



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
**Instituto de Fisiología Celular**

**Papel de la fosforilación en la regulación del  
receptor  $\alpha_{1A}$  adrenérgico humano**

**Tesis que presenta**

**Q. B. P. Marco Antonio Morquecho León**

**Para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias Bioquímicas**

**Bajo la tutoría de**

**Dr. Jesús Adolfo García Sáinz**

**Instituto de fisiología celular**

**Laboratorio 303 edificio Sur**

**México D. F. agosto de 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 303 del edificio sur del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del doctor Jesús Adolfo García Sáinz. Esta investigación fue financiada por el fondo sectorial SEP/CONACYT clave 79908 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) clave IN212609 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA).**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por el apoyo que me ha brindado, por su paciencia y por ser una excelente persona, un excelente investigador y por el aprendizaje que trabajar a su lado me ha dado.**

**A Alejandro Cabrera Wrooman, Rocía Alcántara Hernández, y Selma Eréndira Avendaño Vázquez por el apoyo técnico que me brindaron para la presente investigación.**

**A las Doctoras Marina Macías Silva y Rosario Adelaida Muñoz Clares, por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por las recomendaciones y los comentarios hechos para la presente investigación y por el apoyo que me han brindado.**

**A los revisores de mi tesis: Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Martha Robles Flores y Dr. Jorge Vázquez Ramos, Dr. Félix Recillas Targa por los valiosísimos comentarios y correcciones hechos al trabajo.**

**A mi esposa Karolina permanecer de este lado del puente, por los sueños compartidos, por su amor, su admiración, su paciencia y la confianza que tiene en mí.**

**A mis padres Ernestina y Bonifacio por el apoyo incondicional y su inmenso amor, siguen siendo los mejores.**

**A mis queridos suegros Jolanta y Jerzy Gilas, que desde lejos nos hacen sentir su apoyo y su amor.**

**A mis hermanas Liliana, Claudia y Sonia por tantos recuerdos de infancia.**

**A mis sobrinas Gabriela, Julieta, Samantha y Paloma, que espero sepan crecer juntas queriéndose a pesar de la distancia.**

**Al pequeño sobrino que llegará pronto, que se dio a desear durante mucho tiempo.**

**A mis compañeros en el laboratorio, por la amistad que me han brindado.**

**A mis mejores amigos de toda la vida Francisco Juárez y Cristina Moctezuma, porque seguimos haciendo camino juntos.**

**A todos aquellos que no menciono de nombre pero que de alguna forma han estado conmigo apoyándome con su presencia.**

## Índice de contenido

	<b>Página</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>1. Resumen</b>	<b>9</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Sistema nervioso autónomo</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Neurotransmisores del sistema nervioso autónomo</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Acciones del sistema nervioso simpático</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Antecedentes históricos en la investigación de la adrenalina</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Almacenamiento y síntesis fisiológica de las catecolaminas</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Destino de la adrenalina en el organismo</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Toxicidad de la adrenalina</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Mecanismo de acción de la adrenalina</b>	<b>16</b>
<b>2.9 Los receptores adrenérgicos</b>	<b>18</b>
<b>2.9.1 Farmacología de los ARs</b>	<b>19</b>
<b>2.9.2 Aspectos moleculares de los ARs</b>	<b>19</b>
<b>2.9.3 Señalización de los ARs</b>	<b>21</b>
<b>2.9.4 Desensibilización de los ARs</b>	<b>23</b>
<b>2.9.5 Transinactivación de los ARs mediada por tirosina Kinasa</b>	<b>27</b>
<b>2.9.6 Secuestro de los ARs mediado por el agonista</b>	<b>28</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>31</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>33</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Objetivo general</b>	<b>34</b>
<b>6.2 Objetivos específicos</b>	<b>34</b>
<b>7. Materiales y métodos</b>	<b>35</b>
<b>7.1 Cultivo celular</b>	<b>35</b>
<b>7.2 Transfección de células HEK-293</b>	<b>35</b>
<b>7.3 Selección de líneas celulares estables</b>	<b>35</b>

