenecen a este tipo. Esos receptores ligados a tirosinacinas a veces se denominan *superfamilia de receptores de citosina*<sup>13</sup>.

- **Receptores con actividad enzimática intrínseca** (figura 2.2.2-d): varios tipos de receptores tienen actividad catalítica intrínseca, que se activa con la fijación del ligando. Por ejemplo, algunos receptores activados catalizan la conversión de GTP a cGMP; otros actúan como **proteínofosfatasa**s, que eliminan grupos fosfato de los restos de fosfotirosina de las proteínas sustrato, por lo que modifican su actividad. Los receptores de insulina y muchos factores de crecimiento son **proteína cinasa**s inducidas por el ligando; en la mayoría de los casos, el ligando se une a un dímero, por lo que se produce la dimerización del receptor y la activación de su actividad de cinasa. Estos receptores —a menudo denominados **receptores de serina/treonina cinasa**s o **receptores de tirosina cinasa**s— autofosforilan restos de su propio dominio citosólico y también pueden fosforilar distintos sustratos proteicos<sup>13</sup>.
- **Receptores de canales iónicos** (figura 2.2.2-b): la fijación del ligando cambia la conformación del receptor, por lo que iones específicos fluyen a través de él<sup>13</sup>.

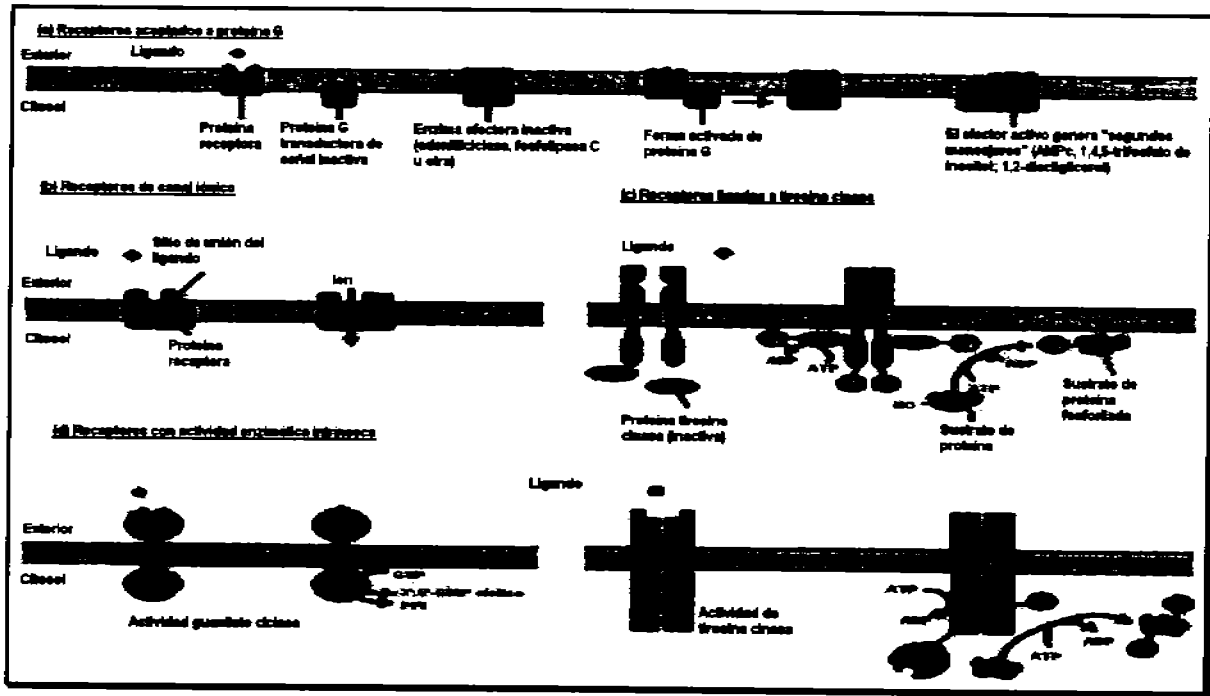


Figura 2.2 Las ligandos comunes para cada tipo de receptor se enumeran entre paréntesis. a) Receptores ligados a proteína G. La fijación del ligando (bordó) induce la activación de una proteína G, que entonces se une a una enzima que cataliza la síntesis de un segundo mensajero específico y lo activa. B) Receptores de canal iónico. Un cambio de conformación inducido por la unión con el ligando abre el canal para el flujo de iones. c) Receptores ligados a tirosina cinasa. La unión con el ligando produce la formación de un homodímero o un heterodímero, que induce la unión y al activación de una proteína tirosina cinasa del citosol. La cinasa activada fosforila las tirosinas del receptor; las proteínas sustrato se fijan entonces a estos restos de fosfotirosina y se fosforilan. d) Receptores con actividad enzimática inducida por el ligando intrínseco en el dominio citosólico. Algunos receptores activados son monómeros con actividad de guaniliciclase y pueden generar GMPc como segundo mensajero (izquierda). Los receptores de muchos factores de crecimiento tienen actividad de proteína tirosina cinasa intrínseca (derecha). La unión del ligando a la mayoría de estos receptores de tirosina cinasa induce la formación de un homodímero activado que fosforila varios restos en su propio dominio citosólico, además de determinadas proteínas sustrato<sup>13</sup>.



### 2.2.1.2 Los efectos de muchas hormonas son mediados por segundos mensajeros.

La unión de los ligandos a diversos receptores de superficie celular causa un incremento (o disminución) de corta duración en las concentraciones de las moléculas señal intracelulares denominadas **segundos mensajeros**. Estas moléculas señal de bajo peso molecular incluyen 3',5'-AMP cíclico (cAMP); 3',5'-GMP cíclico (cGMP); 1,2-diacilglicerol (DAG); 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>); distintos fosfolípidos de inositol (fosfoinosítidos) y Ca<sup>2+</sup> (Figura 2.2.3)<sup>13</sup>.

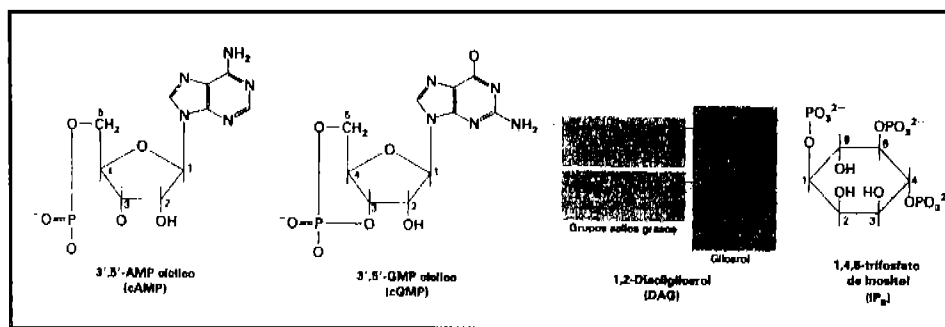


Figura 2.2.3 Formulas estructurales de cuatro segundos mensajeros intracelulares comunes. Se indican las abreviaturas. También actúan como segundos mensajeros el ión calcio (Ca<sup>2+</sup>) y varios fosfolípidos de inositol (fosfoinosítidos) unidos a membrana, pero no se presentan aquí<sup>13</sup>.

### 2.2.1.3 Las vías de señalización más comunes son iniciadas por distintos receptores de una clase.

Por lo general, distintos miembros de una clase particular de receptores transducen señales a través de vías muy conservadas. Más aún, se hallaron analogías en las vías de señales asociadas con distintas clases de receptores. La (figura 2.2.2) ilustra los principales componentes de las vías de señales clave corriente abajo de los receptores acoplados a proteína G (GPR) y los receptores de tirosina cinasas (RTK). Si bien una proteína GTPasa interruptora aparece en ambos tipos de vía, su posición difiere respecto del receptor. Los segundos mensajeros son componentes esenciales de la mayoría de las vías GPR y algunas

RTK. Las proteínas adaptadoras intervienen en todas las vías RTK, pero no en las principales vías GPR. Sin embargo, las proteínas cinasas desempeñan un papel clave en todas las vías de señales; por último, una proteína cinasa activada fosforila uno o más sustratos proteicos. La naturaleza de los sustratos proteicos, que incluyen enzimas, microtúbulos, histonas y factores de transcripción, desempeña un papel importante en la determinación de la respuesta celular a una señal particular, en una célula determinada<sup>13</sup>.

### **2.2.2 Receptores localizados intracelularmente**

1. Receptores en citosol (homodiméricos).
2. Receptores nucleares (heterodiméricos).

Todos los receptores nucleares poseen una región N-terminal singular de longitud variable (100 a 500 aminoácidos), con regiones que funcionan como dominios de activación de la transcripción. El dominio de fijación al ADN que está ubicado cerca del centro la secuencia primaria y presenta el motivo en dedos de zinc. El dominio de fijación a la hormona esta cerca del extremo C-terminal de estos receptores y contiene un dominio de activación hormonodependiente.

La unión de la hormona a un receptor nuclear regula su actividad como factor de transcripción. Esta regulación difiere en algunos aspectos para los receptores nucleares heterodiméricos y los homodiméricos. En contraste con los receptores nucleares heterodiméricos, presentes exclusivamente en el núcleo, los homodiméricos se hallan tanto en el núcleo como en el citoplasma y su actividad es regulada mediante el control de su transporte desde el citoplasma hacia el núcleo<sup>13</sup>.

Previos trabajos han demostrado que el receptor de glucocorticoides (GR), en ausencia de la hormona esta localizado en el citoplasma en un complejo con proteínas chaperonas las cuales forman conjuntamente un complejo aporeceptor<sup>26</sup>.

En ausencia de hormona, el GR se encuentra en el citoplasma, sólo después de la activación por el ligando, el receptor es conducido al núcleo. En el citoplasma el

receptor se encuentra formando un complejo multiproteico con otros factores de aproximadamente 300-330 KDa. El complejo contiene tres factores: el receptor de 100 KDa y dos proteínas, de 90 KDa y 59 KDa, que pertenecen a la familia de proteínas activadas por el calor, heat shock proteins (hsp), o chaperonas. El complejo consiste en una molécula de GR, dos de hsp 90 y una de hsp 56/59. El GR interactúa con hsp 90 a través de su región de unión a hormona (HBD, del Inglés hormone binding domain)<sup>35</sup>. Como ejemplo ver la figura 2.2.4

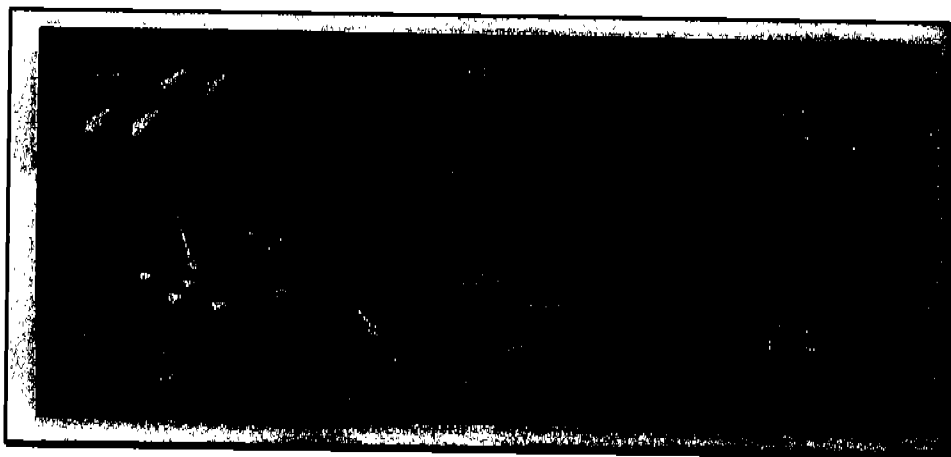


Figura 2.2. 4 Pasos en la activación de un gen por una hormona esteroide, como el glucocorticoide cortisol. La hormona penetra a la célula procedente del líquido extracelular (paso 1), difundiendo a través de la bicapa de lípidos (paso 2) y en el citoplasma, donde se enlaza a un receptor de glucocorticoides (paso 3). El enlace de la hormona cambia la conformación del receptor (paso 4) y provoca la translocación en el núcleo, donde actúa como factor de transcripción que se enlaza al elemento de respuesta a glucocorticoides del ADN (paso 5). El enlace de la hormona activa la transcripción del ADN (paso 6), lo que conduce a la síntesis de proteínas específicas en el citoplasma (paso 7) <sup>4</sup>.

Las llamadas proteínas de estrés (hsp) se descubrieron por azar a finales de los años sesentas. Se les considera conservadoras, en el sentido de que su estructura se ha mantenido poco alterada a lo largo del tiempo. Aumentan la supervivencia celular por una doble vía: evitan el desdoblamiento de las estructuras tridimensionales de las enzimas y reducen la acumulación de polipéptidos dañados o anormales.<sup>35</sup>

## 2.3 Receptor y ligandos específicos

Hay dos clases de estructura para los receptores hormonales de membrana. El primer grupo consiste en receptores con dominio multitransmembranal. El segundo grupo consiste en receptores con un solo dominio transmembranal.

La mayoría de receptores para péptidos hormonales y neurotransmisores están unidos a proteínas G<sup>5</sup>.

La vía de transducción de señales de ordinario contiene proteincinasas y fosfatasas, que parecen ser los agentes favoritos para provocar cambios reversibles rápidos en la actividad celular. Algunas de estas cinasas y fosfatasas son proteínas citoplasmáticas solubles; otras son proteínas integrales de membrana. Algunas de estas enzimas poseen gran número de proteínas como sustratos, en tanto que otras sólo fosforilan o desfosforilan a un sustrato de proteína único<sup>8</sup>.

A continuación se muestra una clasificación de los receptores hormonales basada en su localización celular, mostrando un ejemplo de su receptor más representativo o más estudiado.

1. Receptores unidos a proteínas G (multitransmembranal)
2. Receptores con actividad enzimática (transmembranal)
  - a. Fosforiladores, con actividad proteína cinasa (tirosina y serina/treonina), incluidos receptores con enzimas itinerantes.
  - b. Con actividad proteína fosfatasa
  - c. Con actividad guanilil ciclasa
3. Receptores intracelulares (citoplasmáticos y nucleares)

### 2.3.1. Receptores unidos a proteínas G.

Estos receptores están hechos de una sola cadena que contiene de 400 a 600 residuos de aminoácidos. La parte amino terminal posee sitios de N-enlazado glicosilados, mientras que la parte carboxilo terminal contiene los sitios de

fosforilación para una o más proteínas clinasas. Siete estrechos de 22 a 28 residuos hidrofóbicos conservados (siete helices  $\alpha$  fig.2-3-1) separados por los segmentos hidrofílicos, estos son rasgos estructuralmente característicos para estos receptores. Estos segmentos transmembranales presumiblemente formados estrechamente en un paquete helicoidal "envuelto" ( $\alpha$  hélice), que cruza la membrana una y otra vez<sup>8</sup>.

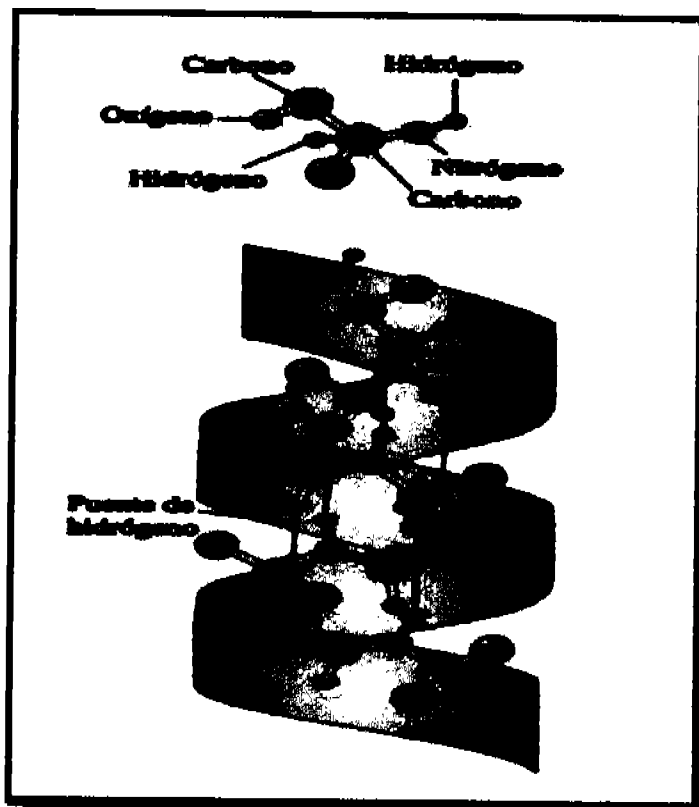
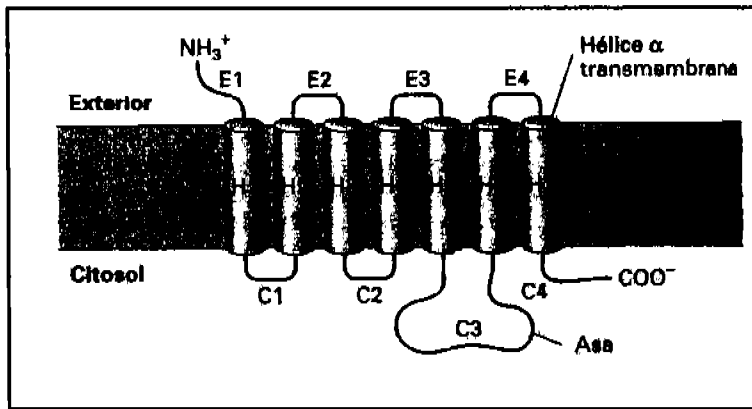


Figura 2.3.1 Estructura de  $\alpha$  hélice encontrada en las proteínas<sup>51</sup>.

Los segmentos transmembrana están conectados entre sí por asas extracelulares cortas sobre la superficie externa de la membrana, y asas intracelulares cortas sobre la superficie interna de la misma<sup>8</sup> (ver figura 2.3.2).



**Figura 2.3 2 Esquema de la estructura general de los receptores ligados a proteína G.** Todos los receptores de este tipo contienen siete regiones transmembrana  $\alpha$  helicoidales. El asa entre las hélices  $\alpha$  5 y 6, y en algunos casos el asa entre las hélices 3 y 4, orientadas hacia el citosol, son importantes para las interacciones con la proteína G acoplada. E1 - E4 = asas extracelulares; H1 - H7 = dominios transmembrana; C1 - C4 = asas citosólicas.<sup>13</sup>

### 2.3.2 Receptores con actividad enzimática.

#### 2.3.2.1 Receptores fosforiladores tirosina cinasa.

Se han identificado más de 50 diferentes receptores de tirosina cinasa (RTC) y su número aumenta con rapidez. A diferencia de los receptores acoplados a proteínas G, que tienen siete segmentos transmembrana, cada monómero de RTC atraviesa la membrana una sola vez<sup>8</sup>. Ver figura 2.3.3 El gen del receptor de la insulina está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 humano y esta constituido por dos exones distribuidos a lo largo de 150 Kb. Su transcripción da lugar a una proteína precursora que al ser procesada origina dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ . Ver figura 2.3.3

El receptor de insulina se expresa como un tetrámero, donde las dos cadenas  $\alpha$  (135 KDa) ricas en cisteínas y glicinas interactúan con la insulina. Estas cadenas se unen por puentes disulfuro a dos cadenas  $\beta$  (95 KDa) que atraviesan la membrana plasmática y cerca de la región carboxilo terminal se encuentran los residuos de tirosinas<sup>20</sup>. (Figuras 2.3.3 y 2.3.4)

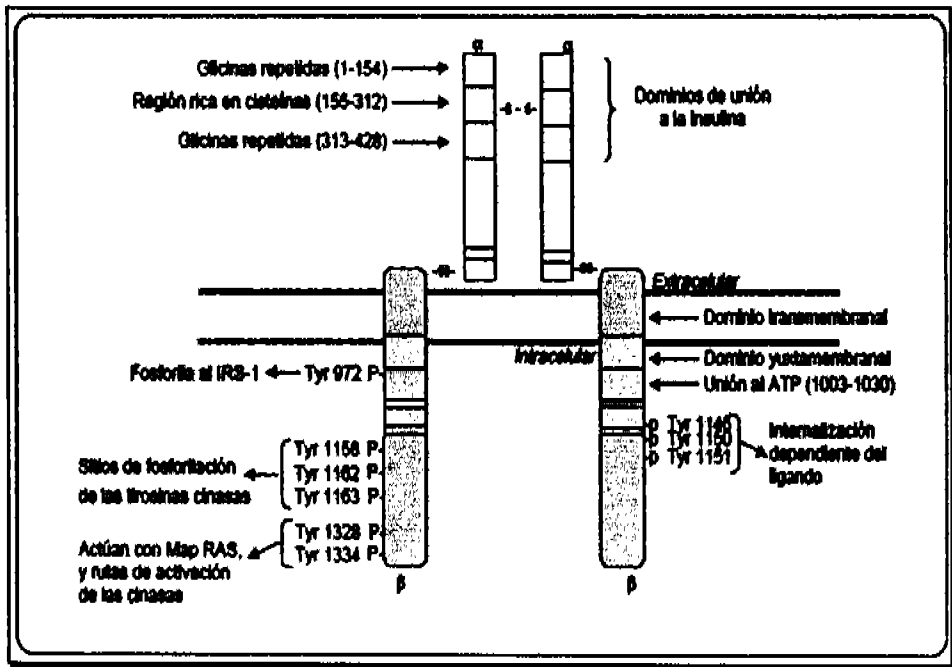


Figura 2.3.3 Receptor de insulina<sup>20</sup>.

La unión con la insulina en la porción extracelular de las cadenas  $\alpha$ , da como resultado la autofosforilación, específicamente de los residuos de tirosina en la porción citoplasmática de las cadenas  $\beta$ : dos en la región yuxtamembranal, tres en el dominio cinasa (catalítico), y dos más encontradas hacia la región C-terminal<sup>30</sup>. Ver figuras 2.3.4 y 2.3.5

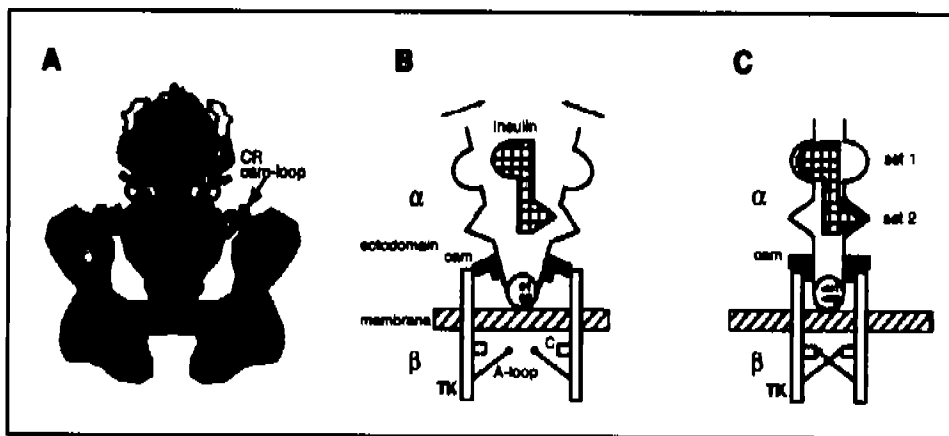


Figura 2.3. 4 Estructura cuaternaria para el receptor de insulina. (A) Representación de la estructura del receptor de insulina, determinada por microscopía electrónica. (B y C) Esquema simplificado del cambio de orientación durante la activación del receptor de insulina<sup>20</sup>.



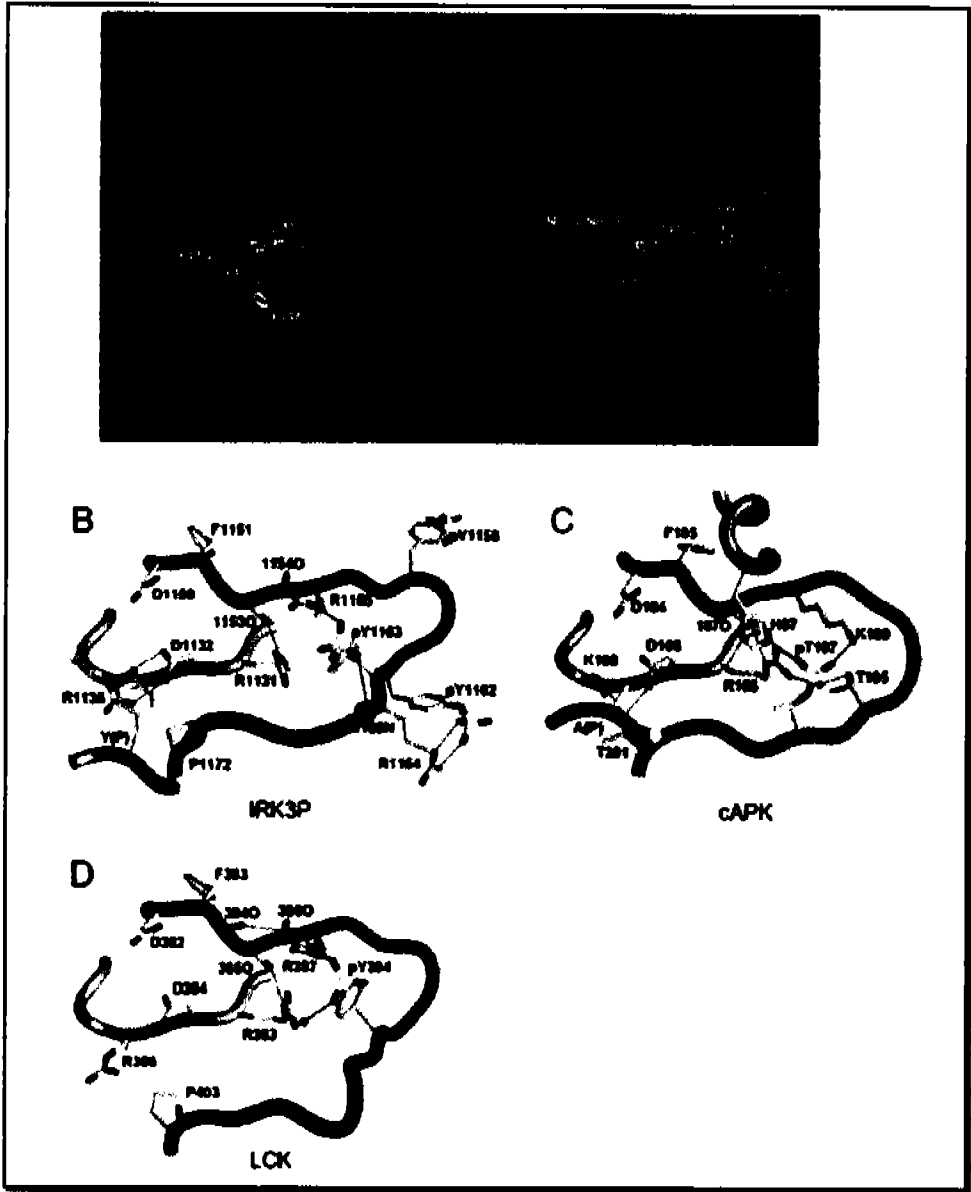


Figura 2.3.5 La imagen muestra el cambio conformacional y las zonas en las cuales se lleva a cabo dichos cambios donde IRK es el receptor de insulina antes de la unión con la hormona<sup>30</sup>.

### 2.3.2.2 Receptores fosforiladores serina/treonina cinasa

A diferencia del receptor de insulina descrito antes, la mayor parte de los RTC se presentan como monómeros en una célula no estimulada. Sólo después que un ligando se une al RTC los monómeros interactúan entre sí para formar dímeros. La dimerización de los polipéptidos RTC activa su función de tirosinacinasas y entonces una subunidad del dímero fosforila algunos residuos de tirosina situados en el dominio citoplásmico de la otra subunidad del dímero<sup>8</sup>.

Los receptores para los factores de crecimiento y transformación beta (TGF  $\beta$ ) son quizá de los mejor conocidos entre los receptores con actividad serina/treonina cinasa (ver figura 2.3.6). Existen tres tipos, cada uno de ellos con acciones diferentes. El receptor tipo III o beta glicano no tiene actividad, se ha propuesto que sirve como "antena" que captura y pasa los factores a otros receptores. Ver figura 3.2.2

Tanto los receptores tipo I como los tipo II son proteínas que atraviesan la membrana en una ocasión; tienen por lo tanto un dominio extracelular, uno transmembranal y un dominio citoplásmico. El receptor II que tiene actividad de serina/treonina cinasa, fija al mensajero (TGF  $\beta$ )<sup>3</sup>. El peso molecular aproximado de estos receptores de la activina es 65 y 85 KDa para el tipo I y II respectivamente. Para el receptor tipo II el péptido maduro contiene 494 aminoácidos y en el dominio extracelular dos sitios de N-glicosilación y 10 residuos de cisteína<sup>32</sup>.

En comparación con los receptores para activina, los de TGF  $\beta$  son tres polipéptidos distintos con pesos moleculares aparentes de 55, 85 y 280 kDa tipo I, II, y III respectivamente. Ver figura 2.3.6



**Figura 2.3.6** Representación de la superficie molecular del dominio de unión extracelular del receptor de activina. Se muestran los sitios más conservados entre dos tipos de este receptor, están coloreados en café los enlaces hidrofóbicos y aromáticos, y en rojo las cargas polares. a, muestra el lado cóncavo de la molécula. b, Esta vista muestra el lado convexo de la molécula. c, El acercamiento muestra una pequeña parte conservada, cercana de la parte a dejando ver moléculas acuosas (como esferas azules)<sup>29</sup>.

### 2.3.2.3. Receptores con enzimas itinerantes (ahora receptores de la familia de las citocinas)

Algunos receptores que son proteincinasas no tienen los dominios enzimáticos intracelulares, sino que, en respuesta a los agonistas, se ligan o activan a proteincinasas citosólicas independientes o embebidas en la membrana. Entre los receptores de esta familia que desencadena la fosforilación de tirosina destacan varios obtenidos de péptidos neurotrópicos en los receptores antigénicos de múltiples subunidades en los linfocitos T y B<sup>4</sup>.

Hay datos que señalan que los receptores antigénicos también incluyen tirosinfosfatasas proteínicas, en su actividad reguladora celular y es posible que otros receptores que al parecer no tienen dominios de efector citoplasmático puedan reclutar aún otras proteínas efectoras<sup>4</sup>.

Estos receptores pertenecen a la familia de las citocinas clase 1, que incluye receptores de interferón, interleucina 2 y hormona del crecimiento (GH). Existen diferentes isoformas de estos receptores<sup>45</sup>. Tanto el receptor de prolactina (PRLR) como el de la hormona de crecimiento (GHR) atraviesan en una ocasión la membrana con la porción N-terminal comprendiendo el dominio extracelular (sitio de unión de la hormona), y la porción C-terminal en el dominio intracelular (sitio de señalización). La isoforma clásica es la forma "larga" que aproximadamente contiene 600 aminoácidos (591 para PRLR y 620 para GHR) y es considerada como la forma activada por el ligando<sup>27</sup>.