7.4 Transformación de bacterias	36
7.5 Extracción de DNA plasmídico	36
7.6 Mutagénesis sitio dirigida	37
7.7 Determinación de la concentración de calcio intracelular	37
8. Resultados	39
8.1 Mutagénesis	39
8.2 Generación de líneas celulares HEK-293 transfectadas establemente con las diferentes construcciones del $\alpha_{1A}$ AR humano	41
8.3 Medición de calcio intracelular en las células HEK-293 transfectadas con las diferentes construcciones del $\alpha_{1A}$ AR humano y bovino	42
8.4 Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular mediada por los ARs $\alpha_{1A}$ WT, $\alpha_{1A}$ 3AI y $\alpha_{1A}$ 3AI $\Delta$ C de humano transfectadas en células HEK-293	43
8.5 Efecto del PMA sobre la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR-GFP COOH humano transfectado en células HEK-293	48
8.6 Efecto del PMA en la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR WT de humano transfectado en células Rat-1	50
8.7 Efecto del PMA sobre la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR WT de bovino transfectado en células HEK-293	51
9. Discusión	54
10. Conclusiones	59
11. Perspectivas	60
12. Bibliografía	61

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Acciones de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático	11
Figura 2. Estructura química de la noradrenalina y la adrenalina	15
Figura 3. Vía de síntesis biológica de la adrenalina y la noradrenalina	16
Figura 4. Localización del <i>locus ceruleus</i>	17
Figura 5. Representación esquemática de la topología de los ARs	18
Figura 6. Vía de señalización de los $\alpha_{1A}$ AR	22
Figura 7. Vías de desensibilización-resensibilización de los GPCRs	26
Figura 8. Transinactivación de los ARs mediada por insulina	28
Figura 9. Consecuencias funcionales de los efectos del ácido okadaico sobre el $\alpha_{1A}$ AR	32
Figura 10. Sitios consenso de fosforilación por PKC, AKT y GRK en el $\alpha_{1A}$ AR WT Humano	33
Figura 11. Diagrama de flujo general de la metodología usada para llevar a cabo la presente investigación	38
Figura 12. Representación esquemática del $\alpha_{1A}$ AR 3AI	40
Figura 13. Representación esquemática del $\alpha_{1A}$ AR 3AI $\Delta$ C	41
Figura 14. Medición de la liberación de calcio intracelular mediada por NA 10 $\mu$ M en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con las tres construcciones del $\alpha_{1A}$ AR	42
Figura 15. Liberación de calcio intracelular mediada por NA 10 $\mu$ M en células HEK-293 transfectadas establemente	43
Figura 16. Efecto de la fentolamina 10 $\mu$ M sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK-293 transfectadas establemente	43
Figura 17. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK $\alpha_{1A}$ WT	44
Figura 18. Curvas dosis respuesta en células HEK $\alpha_{1A}$ WT humano con y sin PMA	44
Figura 19. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK $\alpha_{1A}$ 3AI	45
Figura 20. Curvas dosis respuesta en células HEK $\alpha_{1A}$ 3AI humano con y sin PMA	46
Figura 21. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK $\alpha_{1A}$ 3AI $\Delta$ C	47
Figura 22. Curvas dosis respuesta en células HEK $\alpha_{1A}$ 3AI $\Delta$ C humano con y sin PMA	48
Figura 23. Histograma comparativo de las respuestas con y sin PMA de las construcciones del $\alpha_{1A}$ AR humano	49
Figura 24. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK $\alpha_{1A}$ WT-GFP COOH	49
Figura 25. Curvas dosis respuesta en células HEK $\alpha_{1A}$ WT-GFP COOH humano con y sin PMA	50
Figura 26. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células	

<b>Rat <math>\alpha_{1A}</math> WT-GFP COOH</b>	<b>51</b>
<b>Figura 27. Curvas dosis respuesta en células Rat <math>\alpha_{1A}</math> WT-GFP COOH humano con y sin PMA</b>	<b>52</b>
<b>Figura 28. Representación esquemática del receptor <math>\alpha_{1A}</math> AR WT de bovino</b>	<b>52</b>
<b>Figura 29. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK <math>\alpha_{1A}</math> WT Bovino</b>	<b>53</b>
<b>Figura 30. Curvas dosis respuesta en células HEK <math>\alpha_{1A}</math> WT Bovino, con y sin PMA</b>	<b>53</b>