Estos receptores utilizan un mecanismo recientemente descubierto muy similar al del receptor de tirosinas cinasas, pero con una diferencia. En este caso, la actividad de la proteína tirosina cinasa no es intrínseca a la molécula del receptor; en su lugar, una proteína tirosina cinasa particular de la familia de las Janus-Cinasa (JAC) o (JAK por sus siglas en inglés) se une al receptor de manera no covalente<sup>2</sup>.

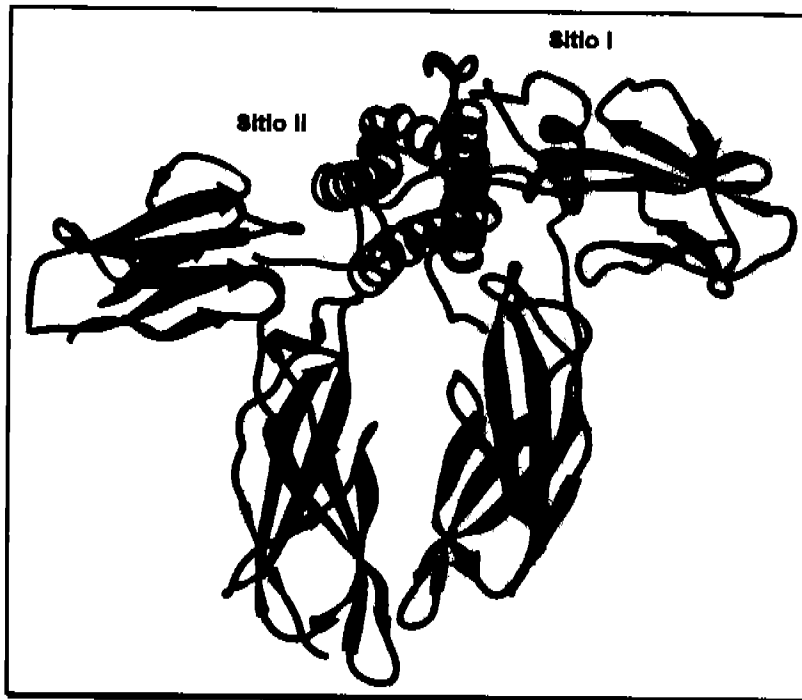
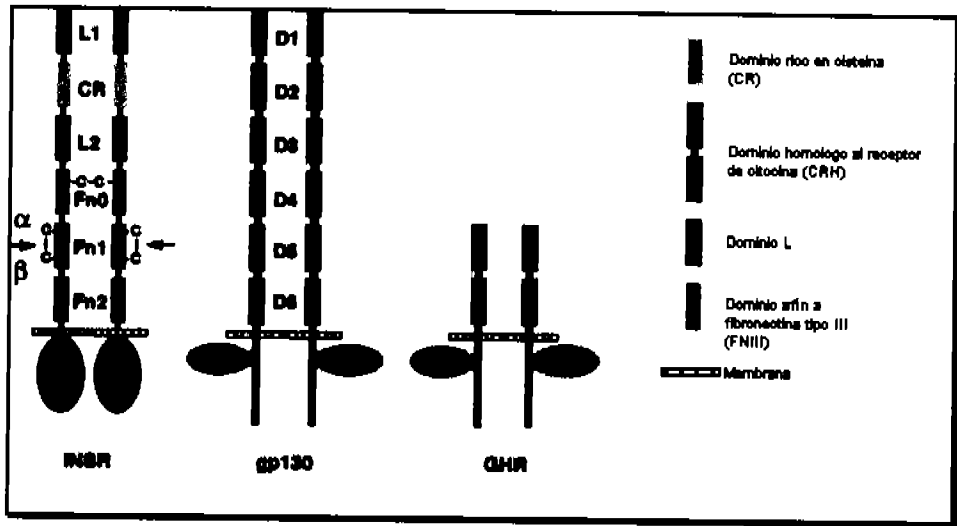


Figura 2.3. 7 El complejo del receptor de la hormona de crecimiento. La representación en cinta obtenida por rayos X, muestra la estructura de la hormona de crecimiento (en verde) así como el complejo del receptor para la hormona de crecimiento (en rojo y azul)<sup>30</sup>.

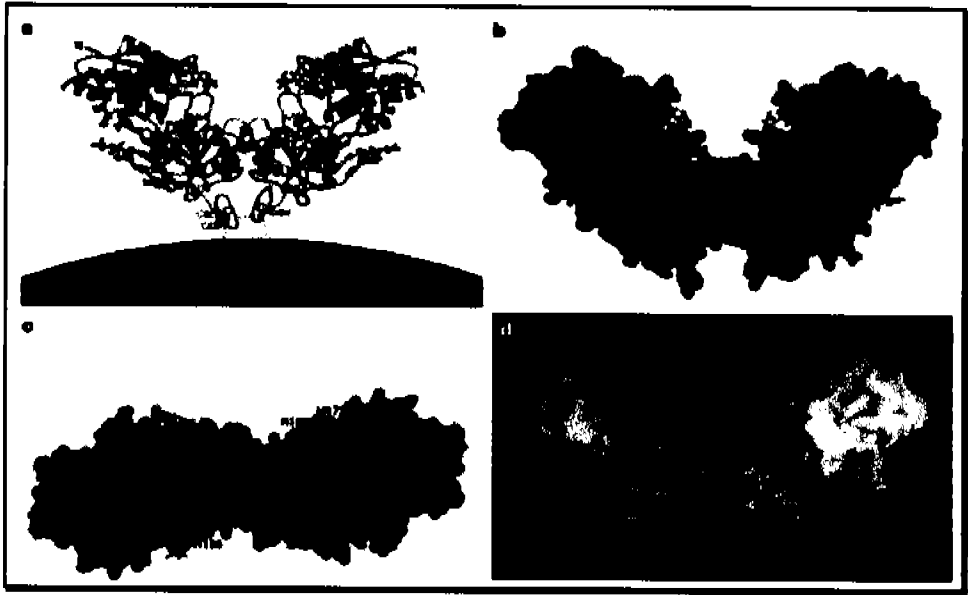
#### 2.3.2.4 Receptores con actividad fosfatasa.

Todas las proteínas fosfatasas estudiadas hasta ahora son enzimas citoplásmicas solubles. Recientemente, se descubrió una nueva clase de fosfatasas que atraviesan la membrana plasmática y al parecer actúan como receptores de superficie celular que participan en la transmisión de señales celulares y en la adherencia entre células. Estas moléculas se denominan *fosfatasas parecidas a receptores de proteintirosina (FRPT)*<sup>8</sup>.

#### 2.3.2.5 Receptores con actividad guanilil ciclasa.

Los receptores de este tipo poseen una larga porción extracelular con la que interactúan con los mensajeros, una breve zona transmembranal y el segmento intracelular donde se encuentra la guanilil ciclasa<sup>3</sup>.

El receptor del factor auricular natriurético (ANF) pertenece a la familia de los receptores guanilil ciclasa unidos a la membrana. El ANF receptor comprende un dominio de unión a la hormona extracelular, una corta región disulfuro en forma de bisagra, un dominio transmembranal, un dominio afín a cinasas, un dominio súper enrollado y el dominio catalítico guanilil ciclasa. Este monómero comprende dos subdominios interconectados, cada uno abarcando una región central helicoidal – por láminas en los costados- , que muestran el tipo I del plegamiento de proteína de unión. Una zona de unión a cloruro localizada en la parte distal del dominio membranal, que se ha encontrado ser cloruro dependiente (fig. 2.3.8)<sup>16</sup>.



**Figura 2.3.8 Estructura cristalográfica del receptor dimérico ANF del dominio de unión a la hormona.**  
 a. El diagrama de cintas muestra los enlaces; disulfuro (rojo), glicosilación (bolas y palos púrpuras), sitios de glicosilación desordenados (las esferas púrpuras), y uniones clorhídricas (amarillo). El carbono terminal extrapolado del segundo monómero (azul) y dos hélices transmembranales modeladas. b. El sitio de unión ANF en el receptor, se muestra en el modelo espacial por rellenar. M173 y H195 (azul), E169 y H185 (rojo), H185 y A202 (verde), Y88 y Y120, se resaltan los residuos 98, 113, 115, 158, 166 y los E169 comunes (castaño ligero, 115 esta oculto a la vista) es estructuralmente equivalente a residuos de AmiR<sup>6</sup>. La gris oscura 262-269 alcanzan a unirse encima del segundo monómero formando una superficie cóncava de un borde, que es el sitio de unión involucrado en las interacciones con la hormona. c. Como b pero girado 85° sobre el eje de las abscisas. d. Representación de la superficie electrostática generada por GRASP<sup>29</sup>, con las cargas positivas y negativas en azul y rojo respectivamente, y la cavidad putativa efectora marcada como "E"<sup>16</sup>.

## 2.4 Receptores Intracelulares (e). receptor de glucocorticoides)

El receptor de glucocorticoides es miembro de la superfamilia de receptores nucleares, que incluyen a los receptores de hormonas esteroideas, retinoides, activadores peroxisomales, vitamina D, hormonas tiroideas, ciertos reguladores en el desarrollo temprano de *Drosophylla* y otras proteínas de función desconocida<sup>1</sup>.

El dominio ADN-emparejado de los receptores nucleares es caracterizado por el modelo de ocho cisteínas, donde en el receptor de glucocorticoides está coordinado por dos iones de Zn<sup>2+</sup> cada cual con geometría tetraédrica. En

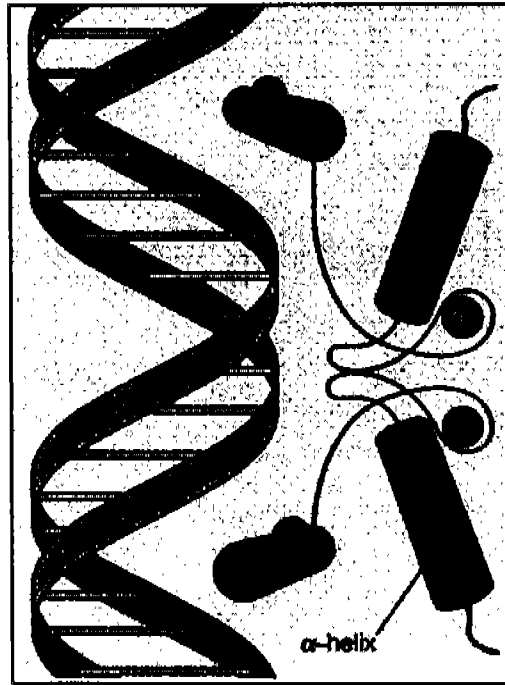
coordinación con el metal, los péptidos enlazados forman una superficie similar a "dedos de Zn" descritos originalmente en el factor de transcripción IIIA (TF IIIA) de *Xenopus*<sup>22</sup>.

El grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas es excelente para unir metales, - particularmente el zinc-, por lo que estos residuos forman parte tanto de motivos estructurales conocidos como los dedos de zinc<sup>22</sup>.

Los dedos de zinc, cuya función es unir ADN y ARN, se encuentran en factores de transcripción de eucariotes, en receptores hormonales nucleares, en enzimas del metabolismo de ácidos nucleicos, como topoisomerasas, en otras enzimas como la proteína cinasa C, en la subunidad reguladora de la aspartato transcarbamoilasa y en proteínas antivirales<sup>22</sup>.

El receptor contiene cuatro regiones funcionales: el dominio de unión al DNA (DBD, del inglés DNA binding domain), el dominio de unión a hormona (HBD) y dos dominios de transactivación (figura 2.4.1)<sup>18</sup>.





**Figura 2.4.1 Estructura del GR.** El receptor consta de cuatro dominios: dominio de unión al DNA (DBD) importante en la dimerización (caja D) y la especificidad de unión (caja P), dominio de unión a la hormona (HBD), importante en la dimerización y que contiene en la región AF2 que, junto con la región AF1 constituyen los dominios de transactivación<sup>49</sup>.

- **Dominio de unión al DNA:** la estructura del DBD consiste en dos dedos de zinc formados por cuatro residuos de cisteínas con un átomo de zinc. La región aminoterminal del dedo de zinc contacta con el surco mayor de la doble hélice de DNA, estando implicada en la especificidad de unión del receptor al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), constituyendo la caja P. La especificidad de la unión del receptor a la secuencia del GRE del DNA viene también determinada, en parte por los tres aminoácidos adyacentes al primer dedo de zinc. El segundo dedo de zinc en la región carboxiterminal también es necesario para la unión del DNA, ya que mutaciones en esta región generan un receptor inactivo<sup>49</sup>.

- Dominio de unión a la hormona: está localizado en la región carboxiterminal del receptor; tiene dos isoformas a y b; la forma a se diferencia de la b en los últimos 50 aminoácidos y es incapaz de unir a la hormona<sup>49</sup>.
- Dominios de transactivación: el GR contiene dos dominios de transactivación denominados t1 y t2 que son esenciales para la transactivación y actúan independientemente de la posición que ocupen<sup>49</sup>.

El GR se encuentra en el citoplasma asociado a hsp 90 en estado fosforilado; sin embargo en presencia de hormona el receptor se encuentra hiperfosforilado.

El GR contiene dos regiones de localización nuclear (NLS, del inglés nuclear localizing sites) que median la translocación del receptor al núcleo. La NLS1 se encuentra adyacente al segundo dedo de zinc y la NLS 2 se asocia al HBD y su función está también controlada por ligando. Se piensa que la translocación nuclear del GR es mediada por proteínas mediadoras que reconocen y se unen a la NLS<sup>49</sup>.

Los receptores de esteroides pertenecen a una gran familia evolutivamente relacionada con factores de transcripción, conocida como superfamilia de receptores nucleares. Esta familia cuenta con 48 miembros también incluidos los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico y vitamina D junto con otros receptores de variados ligandos<sup>17</sup>.

Ha sido demostrada la existencia de un receptor específico para T3 y T4 en la membrana mitocondrial interna, que es el lugar donde ocurre la fosforilación oxidativa<sup>7</sup>.

Estos receptores sólo existen en los tejidos que responden a las hormonas de la tiroides, estando ausentes en los otros tejidos reconocidamente insensibles a esas hormonas, como el encéfalo y el testículo<sup>7</sup>.

### 3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES RELACIONADAS CON RECEPTORES.

#### **3.1 Receptores acoplados a proteínas G** <sup>8,12,13,27,49</sup>.

La vasta mayoría de los receptores de membrana, pertenecen a la superfamilia de receptores unidos a proteínas G; los cuales actualmente se estima que ocupan aproximadamente el 1% de los genes presentes en el genoma mamífero<sup>21</sup>. Las proteínas G constan de tres tipos de subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  es el componente de fijación del nucleótido de guanina y se cree que interacciona indirectamente con el receptor a través de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , a continuación, directamente con un enzima, lo que da como resultado la activación de la enzima. El caso más conocido es el de la activación de la enzima **Adenililciclasa** por ligado de H-R y activación de proteínas G, mecanismo que describimos a continuación<sup>49</sup>.

En realidad existen dos formas de la subunidad  $\alpha$ , designadas  $\alpha_s$ , la subunidad  $\alpha$  estimuladora y  $\alpha_i$  para la subunidad  $\alpha$  inhibidora. Dos tipos de receptores, y por tanto de hormonas, controlan la reacción de la adenililciclasa: hormona-receptores que dan lugar a una estimulación de la adenililciclasa, y aquellos que dan lugar a una inhibición de la ciclasa (figura 3.1.1)<sup>49</sup>.