### Índice de tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1. Localización tisular de los receptores colinérgicos y adrenérgicos</b>	<b>12</b>
<b>Tabla 2. Predicciones para fosforilaciones en serinas y treoninas de la tercera asa del <math>\alpha_{1A}</math> AR WT humano</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 3. Predicciones para fosforilaciones en serinas y treoninas del extremo carboxílico del <math>\alpha_{1A}</math> AR WT humano</b>	<b>39</b>



## Abreviaturas

<b><math>\alpha</math>1<sub>A</sub> AR 3AI</b>	Receptor $\alpha$ 1 <sub>A</sub> adrenérgico humano mutado en todos los sitios consenso de fosforilación por PKC y GRK de la tercera asa intracelular
<b><math>\alpha</math>1<sub>A</sub> AR 3AI<math>\Delta</math>C</b>	Receptor $\alpha$ 1 <sub>A</sub> adrenérgico humano mutado en todos los sitios consenso de fosforilación por PKC y GRK de la tercera asa intracelular y truncado en el aminoácido 348 del extremo carboxílico
<b><math>\alpha</math>1<sub>A</sub> AR WT</b>	Receptor $\alpha$ 1 <sub>A</sub> adrenérgico silvestre humano
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de calcio
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AKAPs</b>	Proteínas de anclaje a PKA
<b>ARs</b>	(Adrenergic receptors) Receptores adrenérgicos
<b>BSA</b>	(Bovine Serum Albumin) Albúmina Sérica Bovina
<b>C</b>	Vértebras cervicales
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>cAMP</b>	(Cyclic Adenosyl Monophosphate) Adenosin monofosfato cíclico
<b>COMT</b>	Catecol-o-metil transferasa
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DMEM</b>	(Dulbecco's modified Eagle's medium) Medio E agle m odificado p or Dulbecco
<b>DNA</b>	(Deoxyribonucleic acid) Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Dinucleótidos trifostatados
<b>DOPA</b>	Dihidroxi-para-fenilalanina
<b>e</b>	Extracelular
<b>ERK 1/2</b>	Proteína cinasas activadas por el mitógeno
<b>GFP</b>	(Green Fluorescent Protein) Proteína verde fluorescente
<b>GPCRs</b>	(G Protein Coupled Receptors) Receptores Acoplados a Proteínas G
<b>Grb-2</b>	(Growth factor receptor-bound protein 2) Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento tipo 2
<b>GRKs</b>	(G Protein Coupled Receptor Kinases) Cinasas de los Receptores Acoplados a Proteínas G
<b>GTP</b>	(Guanosine triphosphate) Guanosina trifosfato
<b>HEK-293</b>	(Human embryonic kidney cells) Células de riñón de embrión humano
<b>i</b>	Intracelular
<b>IGF-1</b>	(Insulin like growth factor-1) Factor de crecimiento semejante a la insulina-1
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato

<b>IR</b>	(Insulin receptor) Receptor de insulina
<b>KRH</b>	(Krebs Ringer Hepes Glucose) Amortiguador Krebs-Hepes-Glucosa
<b>L</b>	Vértebras lumbares
<b>LPA</b>	(Lysophosphatidic acid) Ácido lisofosofatídico
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>MLCK</b>	(Myosin Light Chain Kinase) Cinasa de la cadena ligera de la miosina
<b>mRNA</b>	(Messenger Ribonucleic acid) Ácido ribonucleico mensajero
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>p42/p44</b>	Cinasa de ERK
<b>PCR</b>	(Polymerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDZ</b>	[Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1)] Proteína de densidad postsináptica (PSD95), Supresor de tumores del disco grande de drosófila (DlgA), y proteína de la zonula ocludens-1 (zo-1).
<b>PI3K</b>	Cinasa de fosfatidil inositol 3
<b>PKA</b>	(Protein Kinase A) Proteína Cinasa A
<b>PKB</b>	Proteína cinasa B
<b>PKC</b>	(Protein Kinase C) Proteína Cinasa C
<b>PLA2</b>	(Phospholipase A2) Fosfolipasa A2
<b>PLC-β</b>	Fosfolipasa C-β
<b>PMA</b>	Forbol-12miristrato 13-acetato
<b>Rat-1</b>	Línea celular de fibroblastos de rata
<b>S</b>	Vértebras sacras
<b>SH2</b>	Dominio de unión con homología a Src tipo 2
<b>SH3</b>	Dominio de unión con homología a Src tipo 3
<b>Src</b>	Cinasa de tirosinas derivada de sarcoma
<b>T</b>	Vértebras torácicas
<b>TM</b>	Dominio transmembranal de los GPCRs
<b>TPA</b>	12-O- tetradecanoilforbol-13-acetato