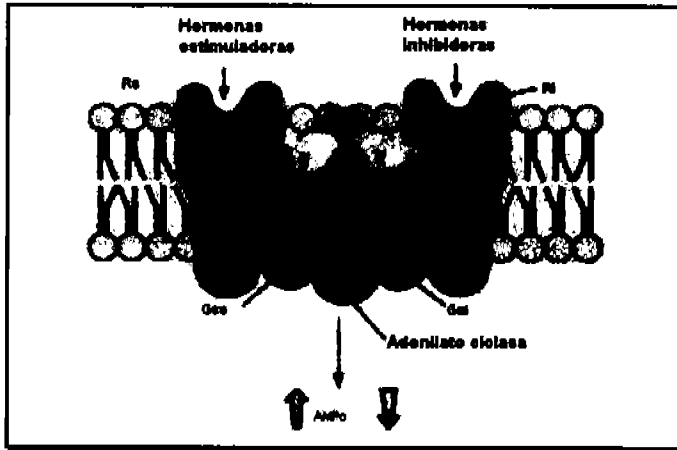


Figura 3.1. 1 Componentes de un sistema adenililciclase sensible a hormona y composición de las subunidades<sup>49</sup>.

La hormona se une al receptor en la membrana figura 3.1.2 (Paso 1); esto produce un cambio conformacional en el receptor que deja expuesto un sitio para la fijación de proteína G subunidad β y γ (Paso 2); la proteína G puede ser tanto estimuladora, Gs, como inhibidora, Gi, en relación con el efecto final sobre la actividad de la adenililciclase; el receptor interactúa con la subunidad β y de la proteína G permitiendo que la subunidad α intercambie el GDP unido por GTP (Paso 3); la disociación de GDP provoca la separación entre la subunidad α y la subunidad β y de la proteína G con lo que en la superficie de la subunidad α de la proteína G se origina un sitio de unión para la interacción con la adenililciclase (Paso 4); la subunidad α se une a la adenililciclase y activa el centro catalítico, de modo que el ATP es convertido en cAMP (Paso 5); el GTP se hidroliza a GDP por la actividad GTPasa de la subunidad α, devolviéndola a su conformación original y permitiendo de nuevo su interacción con la subunidad β y γ (Paso 6); el GDP se asocia con la subunidad α y el sistema retorna al estado no estimulado en espera de otro ciclo de actividad. Es importante destacar las pruebas que sugieren que los complejos β, γ pueden desempeñar funciones importantes en la regulación de determinados factores, incluida la adenililciclase (figura 3.1.2)<sup>49</sup>.

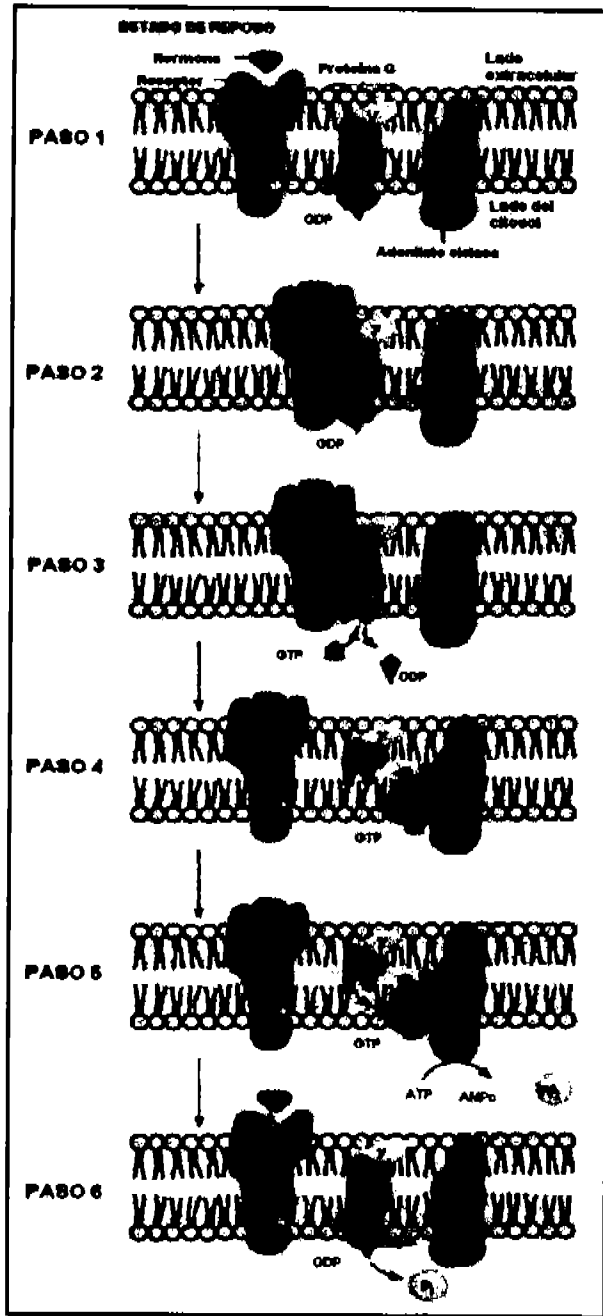


Figura 3.1. 2 Activación de la adeniliclasa por unión de una hormona a su receptor.<sup>49</sup>

En el caso en que una proteína G inhibidora se acople al receptor, los fenómenos son similares, pero la inhibición de la actividad adenililciclase puede producirse aquí por interacción directa de la subunidad  $\alpha$  inhibidora con la adenililciclase o, alternativamente, la subunidad  $\alpha$  inhibidora puede interactuar directamente con la subunidad  $\alpha$  estimuladora del otro lado y evitar así indirectamente la estimulación de la actividad adenililciclase. Diversos experimentos han permitido identificar al menos 15 genes distintos que codifican las subunidades  $\alpha$  en mamíferos. También parece existir diversidad entre las formas  $\beta$  y  $\gamma$  de mamíferos. Se han descrito al menos 4 DNAs de subunidades  $\beta$  y probablemente un número igual en las  $\gamma$ <sup>49</sup>.

Un mecanismo similar de activación de proteínas G se propone para la activación de la guanilatociclase, enzima que cataliza la síntesis de  $GMP_c$  a partir de  $GTP$ <sup>49</sup>.

### **3.1.1 Segundos mensajeros**

#### **3.1.1.1 AMP cíclico.**

La formación de cAMP en la célula normalmente activa la proteína quinasa A, lo que se denomina ruta de la proteína quinasa A. La ruta completa utiliza cuatro moléculas de cAMP en la reacción que forma un complejo entre dos subunidades reguladoras (R), liberándose dos subunidades catalíticas (C) de la proteína quinasa. Las subunidades catalíticas de proteinquinasa A liberadas son capaces de fosforilar proteínas para producir un efecto celular (figura 3.1.3)<sup>49</sup>.

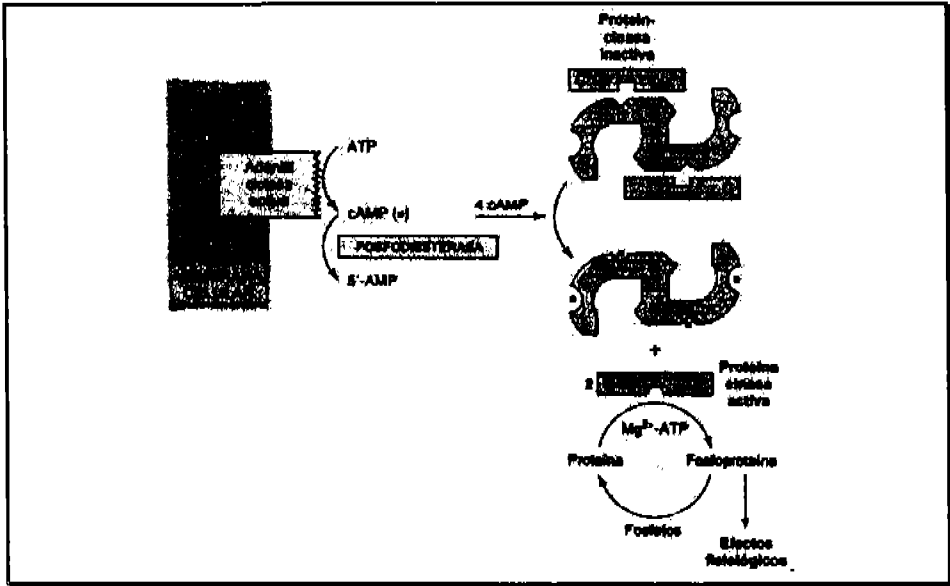


Figura 3.1. 3 Regulación hormonal de procesos celulares a través de proteína cinasas dependientes de AMPc. El AMPc (\*) generado por la acción de adenililciclasa se une a la subunidad reguladora © de la proteína cinasa dependiente de AMPc . El resultado es la liberación y activación de la subunidad catalítica ©<sup>49</sup>.

### 3.1.1.2 IP3, DAG, Calcio-calmodulina.

El descubrimiento del regulador de la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de calcio proporcionó la base para comprender la manera en que el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{AMP}_c$  interactúan dentro de la célula. El término con el que se conoce ahora a la proteína reguladora dependiente del calcio es calmodulina, una proteína de 17 KDa homóloga a la proteína muscular troponina C en estructura y función. La calmodulina tiene cuatro sitios para fijación del calcio y la ocupación total de estos sitios conduce a un cambio notable de la conformación, de modo que la mayor parte de la molécula asume una estructura de hélice alfa. Se presume que este cambio de conformación confiere a la calmodulina la propiedad para activa o inactivar enzimas (por ejemplo, adenil ciclasa, fosfolipasa  $\text{A}_2$ , glicerol-3 fosfato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, piruvato dashidrogenasa, proteína cinasa dependiente  $\text{Ca}^{2+}$ /fosfolípido entre otras)<sup>49</sup>. La interacción de calcio con la

calmodulina (con el cambio resultante de actividad de la última) es conceptualmente análoga a la fijación del AMPc a la proteína cinasa y la activación subsiguiente de esta molécula. Con frecuencia, la calmodulina es una de las subunidades reguladoras de proteínas oligómeras, entre ellas varias cinasas y enzimas, participando en el metabolismo de combustibles como en la generación y degradación de nucleótidos cíclicos y el transporte de iones. Además de estos efectos, el complejo calcio/calmodulina regula la actividad de numerosos elementos estructurales en las células. Entre otros el complejo actina-miosina del músculo liso, que está bajo control beta adrenérgico, y varios procesos mediados por microfilamentos en las células no contráctiles inclusive la movilidad de la propia célula, los cambios conformacionales, la mitosis, la liberación de gránulos y la endocitosis<sup>49</sup>.

Los niveles de calcio citosólicos pueden modificarse tanto por ingreso del calcio extracelular como por la liberación desde su principal depósito intracelular: el retículo endoplásmico.

La variación de los niveles de calcio puede controlarse directamente por ligado de la hormona al receptor (ej: neurotransmisores) tanto como a través de las modificaciones en los niveles de IP3- DAG por acción de la fosfolipasa C (ej: insulina)<sup>49</sup>.

Una hormona que opera a través de este sistema se une a un receptor específico de la membrana celular, que interacciona con una proteína G (Paso 1) (ver figura 3.1.4) según un mecanismo similar al de la ruta de la proteína quinasa A y transduce la señal, lo que da como resultado la estimulación de fosfolipasa C (Paso 2). Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para formar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) (Paso 3)<sup>49</sup>.

El inositol 1,4,5-trisfosfato difunde hacia el citoplasma y se une a un receptor de IP3 en la membrana de un depósito de calcio, que puede estar separado del retículo endoplasmático, o bien formar parte del mismo. Esta unión da como resultado la liberación de iones calcio, que contribuye a un gran incremento del calcio citoplasmático (Paso 4)<sup>49</sup>.



Por otro lado, el IP<sub>3</sub> se metaboliza por eliminación progresiva de grupos fosfato hasta formar inositol. Este se combina con ácido fosfatídico (PA) para formar fosfatidilinositol (PI) en la membrana celular. Este último es fosforilado doblemente por una quinasa para formar PIP<sub>2</sub>, que bajo estímulo hormonal ya puede entrar en otra ronda de hidrólisis y formación de segundos mensajeros (DAG e IP<sub>3</sub>). Si el receptor todavía está ocupado por una hormona, pueden producirse varias rondas del ciclo antes de que se disocie el complejo hormona-receptor. Por último, es importante destacar que no todo el IP<sub>3</sub> es desfosforilado durante la estimulación hormonal. Parte del IP<sub>3</sub> es fosforilado mediante la IP<sub>3</sub> quinasa para dar lugar a inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP<sub>4</sub>), que puede mediar en algunas de las respuestas hormonales más lentas o prolongadas —a través de la activación de cascadas de quinasas/fosfatasas— con la modificación final de la expresión genética (figura 3.1.4). El DAG activa la ruta de la proteína quinasa C. Simultáneamente al aumento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático inducido por el IP<sub>3</sub>, el cual procede de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, el DAG produce diversos efectos. El DAG activa una importante proteína quinasa de serina/treonina denominada proteína quinasa C por su dependencia de calcio. El aumento inicial del calcio citoplasmático inducido por IP<sub>3</sub> parece alterar de algún modo la proteína quinasa C, de modo que ésta es translocada desde el citoplasma hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Paso 5). Una vez translocada, es activada por una combinación de calcio, DAG y el fosfolípido negativo de la membrana, fosfatidilserina. Tras su activación, la proteína quinasa C fosforila proteínas específicas en el citosol o, en ocasiones, en la membrana plasmática. Estas proteínas fosforiladas llevan a cabo funciones específicas que no pueden realizar en el estado desfosforilado (Paso 6). Por ejemplo, una proteína fosforilada podría migrar hasta el núcleo e incrementar la mitosis y el crecimiento. Además, el sistema IP<sub>3</sub>-DAG puede modificar la actividad de una familia de enzimas llamadas genéricamente fosfodiesterasas, de las cuales es más abundante la fosfodiesterasa 1 (FD1), cuya activación permite la destrucción de moléculas de cAMP. De este modo hormonas cuyo segundo mensajero es el IP<sub>3</sub> pueden reducir los niveles de cAMP en forma indirecta<sup>49</sup>.

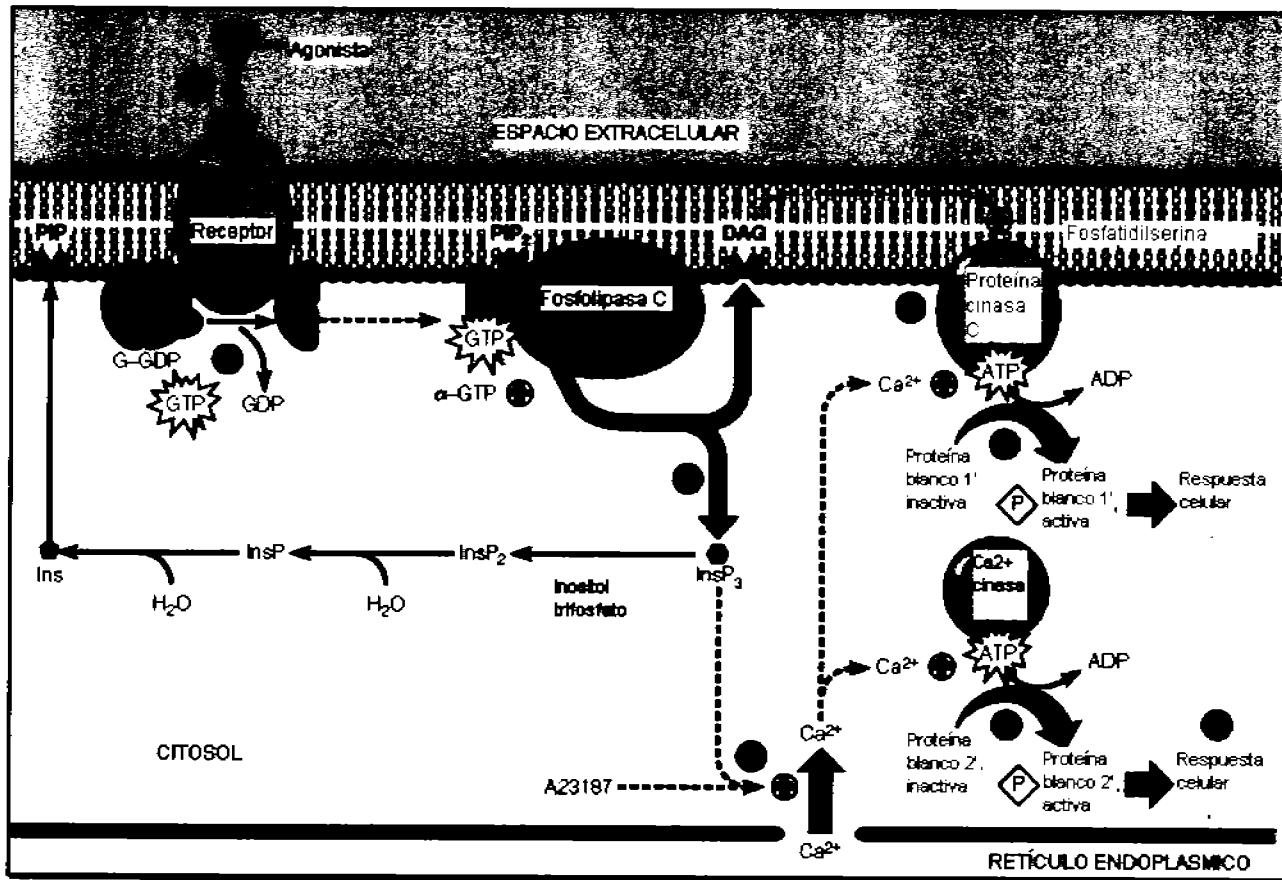


Figura 3.1. 4 Proceso de la regulación de calcio<sup>99</sup>.

## 3.2 Receptores con actividad enzimática.

### 3.2.1 Transducción a través de tirosina cinasa: el receptor de insulina.

Las subunidades  $\alpha$  del receptor de insulina se localizan fuera de la membrana celular y aparentemente constituyen el sitio de unión de la insulina. El complejo insulina-receptor experimenta una secuencia de activación que probablemente incluye cambios conformacionales y fosforilaciones (autofosforilaciones) de residuos de tirosina localizados en la porción citoplasmática del receptor (subunidades  $\beta$ ). Esto da como resultado la activación de la actividad tirosina cinasa ubicada en la subunidad  $\beta$ , que ahora es capaz de fosforilar proteínas citoplasmáticas que pueden transmitir la señal de insulina al interior de la célula. El resultado neto de estas fosforilaciones incluye una serie de efectos metabólicos a corto plazo, por ejemplo un aumento en la captación de glucosa, así como también efectos a largo plazo de la insulina en la diferenciación celular y el crecimiento. Aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, el propio receptor de la insulina es una tirosina cinasa que se activa por la unión de la hormona, las fosforilaciones que ocurren a continuación se dan predominantemente en residuos de serina y treonina. También se muestra que la insulina puede estimular simultáneamente la fosforilación de algunas proteínas y la desfosforilación de otras. Ambos sucesos bioquímicos pueden conducir a la activación o la inhibición de enzimas específicas implicadas en la mediación de los efectos de la insulina. Estos procesos opuestos (fosforilación y desfosforilación) mediados por la insulina pueden sugerir que estas acciones pleiotrópicas se deban a rutas separadas de transducción de señal originadas a partir del receptor de la insulina. Los sustratos de la tirosina cinasa del complejo insulina-receptor constituyen en la actualidad un importante campo de investigación; ya que las proteínas fosforiladas podrían ser las responsables de los efectos de la insulina a largo plazo. La actividad directa de fosforilación de la tirosina cinasa del receptor, podría explicar también el movimiento de receptores de glucosa (transportadores) desde el interior de la célula hasta la superficie para dar cuenta del aumento en la utilización de glucosa

celular en células que usan este mecanismo para controlar la incorporación de glucosa<sup>49</sup>.

Se plantea como esquema hipotético de la transducción de la señal en la acción de la insulina, lo siguiente (Ver figura 3.2.1).

Tras la unión de la hormona, el receptor de la insulina es autofosforilado en las tirosinas y se activa la cinasa. El receptor fosforila sustratos intracelulares, incluidas las proteínas IRS-1 y Shc, las cuales, después de ser fosforiladas, se asocian con proteínas que contienen dominios SH2, como p85, SYP o Grb2. La formación del complejo IRS1-p85 activa la PI 3-cinasa; el complejo IRS-I-SYP activa la SYP lo cual conduce a la activación del MEK. El complejo Shc-Grb2 hace de mediador en la estimulación de la unión de GTP a la P21 Ras, lo cual desencadena una cascada de fosforilaciones. Estas fosforilaciones probablemente se dan de forma secuencial, y en ellas interviene el protooncogén raf, la MEK, la cinasa de MAP y la quinasa II de S6. Es probable que el receptor se acople por separado a la activación de una fosfolipasa C específica que cataliza la hidrólisis de las moléculas de glucosil-PI en la membrana plasmática. El inositol fosfato glucano (IPG), producto de la reacción anterior puede actuar como segundo mensajero, especialmente en lo que se refiere a la activación de fosfatasa de serina/treonina y la posterior regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos<sup>49</sup>.

(Abreviaturas: IRS-1, sustrato-1 del receptor de la insulina; SH, homología src, cinasa de MAP cinasa de la proteína activada por mitógenos; MEK, cinasa de MAP; GPI, glucosil fosfatidil inositol; PLC; fosfolipasa C; SOS, "son of sevenless".)<sup>49</sup>.

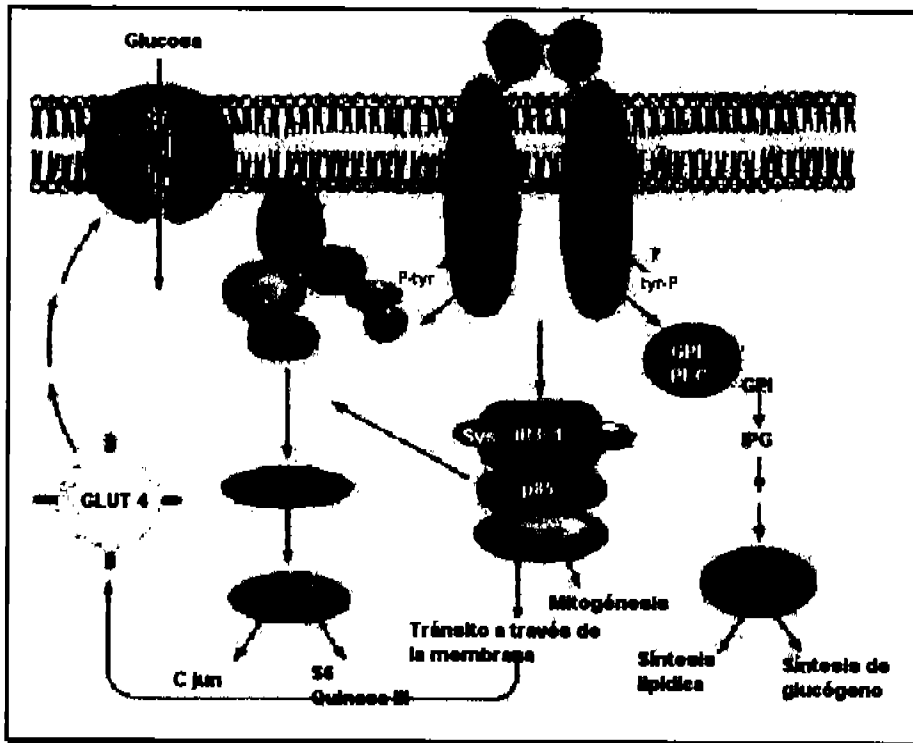
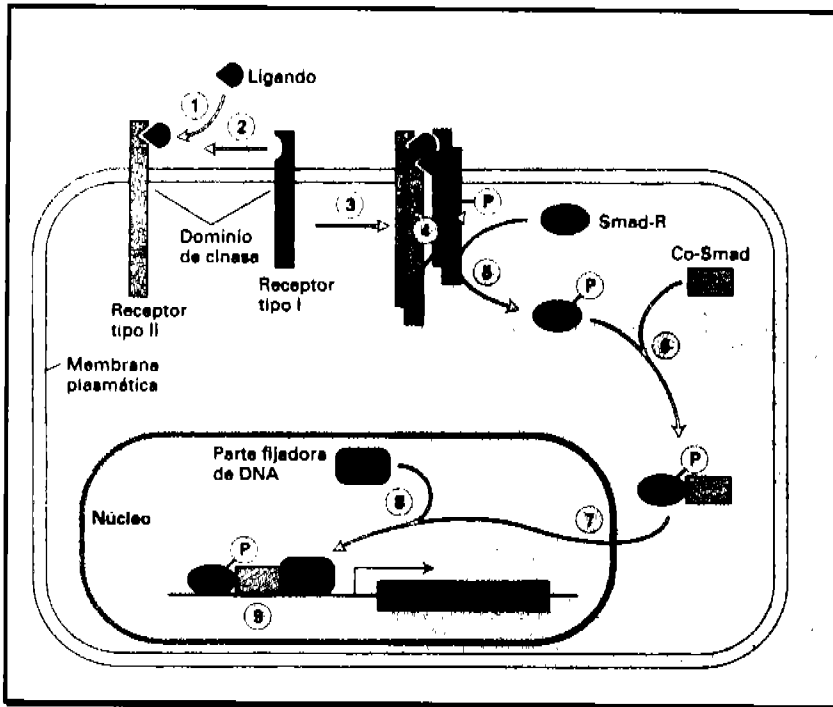


Figura 3.2.1 Esquema hipotético de la transducción de señal en la acción de la insulina<sup>49</sup>.

### 3.2.2 Transducción a través de serina/treonina cinasa.

La unión de TGF  $\beta$  induce la formación de receptores multiméricos, muy probablemente heterotetrámeros, que contienen receptores de tipos I y II. Luego, la subunidad tipo II fosforila los residuos de serina y treonina en un motivo de secuencia muy conservado en la región de la subunidad tipo I unida a la membrana, por lo que estimula su actividad de cinasa<sup>13</sup>.

El receptor de TGF  $\beta$  tipo III es un proteoglicano de superficie celular denominado *betaglicano*, que parece regular la posibilidad de acceso del TGF  $\beta$  al heterotetrámero transductor de las señales de los receptores tipo I y tipo II.



**Figura 3.2. 2** Vía de señales TGF  $\beta$ . La fijación de un ligando a los receptores de tipo I y II, que son serina/treonina cinasas, induce la formación de recetores multiméricos. Los receptores de tipo II fosforilan a los receptores de tipo I en la región yuxtamembrana. Los receptores activador tipo I fosforilan específicamente los Smad regulados por el receptor (Smad-R) que luego se dimerizan en Co-Smad en el citosol. El complejo Smad-R-Co-Smad se transloca hasta el núcleo, donde se fija a secuencias reguladoras en combinación con factores de transcripción específicos que llevan a la transcripción de genes objetivo específicos.<sup>3</sup>

### 3.2.3 Transducción a través de guanilato ciclasa.

El sistema de la proteína cinasa G, que se estimula por el aumento de cGMP citoplasmático. El GMP cíclico es sintetizado por la guanilato ciclasa a partir de GTP. Al igual que la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa está vinculada a una señal biológica específica a través de un receptor de membrana. El dominio extracelular de la guanilato ciclasa puede ejercer la función de receptor hormonal. Está directamente acoplado al dominio citoplasmático mediante un dominio que abarca la membrana, que puede también aplicarse al receptor del factor

atrionatriurético (ANF) también denominado sistema de la guanilato ciclasa-receptor. Así, una sola cadena polipeptídica proporciona el sitio de unión de hormona, el dominio transmembrana y la actividad guanilato ciclasa<sup>49</sup>.

El cGMP producido activa una proteína cinasa G, que posteriormente fosforila proteínas celulares para que se expresen muchas de las acciones de esta ruta. Es necesario conocer más datos acerca de la proteína cinasa G<sup>49</sup>.

Otra molécula capaz de activar la ruta de la proteína quinasa G es el Óxido Nítrico, producido por ejemplo, por las células endoteliales. El cGMP también es el mediador de la respuesta a la luz en los procesos de la visión. Aunque en estos casos no se trata de señales del sistema endocrino

Mediante el uso de análogos del ANF se ha mostrado que la mayoría de receptores expresados en el riñón son "silenciosos" desde el punto de vista biológico, dado que no pueden desencadenar una respuesta fisiológica. Esta nueva clase de receptores puede servir como un sistema periférico de almacenaje y eliminación, y de este modo actuar como tamponador hormonal que module los niveles plasmáticos de ANF (figura 3.2.1)<sup>49</sup>.

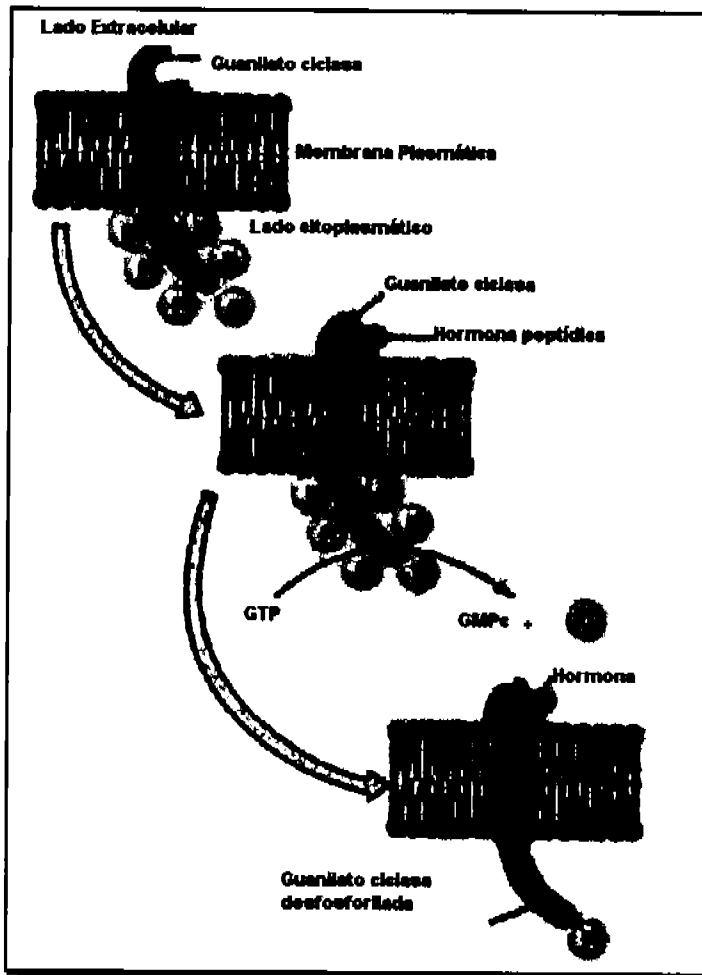


Figura 3.2 2 Modelo de regulación de la actividad guanylate ciclase tras la unión de una hormona peptídica<sup>49</sup>.