## 1. Resumen

La adrenalina y la noradrenalina ejercen sus acciones fisiológicas cuando se unen a los receptores adrenérgicos (ARs), que pertenecen a la super familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), con siete dominios transmembranales. Los ARs se localizan en la membrana plasmática y se encargan de transducir la señal al interior de la célula (Hoffman, 2001).

Los ARs de la familia  $\alpha_1$  son los mediadores primarios de la contracción del músculo liso, y tienen una acción muy importante sobre la función neurológica y cardiovascular. El  $\alpha_{1A}$  AR, está presente en muchos tejidos: cerebro, corazón, vasculatura, hígado, riñones, próstata y bazo, y lleva a cabo diversas acciones fisiológicas: neurotransmisión, vasoconstricción, inotropía y cronotropía cardíaca y glucogenólisis (Michel *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 1996).

La regulación de la actividad de los GPCRs es un evento clave en la adaptación de las células a los cambios en el ambiente interno, y a la homeostasis en general (Alcántara-Hernández *et al.*, 2005). La fosforilación de los GPCRs es un evento que ocurre en etapas muy tempranas de la regulación del receptor, que es seguida de una serie de mecanismos que se encargan de atenuar la señal transducida por el receptor, cuando éste es sometido a una estimulación continua; dicha atenuación es de carácter reversible (Hausdorff *et al.*, 1990). La fosforilación de los GPCRs en residuos de serina y treonina es mediada por algunas isoformas de la proteína cinasa C (PKC) y por diversas isoformas de las cinasas de los GPCRs (GRKs) (Krupnick y Benovic, 1998).

Se conoce muy poco acerca del mecanismo por el cual se regula la actividad del  $\alpha_{1A}$  AR humano. En la presente investigación encontramos que en células HEK 293, el receptor silvestre de humano ( $\alpha_{1A}$  WT) se desensibiliza cuando las células se preincuban con ésteres de forbol (PMA). Al eliminar los sitios consenso para la fosforilación por la PKC en la tercera asa intracelular ( $\alpha_{1A}$  3AI), se encontró que el receptor muestra una resistencia de aproximadamente 66% a la desensibilización por PMA, y cuando al receptor le son eliminados los sitios consenso de fosforilación por PKC de la tercera asa intracelular y además es truncado el extremo carboxílico en el aminoácido 348 ( $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C), la resistencia a la desensibilización por PMA es de aproximadamente 85%. Estos resultados nos hacen suponer que el receptor es regulado por fosforilación tanto en la tercera asa intracelular como en el extremo carboxílico, y que es la tercera asa intracelular la que media la mayor parte de dicha desensibilización.