### 3.3 Receptores que se unen a enzimas itinerantes (ahora receptor de citocinas clase 1).

A comienzos de los años noventas, no obstante los descubrimientos anteriores referidos a los mecanismos que involucran a las señales de transmisión para los receptores de Prolactina y Hormona de crecimiento.\* Que fueron hasta entonces pobremente esclarecidos, debido a la falta de un descubrimiento las Janus Tyrosine Kinase (JAK) y las señales de transducción de activadores de la transcripción (STAT). La vía JAK/STAT una vez identificada como la primera y mayor señal en cascada responsable de los efectos de Prolactina y Hormona de crecimiento<sup>27</sup>.

En los últimos seis años numerosos reportes han descrito a las moléculas involucradas en la interacción que nos ayuda a conocer la nueva vía de señalización<sup>27</sup>.

Los receptores de citosina se dimerizan después de que se activan al unirse con el ligando, permitiendo la unión con proteínas JAC o (JAK por sus siglas en inglés) que vienen a activar y fosforilar residuos de tirosina sobre el receptor. En seguida, los fosfatos de tirosina sobre el receptor ponen en movimiento una compleja señalización mediante su unión con otra serie de proteínas llamadas transductores y activadores de la transcriptasa (STAT, del inglés *signal transducers and activators of transcription*). Entonces los STAT, unidos a su vez son fosforilados por las JAC y dos dímeros de las moléculas de STAT (unidos a uno de los otros dos fosfatos de tirosina). Finalmente los dímeros STAT/STAT disociados de los receptores se dirigen al núcleo, donde regulan la transcripción de genes específicos. Este proceso de múltiples pasos de señalización provee sitios atractivos para fármacos potenciales que están bajo investigación activa<sup>12</sup>.

---

\* La capacidad de las células madre embrionarias para convertirse en cualquier tipo de célula —llamada pluripotencia— es tanto un beneficio como un problema para los científicos. "El gran reto de este trabajo es controlar y dirigir la diferenciación celular", dice Douglas Melton, biólogo celular de Harvard. Indicarle a una célula que forme sangre, y a otra, tejido de hígado.....¿Cual es el secreto? Complejas combinaciones de factores de crecimiento y señales químicas y genéticas conducen a un proceso que apenas se empieza a descifrar.

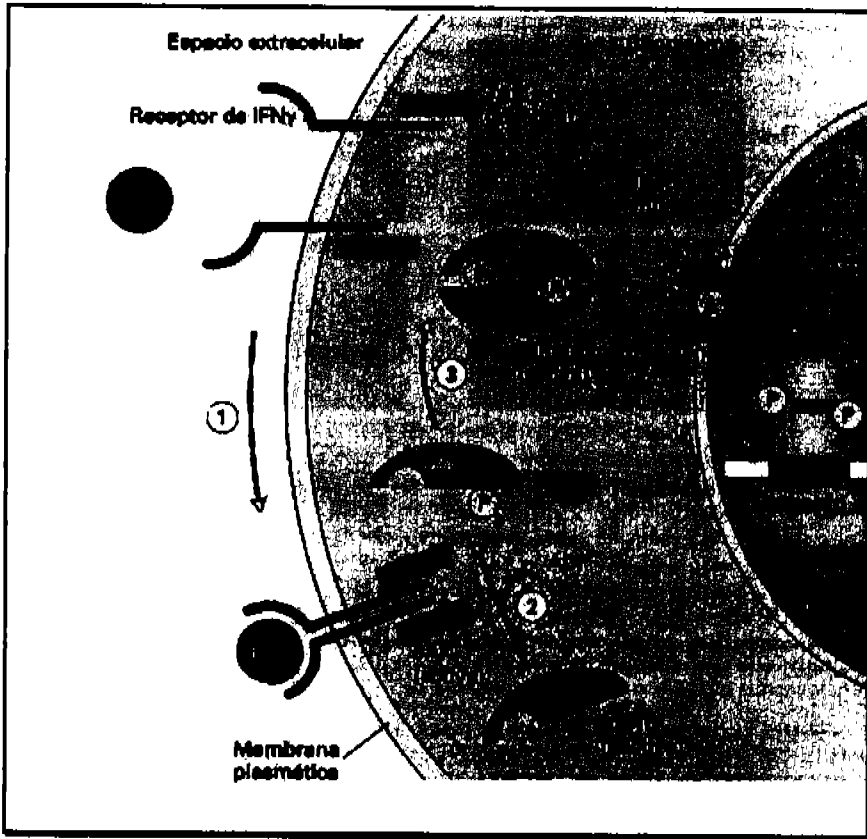


Figura 3.3. Modelo de la activación génica mediada por IFN $\gamma$  a través de la fosforilación y dimerización de la Stat1 $\alpha$ . La JAK cinasa se activa cuando el receptor de IFN $\gamma$  se dimeriza al unirse al IFN $\gamma$ . La JAK cinasa activada fosforila un residuo de tirosina específico en monómeros de Stat1 $\alpha$  inactivos en el citoplasma. La Stat1 $\alpha$  fosforilada se dimeriza y el dímero fosforilado se transloca hacia el núcleo, en donde se une a los elementos de respuesta correspondientes y promueve la transcripción de los genes regulados por IFN $\gamma$ .<sup>8</sup>

### 3.4 Receptores citoplasmáticos

Los receptores de las hormonas esteroides, además de otros receptores relacionados para ligandos no esteroides (como por ejemplo la hormona tiroidea, el ácido retinoico, la vitamina D<sub>3</sub>), se sitúan en el interior de la célula. Estas hormonas actúan directamente sobre la expresión genética<sup>49</sup>.

Existen ciertas diferencias entre los receptores de esteroides con respecto a la localización subcelular de las formas que no se unen al DNA de los receptores. El receptor de los glucocorticoides (GR) y posiblemente el receptor de aldosterona (receptor de mineralocorticoides, MR) parecen encontrarse en el citoplasma; por el contrario, los otros receptores, podrían hallarse en el núcleo, probablemente asociados con el DNA, aunque no necesariamente en lugares aceptores productivos del DNA. El receptor de hormonas tiroideas puede tener localización nuclear, citosólica o hallarse en la membrana de la mitocondria<sup>49</sup>.

Mineralocorticoides y glucocorticoides están altamente relacionados, tanto funcional como estructuralmente; sus receptores presentan una estructura en gran parte homóloga y se encuentran asociados en el citoplasma a proteínas chaperonas, reconociendo en el núcleo la misma secuencia de DNA (elementos de respuesta a hormona, HRE). Los HREs son enhancers de localización variable. Pueden estar situados cerca de la región del promotor de los genes regulados, de forma muy variable o muy lejos de él y, en algunos casos, formando parte del primer intrón<sup>49</sup>.

*Los receptores de glucocorticoides, de mineralocorticoides, de progesterona y de andrógenos pueden unirse al mismo HRE del DNA. Por lo tanto, en un tipo celular determinado, la cantidad y el tipo de receptor expresado determinará la sensibilidad a la hormona y la función biológica.*

En general los receptores intracelulares (no los de localización nuclear) pueden asimilarse al siguiente mecanismo: (figura 3.4.1)<sup>49</sup>.

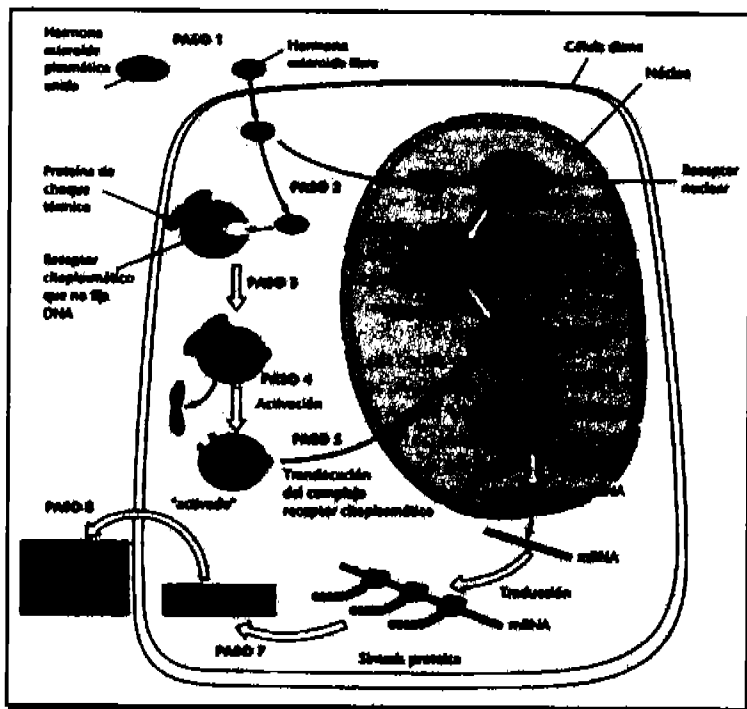
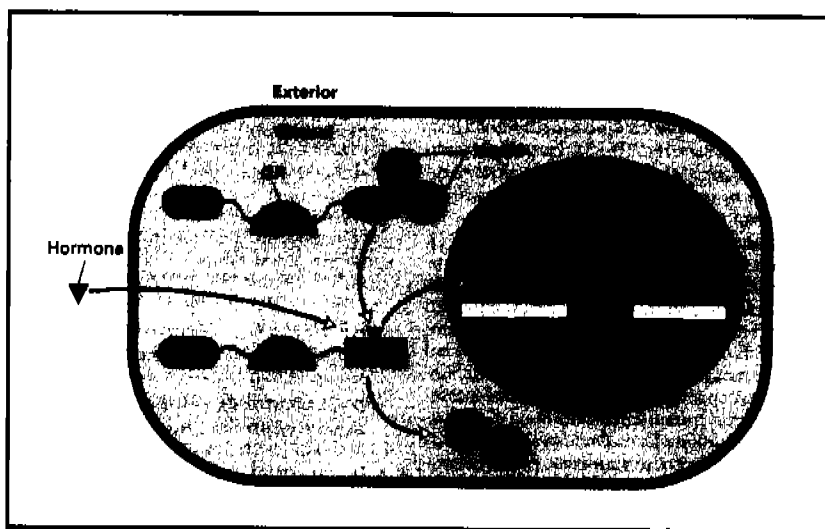


Figura 3.4.1 Modelo de acción de las hormonas esteroides<sup>49</sup>.

### 3.4.1 Mecanismo de acción de los glucocorticoides.

Existen al menos tres modelos a través de los cuales los glucocorticoides (GCC) pueden regular la transcripción de un gen:

1. Activación a través de la unión del GR a un elemento positivo (GRE).
2. Represión a través de la unión del GR a un elemento negativo (nGRE).
3. Interferencia en la transcripción a través de la interacción del GRE con otros activadores de la transcripción lo que da lugar a una regulación negativa.



**Figura 3.4 2** Modelo de activación génica hormono-dependiente por el receptor de glucocorticoides (GR). En ausencia de hormona, el GR está unido a un complejo con la Hsp90 en el citoplasma a través de su dominio de unión al ligando (en púrpura claro). Cuando hay hormona, esta se difunde a través de la membrana plasmática y se fija al dominio de unión al ligando del GR, lo que ocasiona un cambio de conformación en este dominio que libera al receptor de su asociación con la Hsp90. Luego, el receptor con su ligando unido es translocado hacia el núcleo, en donde su dominio de fijación al ADN (en naranja) se une a elementos de respuesta, lo que permite que su dominio de activación (en verde) estimule la transcripción de los genes objetivo<sup>8</sup>.

### 3.4.1.1 Regulación positiva

El GR ejerce su acción a través de su unión a secuencias de DNA de estructura palindrómica constituidas por dos medios sitios de 6 pares de bases, separados por 3 pares de bases. Los GR, MR, PR (del Inglés progesterone receptors) y AR (del inglés androgen receptors) reconocen la misma secuencia: AGAACA. Esta organización sugiere que el receptor se une como dímero. Los GCC facilitan a otros factores de transcripción como NF1 (del Inglés nuclear factor) y OTF1 (del inglés octamer transcription factor) la interacción con el promotor<sup>49</sup>.

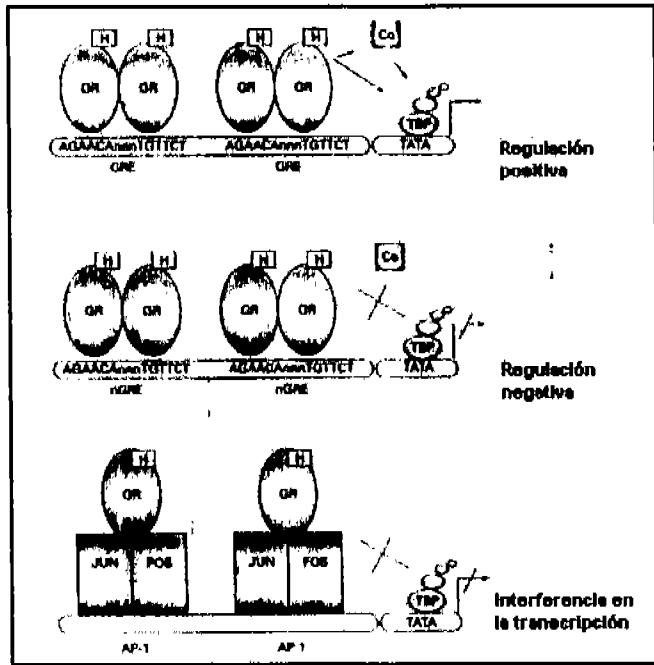


Figura 3.4.3 Mecanismo de acción de los glucocorticoides. El receptor interactúa bien con el DNA a través de GRE positivos o negativos o bien con otras proteínas como Fos/Jun (AP-1), NF- $\kappa$ B, CREB, etc lo que conduce a la activación o a la inhibición de la transcripción<sup>49</sup>.

### 3.4.1.2 Regulación negativa

La transrepresión por GCC no está bien estudiada y existen pocos casos de genes regulados a través de elementos negativos (n GRE). En los casos conocidos de regulación negativa es las interacciones proteína-proteína, donde el receptor contacta con otras dos proteínas sin unirse directamente al DNA y reprimiendo la transcripción<sup>49</sup>.

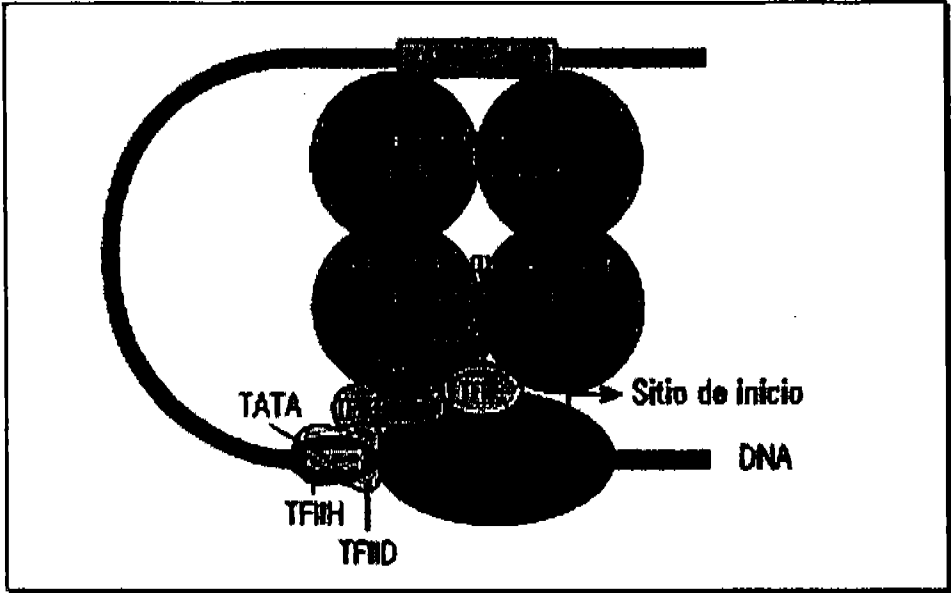


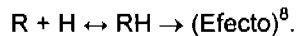
Figura 3.4 4 los factores de transcripción contienen los dominios de enlace a ADN y de transcripción-activación. Representación esquemática de un factor de transcripción (representado como un dímico similar al mostrado anteriormente) y con el mecanismo basal de transcripción que reside en el cuadro TATA del promotor. Se cree que esta última interacción estimula la transcripción (o inhibe la transcripción si el factor es un represor), alterando la conducta del mecanismo de transcripción <sup>8</sup>.

## 4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS DE EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE RECEPTORES.

### 4.1 Identificación y purificación de receptores de superficie celular <sup>4, 6, 9, 13, 28</sup>.

Los receptores de hormona fijan ligandos con gran especificidad y afinidad elevada. En la fijación de una hormona a un receptor intervienen los mismos tipos de interacciones débiles –enlaces iónicos y de van der Waals e interacciones hidrófobas- características de la unión específica de un sustrato a una enzima. La *especificidad* de un receptor se refiere a su capacidad para distinguir sustancias muy relacionadas; por ejemplo, el receptor de insulina fija esta hormona y otra relacionada, denominada factor de crecimiento similar Insulina 1, pero no otras hormonas peptídicas<sup>13</sup>.

La fijación de una hormona se suele presentar como una reacción reversible simple,



Que se puede describir por la ecuación

$$K_D = \frac{[R][H]}{[RH]} \quad (4-1)$$

Donde  $[R]$  y  $[H]$  son las concentraciones de receptor libre y hormona, respectivamente, y  $[RH]$  es la concentración del complejo receptor hormona.  $K_D$  es la constante de disociación del complejo receptor-ligando y mide la *afinidad* del receptor por el ligando. Esta ecuación se puede escribir como

$$\frac{[RH]}{R_T} = \frac{1}{1 + \frac{K_D}{[H]}} \quad (4-2)$$

Donde  $R_T$  es la suma de los receptores libres y ligados:  $[R] + [RH]$ . Por su forma, la ecuación 4-2 es similar a la de Michaelis-Menten, utilizada para analizar reacciones enzimáticas<sup>13</sup>.

Cuanto menor sea el valor de  $K_D$ , mayor será la afinidad de un receptor por su ligando. El valor de  $K_D$  es equivalente a la concentración de ligando a la cual la



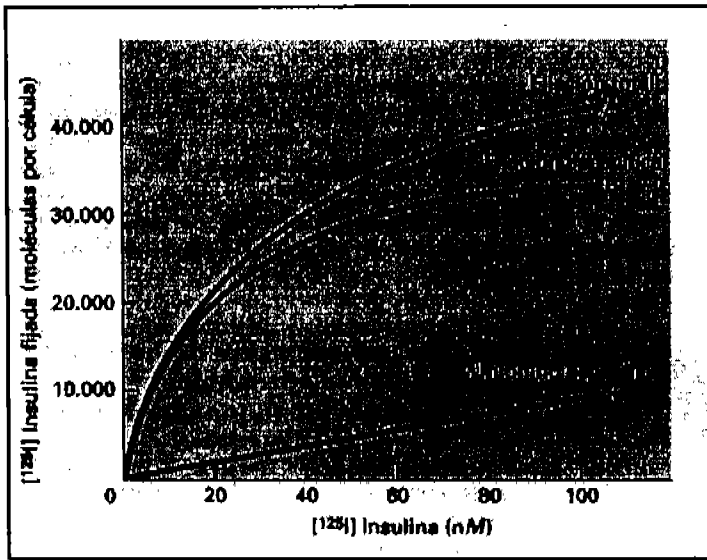
mitad de los receptores contienen ligando fijado. Si  $[H]=K_D$ , de la ecuación 4-2 surge que  $[RH]=0.5 R_T$ .

Si el investigador cuenta con información adecuada de las estructuras moleculares y las actividades bioquímicas de un grupo relativamente grande de congéneres podrá identificar las propiedades necesarias para una acción óptima a nivel de su receptor: tamaño, forma, posición y orientación de los grupos con carga eléctrica o donadores de enlace de hidrógeno y otros factores. Los adelantos recientes en la química computacional, el análisis estructural de compuestos orgánicos y la medición bioquímica de las acciones primarias de los fármacos a nivel de sus receptores, han ampliado la cuantificación de las relaciones de estructura-actividad y su empleo en el diseño de medicamentos<sup>13</sup>.

#### **4.1.1 Los receptores de hormona se detectan mediante ensayos de fijación.**

Los receptores de hormona son difíciles de identificar y purificar, sobre todo porque se encuentran en cantidades ínfimas. La superficie de una célula típica contiene 10.000 – 20.000 receptores para una hormona en particular, pero esta cantidad sólo representa  $\approx 10^{-6}$  de la proteína total de la célula, o  $\approx 10^{-4}$  de las proteínas de la membrana plasmática. La purificación también es difícil porque estas proteínas integrales de la membrana primero se deben solubilizar con un detergente no iónico<sup>13</sup>.

Por lo general, los receptores se detectan y se miden por su capacidad para fijar hormonas radiactivas a una célula o a fragmentos celulares. Cuando se agregan cantidades crecientes de una hormona con marca radiactiva a una suspensión de células, la cantidad que fija a las células aumenta en un principio y luego disminuye en forma gradual con concentraciones mayores (figura 4.1.1 curva A).



**Grafica 4.1.1** Identificación de los receptores específicos para insulina en la superficie de células por fijación de insulina radiactiva. Se incubó una suspensión de células durante una hora a 4°C, con concentraciones crecientes de insulina marcada con  $^{125}\text{I}$ ; se utilizó la baja temperatura para impedir la endocitosis de los receptores de superficie celular. La curva A de fijación total representa insulina unida de manera específica a receptores de elevada afinidad, además de insulina unida en forma no específica, con menor afinidad a otras moléculas de la superficie celular. La contribución de la unión no específica a la fijación específica, se determina mediante la repetición del ensayo de fijación en presencia de un exceso en 100 veces de insulina no marcada, que satura todos los sitios específicos con afinidad elevada. En este caso, toda la insulina marcada se fija a sitios no específicos, para dar la curva C. La curva B de fijación específica, que se refleja en la ecuación (3-2) se calcula como la diferencia entre las curvas A y C. Para este receptor de insulina,  $K_D$  es  $\approx 20\text{nM}$  ( $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ ) y la cantidad de moléculas receptoras por célula,  $R_T$  es  $\approx 30.000$  <sup>13</sup>.

Gran parte de la hormona con marca radiactiva se une de manera específica a su receptor, pero algo se une en forma no específica a otras proteínas y fosfolípidos en la superficie celular. La unión no específica de una hormona marcada se puede medir mediante el ensayo de unión en presencia de un gran exceso de hormona no marcada. Dado que los sitios de fijación específicos (con elevada afinidad) son saturables, bajo estas condiciones estarán todos unidos a hormona no marcada y no fijarán hormona marcada. Pero los sitios no específicos no se saturan, por lo que la fijación de hormona marcada, en presencia de exceso de hormona no marcada, representa las uniones no específicas (figura 4.1.1 curva C). La fijación específica se calcula como la diferencia entre la unión total y la fijación no específica.

La cantidad de sitios de fijación de hormona por célula se calcula a partir del valor de saturación de la curva de fijación específica (figura 4.1.1 curva B)<sup>13</sup>.

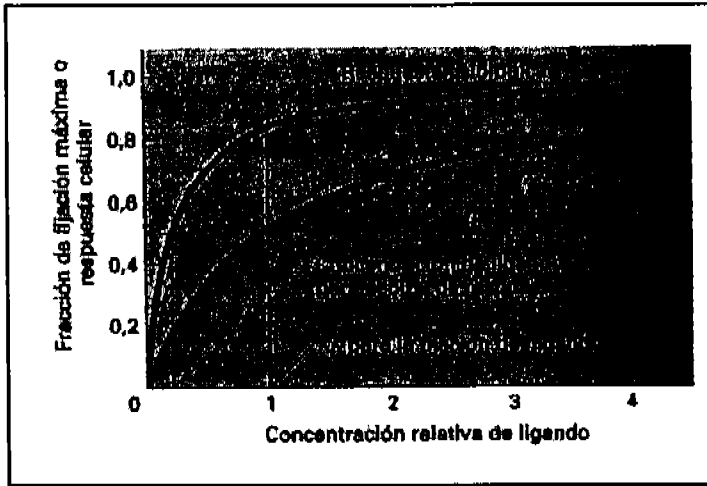
#### **4.1.2 Los valores de $K_D$ para receptores de hormona de la superficie celular se aproximan a las concentraciones de hormona circulante.**

Por lo general, el valor de  $K_D$  de un receptor de hormona de superficie celular se aproxima a los niveles sanguíneos de su ligando. Las variaciones de la concentración de hormona se reflejan en variaciones proporcionales de la fracción de receptores ocupados. Si se supone, por ejemplo, que la concentración normal (no estimulada) de una hormona en la sangre es de  $10^{-9}$  M, y que el  $K_D$  para su receptor es de  $10^{-7}$  M, y se sustituyen estos valores en la ecuación 4-2, es posible calcular la fracción de receptores fijados a hormona (RH):

$$\frac{[RH]}{R_T} = \frac{1}{1 + \frac{10^{-7}}{10^{-9}}} = 0.0099$$

En consecuencia, casi 1% de la totalidad de los receptores estará ocupado por la hormona. Si la concentración de la hormona aumenta 10 veces, hasta  $10^{-8}$  M, la concentración del complejo receptor-hormona se incrementa en proporción, por lo que alrededor de 10% del total de receptores tendrá hormona fijada. Si la respuesta celular inducida es proporcional a la cantidad de RH, como suele ser el caso, la respuesta celular también aumentará 10 veces<sup>13</sup>.

Para muchos receptores de hormona, la concentración de ligando requerida para inducir una respuesta celular máxima es inferior a la necesaria para saturar todas las moléculas receptoras de una célula. De modo similar, la concentración de ligando que induce una respuesta de 50% de la máxima es inferior al valor de  $K_D$  para la fijación. En tales casos, la grafica de los porcentajes de unión máxima en función de la concentración de ligando difiere del gráfico de porcentaje de respuesta celular máxima en función de la concentración de ligando (figura 4.1.2).



**Gráfica 4.1 2** Comparación de las curvas de fijación y de respuesta para un receptor de superficie celular y su ligando. Como aquí se ilustra, la respuesta fisiológica máxima a muchas hormonas tiene lugar cuando sólo una fracción de los receptores de la célula esta ocupada por el ligando. En este ejemplo, 50% de la respuesta máxima se induce con una concentración de ligando en la que sólo esta ocupado el 18% de los receptores. De modo similar, 80% de la respuesta máxima se induce cuando la concentración del ligando equivale al valor de  $K_D$ , con la cual esta ocupado 50% de los receptores<sup>13</sup>.

#### 4.1.3 Las técnicas de afinidad permiten purificar proteínas receptoras\*.

A menudo se pueden identificar y seguir los receptores de hormona de la superficie celular mediante procedimientos de aislamiento con *marca por afinidad*. En esta técnica se mezclan las células con un exceso de una hormona con marca radiactiva para saturar los sitios fijadores de hormona en receptor específico. Una vez eliminada la hormona no fijada por lavado, se trata la mezcla con un agente químico que establece enlaces cruzados covalentes entre la hormona marcada fijada y el receptor. La mayoría de los agentes que establecen enlaces cruzados contienen dos grupos que reaccionan con grupos amino libres; por medio de la reacción con un grupo amino en el receptor y con uno en el ligando fijado, el agente establece el enlace cruzado covalente entre el receptor y el ligando. Un ligando que tiene enlaces cruzados con su receptor permanece unido incluso en

\* La concentración tisular de la mayoría de los receptores es demasiado baja, unas 10 a 100 fmoles/mg de tejido<sup>8</sup>.

presencia de detergentes y otros agentes desnaturalizantes usados para solubilizar las proteínas del receptor de la membrana celular.

La *cromatografía por afinidad* es otra técnica de uso frecuente en la purificación de receptoras de superficie celular que retienen su capacidad de fijación de la hormona cuando se solubilizan. En esta técnica se establece químico entre el ligando del receptor de interés y perlas de poliestireno. Se hace pasar una preparación cruda, solubilizada con detergente, de las proteínas de membrana a través de una columna que contiene estas perlas. Sólo el receptor se fija a las perlas; el resto de las proteínas se elimina de la columna por lavado con líquido en exceso. Cuando se hace pasar un exceso de ligando a través de la columna, el receptor ligado se disocia de las perlas y es eliminado de la columna por elusión. En principio, esta técnica es similar a la cromatografía por afinidad con anticuerpo, salvo que se adosa un ligando de hormona a las perlas de la columna, en lugar de un anticuerpo. En algunos casos, un receptor de hormona se puede purificar hasta 100,000 veces en un solo paso de cromatografía por afinidad.

#### **4.1.5 Muchos receptores se pueden clonar sin purificación previa.**

En el caso de muchas hormonas de superficie celular, la cantidad de receptores es demasiado pequeña para ser purificada mediante cromatografía por afinidad. Por ejemplo, cada célula precursora nucleada de eritrocitos sólo posee unos 1,000 receptores de superficie celular para la eritropoyetina, una hormona esencial para el crecimiento de células precursoras y su diferenciación en eritrocitos maduros. Dado que el receptor de eritropoyetina constituye sólo alrededor de 1 parte por millón ( $10^{-4}$  por ciento) del total de proteínas celulares, es imposible purificar cantidades suficientes de la proteína receptora mediante técnicas bioquímicas convencionales, con la finalidad de determinar sus características o su secuencia. En el presente es posible obtener proteínas receptoras clave mediante la clonación de ADN y otras técnicas de recombinación de ADN, lo que elimina la necesidad de aislarlas y purificarlas de los extractos celulares. La técnica para la identificación y la clonación de cADN codificador de una proteína receptora de

interés. Se analiza una biblioteca de plásmidos de cADN preparada de células productoras del receptor, mediante la transfección de los cADN a células que no sintetizan el receptor en condiciones normales. Las células que captan el cADN codificador del receptor se detectan por su capacidad para fijar ligandos con marcas radiactivas o fluorescentes. Una vez identificado el clon que contiene el cADN del receptor se determina su secuencia y se deduce la secuencia del receptor. Sistemas de expresión especiales, permiten la producción de grandes cantidades de receptor a partir del cADN clonado, que proporcionan proteína suficiente para la caracterización de sus propiedades funcionales.<sup>8</sup>

En la actualidad la caracterización de receptores citoplasmáticos y de la membrana celular son indispensables para administrar una terapia altamente específica y libre de efectos secundarios.<sup>13</sup>

La clonación molecular a menudo ha revelado la presencia de varios subtipos estrechamente relacionados de receptores, en casos en que se pensaba que había una sola especie y se ha demostrado que algunos subtipos se expresan en forma diferencial durante el desarrollo. El conocimiento de los subtipos de receptores es un punto de interés para el investigador y de utilidad para el clínico que desea "manipularlos".<sup>4</sup>

## 4.2 ¿Cómo se descubren los nuevos receptores?

El proceso de descubrimiento sigue unos cuantos pasos clave que se resumen en la figura 4.2.1. El proceso de definición de un nuevo receptor (etapa 1 en la figura 4.2.1) se inicia con el estudio de las relaciones entre estructuras y actividades de un grupo de fármacos sobre una respuesta medida convenientemente. La fijación de ligandos radiactivos define la abundancia molar y afinidades de fijación del receptor supuesto, y constituye un método de análisis para auxiliar en su purificación bioquímica. El análisis de la proteína receptora pura indica el número de subunidades y su tamaño proporciona –a veces- un indicio sobre como actúa (p. ej., autofosforilación estimulada por agonista sobre residuos de tirosina, observada con receptores para insulina y mucos factores de crecimiento).