## **2. Introducción**

### **2.1. Sistema nervioso autónomo**

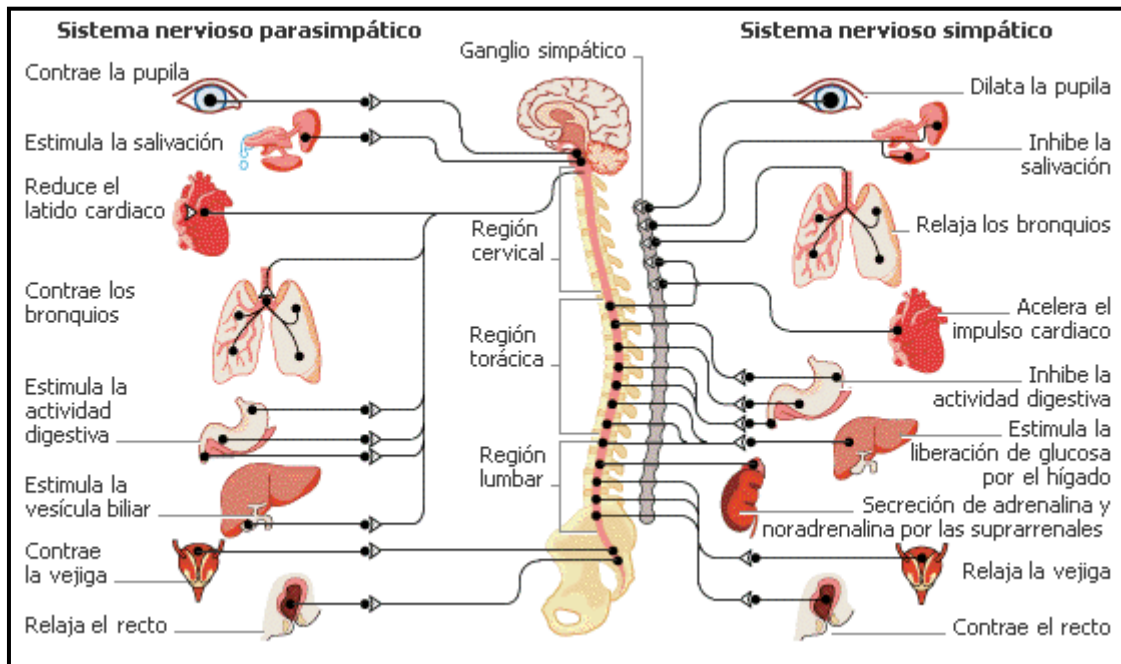
El sistema nervioso autónomo transmite señales nerviosas desde el cerebro hasta diversos aparatos y sistemas del cuerpo. Los impulsos provenientes del sistema nervioso autónomo son de carácter inconsciente, es decir, son involuntarios. Al igual que el sistema nervioso central, el sistema nervioso autónomo consta de un componente sensitivo y de un componente motor. Los estímulos que llegan al sistema nervioso autónomo provienen de neuronas sensoriales autónomas, que en su mayor parte están vinculadas con uno de varios tipos de receptores. Entre éstos se encuentran los quimiorreceptores del cayado de la aorta o de las carótidas, que son sensibles a los cambios en las concentraciones de oxígeno y CO<sub>2</sub>, o bien los mecanorreceptores pulmonares, que detectan el grado de estiramiento y/o estrechamiento del tejido pulmonar (Guyton, 1993).

Las neuronas motoras autonómicas regulan la actividad de las vísceras, al aumentar o disminuir las funciones de sus tejidos efectores, entre ellos la secreción glandular de sustancias (externa) y hormonas (interna), el control del diámetro de la pupila en respuesta a los cambios en la intensidad lumínica, el ajuste del ritmo respiratorio, la contracción o relajación del músculo liso vascular y del músculo cardíaco. Al igual que la parte sensitiva, la parte motora es involuntaria y se asocia a los reflejos autonómicos. A diferencia del sistema motor voluntario, las motoneuronas somáticas no son únicas, pues se trata de un sistema de dos neuronas, que se denominan preganglionares y postganglionares. Existe un conglomerado de núcleos y pericariones neuronales agrupados en una estructura conocida como ganglios autonómicos. La neurona preganglionar tiene su núcleo en la médula espinal y sus telodendrones en el ganglio autonómico, mientras que la neurona postganglionar tiene su núcleo en el ganglio autonómico y los telodendrones en las estructuras musculares lisas de los órganos secretores u órganos blancos (Guyton, 1993; Bakewell, 1995).

Dependiendo de su origen, las motoneuronas del sistema nervioso autónomo se dividen en dos grupos:

- a) El sistema nervioso simpático, que tiene su origen en la primera vértebra torácica (T1) y llega hasta la segunda vértebra lumbar (L2).
- b) El sistema nervioso parasimpático, que abarca desde los nervios craneanos del tallo cerebral hasta los segmentos sacros 2 y 4 de la médula espinal.