Estos pasos "clásicos" en la identificación de receptores sirven en la actualidad como un ejercicio de preparación para una estrategia nueva dirigida a la clonación molecular del segmento de ADN que codifica al receptor (etapas 2 a 5 en la figura 4.2.1). La base fundamental de esta estrategia es la capacidad de identificar una secuencia de ADN para receptor supuesto en una población representativa de cADN (por medio de inversotranscriptasa se obtienen secuencias de ADN complementarias a sus ARN expresados en una célula o tejido apropiados). Con este fin (etapa 2), los investigadores emplean características bioquímicas y funcionales de la proteína receptora para extraer el ADN correspondiente. Una colonia bacteriana que exprese el cADN puede ser diferenciada de otras colonias que expresen ADN no relacionado, ya sea mediante un anticuerpo contra el receptor puro en la bacteria que ponga en evidencia a la proteína receptora (2A) o por hibridación de las secuencias del ADN receptor supuesto (con base en la secuencia de aminoácidos del receptor puro) con el ADN receptor de la bacteria (2B). De manera alternativa, la población de los cADN puede expresarse como proteínas en oocitos de rana o células de vertebrados, y el cADN para receptor supuesto puede ser detectado en virtud de la función de señalización de la proteína (2C) o su capacidad de fijarse a un ligando específico (2D). Una vez que se ha identificado el cADN para receptor supuesto, es "validado" mediante una comparación cuidadosa de propiedades funcionales y bioquímicas de la proteína

recombinante con las del receptor endógeno que desencadenó originalmente la búsqueda (3A). También se determina la secuencia básica del ADN para el receptor (3B), de modo que puede deducirse la secuencia de aminoácidos de la proteína receptora completa y compararse con secuencias de receptores conocidos. Con base en estos criterios, será posible anunciar la identificación de un nuevo receptor (paso 4).

Una cantidad y calidad considerablemente mayor de información proviene de la clonación molecular del cADN que codifica un receptor nuevo respecto a la que se obtiene por la identificación de un receptor en la forma "clásica". La secuencia de aminoácidos deducida casi siempre semeja a la de receptores ya conocidos. Los investigadores pueden colocar de inmediato al receptor nuevo en una clase específica de receptores conocidos, y la clase estructural indica cómo actúa el receptor (si se trata de una tirosina cinasa receptora, un receptor de siete regiones transmembrana acoplado a proteína G, etc.). La secuencia de ADN constituye una sonda para identificar células y tejidos que expresan el ARN mensajero que codifica al receptor nuevo. La expresión de cADN en células cultivadas proporciona al químico farmacéutico un suministro ilimitado de proteínas receptoras recombinantes para realizar con precisión tareas como análisis bioquímico, pruebas de fijación de agonistas y antagonistas, y desarrollo de nuevos fármacos.

Finalmente (paso 5), el propio ADN para receptor constituye un instrumento para identificar aún más receptores. Los receptores de una clase o subclase específicas contienen regiones altamente conservadas de secuencias de aminoácidos similares o idénticas (y por lo tanto de ADN). Las secuencias de ADN correspondientes a estas regiones conservadas pueden emplearse como sondas para encontrar secuencias de receptores relacionados pero potencialmente nuevos, ya sea por hibridación ADN-ADN (2B), o como preparadores en una reacción en cadena polimerasa (PCR) diseñada para amplificar secuencias de ADN para receptor (2E). Estas sondas pueden conducir a la clonación de ADN que codifica a un receptor cuyo ligando es desconocido (un receptor "huérfano");



se busca entonces el ligando apropiado realizando pruebas sobre interacciones funcionales y de fijación con el receptor recombinante.

#### **4.2.1 ¿Cómo identificar los factores de transcripción?**

Hay que empezar por delimitar las áreas del ADN que controlan la expresión del gen. Para ello se provocan deleciones (eliminación de partes) o mutaciones (intercambios de nucleótidos) del ADN de la región reguladora, y se mide el efecto que producen sobre la transcripción. Así se localizan con exactitud, el promotor o los genes multiplicadores ("amplificadores").

Una vez localizadas las regiones de interés, tales como promotores o multiplicadores, se procede a identificar las proteínas que se unen específicamente a esas zonas. Uno de los métodos más utilizados es el llamado "retraso de ADN en geles". En este caso, se radiomarca el fragmento de ADN que contiene la región reguladora. Se lleva a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (matriz que tiene la propiedad de separar ADN o proteínas según su tamaño mediante el paso de una corriente eléctrica continua).

Si en la mezcla de extractos nucleares con ADN existe una proteína que se fija a éste, se formará un complejo de proteína/ADN cuya migración en el gel será más lenta en comparación con el ADN libre.

El siguiente paso consiste en clonar, es decir, aislar en gen que codifica a la proteína reguladora que se fija al ADN para averiguar su secuencia de nucleótidos. Se recurre, para ello, a los métodos cromatográficos, que sacan partido de las propiedades fisicoquímicas de la proteína. La proteína suele obtenerse totalmente pura tras el paso a través de una columna de oligonucleótidos sintéticos (fragmentos de ADN), que contienen la secuencia del ADN a la que se une la proteína.

Una vez purificada, conoceremos la secuencia de aminoácidos que la componen. Prepararemos luego oligonucleótidos sintéticos, que se emplearán de sonda para el clonaje del ADN. La sonda radiomarcada se hibrida (dado que contiene secuencias complementarias) con el ADN de una genoteca (conjunto del ADN

total de una célula). De esta forma se puede identificar el ADN que determina la proteína deseada.<sup>19</sup>

## **5.-CONCLUSIONES**

La importancia entre localización y especificidad de un receptor con su hormona se visualiza por medio de un esquema de su clasificación y por su estructura molecular, de la ubicación del receptor en la célula y de la forma de este, derivan procesos importantes como el reconocimiento, activación y transducción de la señal o mensaje bioquímico; mismo que repercute en las habilidades metabólicas de la célula y por lo tanto en el tejido – órgano del cual es blanco.

Ha sido posible mediante este trabajo definir y clasificar a los receptores hormonales, las vías de señalización que estas moléculas activan destacando: la participación de segundos mensajeros, de receptores con actividad enzimática y aquellos que se unen a enzimas itinerantes, así como distinguir entre citoplasmáticos y nucleares. Por lo que se sugiere este material documental para guía y consulta del alumno que cursa la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo en especial la asignatura de Bioquímica de Sistemas.

## Bibliografía

- 📖 Beck S. William, (1977), Fisiología molecular, celular y sistematica, Publicaciones Cultural S.A., Séptima edición en español, México D.F., P.c 629
- 📖 Bertram G. Katzung, (2002), Farmacología básica y clínica, 8ª edición, Editorial El manual moderno S.A. de C.V., México D.F.
- 📖 García S. Jesús, (2002), Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular, 4ª edición, Fondo de cultura económica, México D.F.
- 📖 Goodman. Gilman., (1996), Las bases farmacológicas de la terapéutica, Novena edición, Vol. I. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
- 📖 Hadley, Mac E., (2000), Endocrinology, Prentice – Hall, Fifth edition,
- 📖 Jiménez, L. Felipe; Merchant, Horacio. (2003). Biología celular y molecular. Pearson educación. México.
- 📖 Junqueira LC. Carneiro J., (1998), Biología Celular y Molecular, Traducido de la 6ª edición, Ed Mc Graw-Hill Interamericana, Chile.
- 📖 Kalant H., (2002), Principios de farmacología médica, 6ª edición, Oxford University Press México, S.A. de C.V., México.
- 📖 Karp G, (1998), Biología celular y molecular, Mc Graw Hill Interamericana, México D.F.
- 📖 Laguna J. Piña E., (2002), Bioquímica de laguna, 5ª edición, El manual moderno, México D.F., p.c. 300-305.
- 📖 Lee.M.A., (1998), Guía didáctica introductoria al tema. Sistema endócrino, FESC.
- 📖 Lehninger. Nelson D. L. Cox M.M., (2000), Lehninger Principles of Biochemistry, Third Editlon, Worth Publishers, NY USA.
- 📖 Lewin B, (1993), Genes, Editorial Reverté S.A., 2ª edición, Barcelona España.
- 📖 Lodish H,(2003), Biología celular y molecular, Ed Médica panamericana, cuarta edición, Madrid España.

- ☞ Purves K W. Sadava D, (2003), Vida (La ciencia de la biología), Médica panamericana, Sexta edición, Madrid España.
- ☞ Rosales C.L. dirigido por., (1979), Gran diccionario enciclopédico ilustrado, 16ª edición, Tomo XI,IV, Reader's digest México S.A de C.V., México D.F.
- ☞ Akker F. Zhang X. Miyagi M. Huo X. Misono K. Yee V., (2000), Structure of the dimerized hormone-binding of a guanylyl-cyclase-coupled receptor, Nature, 406, 101-104.
- ☞ Bagchi M., (2003), Steroid Hormone Receptor Family: Mecanism of Action, Encyclopedia of hormones, 3,403-409.
- ☞ Camacho-Arroyo I, (2003), ¿Cómo actúan las hormonas esteroideas?, Educación química, 14,4, 196-201.
- ☞ Celada A, (), Factores de transcripción y control de la expresión génica.
- ☞ Cruz M. Velasco E. Kumate J., (2001), Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa, Gaceta médica de México, 137,2.
- ☞ Derynck R., Zhang Y., (2003), Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling, Nature, 425, 577-583.
- ☞ Devi L A, (2003), Receptor-Receptor Interactions, Enciclopedia of hormones, 294-298.
- ☞ Fernández I., White J., (2003), Agonist-bound nuclear receptors: not just target of coactivators, Journal of Molecular Endocrinology, 31, 1-7.
- ☞ Florio T., Thellung S., Arena S., Corsaro A., Bajeto A., Schettini G., Store P., (2000), Somatostatin receptor 1 (SSTR-1) – mediated inhibition of cell proliferation correlatos with the activation of the MAP kinase cascade: role of the Phosphotyrosine phosphatase SHP-2, Journal Physiology, 94, 239-250.
- ☞ Fujino H., Regan J., (2003), Prostanoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase: a pathway to cancer?, TRENDS in Pharmacological Sciences, 24, 7, 335-339.
- ☞ Gelius B. Wrange O., (2001), Glucocorticoid Hormone-Induced Receptor Localization to the Chromatin Fibers Formed on Injected DNA in *Xenopus* Oocytes, Experimental Cell Research, 256, 319-328.

- 📖 Goffin V Kelly P, (2003), Prolactin and growth hormone receptors, Encyclopedia of hormones, 1, 269-277.
- 📖 González-Segura, L; Muñoz-Clares R. (2003) El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas, Revista de educación bioquímica, 22, 2-10.
- 📖 Greenwald J. , Fisher W. H., Vale W. W. ,Choe S. ,(1999), Three-finger toxin fold for the extracellular ligandbinding domain of the type II activin receptor serine kinase, Nature structural biology, 6, 1, 18-22.
- 📖 Grötzinger. J., (2002), Molecular mechanisms of cytokine receptor activation, Biochimica et Biophysica Acta, 1592, 215-223.
- 📖 Horard B., Vanacker JM., (2003), Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand, Journal of Molecular Endocrinology, 31, 349-357.
- 📖 Hubbard R. Stevan., (1997), Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, The EMBO Journal,16,18,5573-5581.
- 📖 Leung P. Peng Ch, (2003), Activin receptor signaling, Encyclopedia of hormones, 1, 17-22.
- 📖 Linder ME.,Gilman AG., (1992), Proteínas G, Investigación y Ciencia, 192, 20-28.
- 📖 Luisa B. F, Xu W.X, Otwinowski Z, Freedman L. P, Yamamoto K. R, Sigler P.B (1991) Crystallographic análisis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. Nature, 352, 497-505.
- 📖 Marchese A., Chen C., Kim Y., Benovic J., (2003), The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking, TRENDS in Biochemical Sciences, 28, 7, 369-374.
- 📖 Nakabayashi K., Kudo M., Hsueh A., Maruo T., (2003), Activation of the luteinizing hormone receptor in the extracellular domain, Molecular and Cellular Endocrinology, 202, 139-144.

- ☐ Oba Y., Hirai T., Yoshiura Y., Kobayashi T., Nagahsma Y., (2001), Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: The evolution of glycoprotein hormona receptors in vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 129, 441-448.
- ☐ Ordentlich P., Heyman R., (2003), Retinoid receptors. Encyclopedia of Hormones, 298-310.
- ☐ Rasmussen H., (1989), El calico mensajero intracelular. Scientific American, 159, 46-53.
- ☐ Rossi Sergio, (), Proteínas de estrés térmico y algo más. Scientific American Latinoamérica, Año 2, 17.
- ☐ Sivarajah P., Wheeler M., Irwin D., (2001), Evolution of receptor for proglucagon-derived peptides: isolation of frog glucagon receptors. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 128, 517-527.
- ☐ Tata J.R., (2002), Signalling through nuclear receptors, Nat. Rev.Mol.Cell.Biol., 3, 702-710.
- ☐ Vadillo B.M. González B.D. Caracas P.N. Zelaya G. L., (2000), Avances y perspectivas terapéuticas en los principales tumores hormonodependientes e hiperplasia prostática benigna, Revista de endocrinología y Nutrición, 8, 4, 143-148.
- ☐ Villaseñor A.,(2002), El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad, Revista de endocrinología y nutrición, 10,3,135-139.
- ☐ Weiss R., (2005), La revolución que está esperando, Nacional Geographic en Español, Julio, 12-13.
- ☐ Bedel B., Garbers D., (1997), New insights of the functions of the guanylyl cyclase receptors. FEBS Letters, 410, 29-33.
- ☐ [www.Hormonas.localhost](http://www.Hormonas.localhost)(v.i 23/Abr/2003)
- ☐ Yuño M Cerone S Berger H Sansinanea A, (2001), Roles fisiológicos de la leptina, Acta bioquímica clínica latinoamericana, XXXV,3,347-353.
- ☐ <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimicanterior/receptor.htm>. (v.i. 11/Jun/2004)
- ☐ [www.franklincoll.edu/bioweb/bio120/week5.htm](http://www.franklincoll.edu/bioweb/bio120/week5.htm) (v.i. 4/Mzo/2004)
- ☐ [http://www.biol.unlp.edu.ar/biologia/archivos/modulo\\_3.zip](http://www.biol.unlp.edu.ar/biologia/archivos/modulo_3.zip) (v.i. 14/Abr/2004)

- 📖 [www.hormoneprofile.com/howhormoneswork.htm](http://www.hormoneprofile.com/howhormoneswork.htm) (v.i. 6/jul/2005)
- 📖 [www.eur.nl/fgg/endov/lhr.html](http://www.eur.nl/fgg/endov/lhr.html) (v.i. 19/may/2004)
- 📖 [itsa.ucsf.edu/~jima/tr-helix.html](http://itsa.ucsf.edu/~jima/tr-helix.html) t helix
- 📖 [e.hormone.tulane.edu/.../200208-Bishop.html](http://e.hormone.tulane.edu/.../200208-Bishop.html) (v.i.4/ene/2005)
- 📖 [www.biochem.northwestern.edu/journals/](http://www.biochem.northwestern.edu/journals/) (vi 19 may 2004)