Muchos de los órganos blancos del sistema nervioso autónomo reciben la inervación tanto del sistema nervioso simpático como del sistema nervioso parasimpático, la cual se denomina dual. Estos dos sistemas realizan acciones opuestas sobre los mismos órganos blancos; por ejemplo, el sistema nervioso simpático dilata la pupila, mientras que el sistema nervioso parasimpático la contrae (ver figura 1) (Emson, 1984; David *et al.*, 2000).



**Figura 1. Acciones de los Sistemas Nerviosos Simpático y Parasimpático.**

## 2.2. Neurotransmisores y receptores del Sistema Nervioso Autónomo

Las neuronas del Sistema Nervioso Autónomo se clasifican de acuerdo a los neurotransmisores que poseen o que secretan en los botones terminales. Sólo existen dos neurotransmisores del sistema nervioso autónomo: la acetilcolina y la noradrenalina (NA). Las neuronas que secretan acetilcolina se denominan colinérgicas y las que secretan noradrenalina se denominan adrenérgicas.

Las neuronas colinérgicas comprenden:

- Todas las neuronas preganglionares simpáticas y parasimpáticas.
- Todas las neuronas postganglionares parasimpáticas

Existen receptores para la acetilcolina en la membrana postsináptica, conocidos como receptores colinérgicos, que a su vez se subdividen en dos clases: nicotínicos (la nicotina es su agonista para esta clase de receptores) y muscarínicos (la muscarina es su agonista). Los receptores nicotínicos se encuentran en las neuronas postganglionares simpáticas y parasimpáticas, así como en la placa neuromuscular,

mientras que los muscarínicos se encuentran en todos los efectores (glándulas, músculo liso y cardiaco) del sistema postganglionar simpático (Tabla 1) (Björklund *et al.*, 1988; Landsberg *et al.*, 1994; Perez, 2006).

Receptor	Localización	Efectos
<b>Colinérgicos</b>	Membrana postsináptica, activados por acetilcolina	
Nicotínico	Dendritas neuronales postganglionares simpáticas y parasimpáticas	Excitación, impulsos en neuronas postganglionares
	Células de la médula suprarrenal	Secreción de adrenalina y noradrenalina
	Membranas de músculo esquelético (placa motora)	Excitación, contracción
Muscarínico	Efectores postganglionares parasimpáticos, glándulas	Excitación ó inhibición
	Sudoríparas con innervación postganglionar simpática de tipo colinérgico	Aumento en la sudoración
<b>Adrenérgicos</b>	Membrana postsináptica, activados por adrenalina y noradrenalina	
$\alpha_1$	Músculo liso vascular y visceral, de glándulas salivales, piel, mucosas, riñones, hígado, próstata, pene, vejiga, glándula pineal, músculo esquelético y cardiaco	Contracción, gluconeogénesis, inotropía débil, liberación de melatonina
$\alpha_2$	Músculo liso vascular, intestino, islotes de Langerhans, Plaquetas, adipocitos, riñón, próstata, vejiga, pene, glándula pineal, neuronas postganglionares simpáticas, corazón	Vasodilatación, relajación, aumento de agregación plaquetaria, inhibición de: lipólisis, de la liberación de renina, insulina, neurotransmisores y melatonina
$\beta_1$	Músculo cardiaco, células yuxtglomerulares del riñón, lóbulo posterior de la hipófisis, células adiposas, glándula pineal	Cronotropía, inotropía, aumento en: la secreción de renina, hormona antidiurética, melatonina, desdoblamiento de triglicéridos y liberación de ácidos grasos
$\beta_2$	Músculo liso de vías respiratorias, vasculaturas que van al corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, hígado y vísceras, musculatura circular del iris, hepatocitos, neuronas postganglionares simpáticas, leucocitos, útero, próstata, pene	Inhibición de la respuesta inmune e inflamatoria, relajación, dilatación de bronquios y pupilas, aumento en: glucogenólisis, liberación de neurotransmisores, secreción de insulina y glucagon,
$\beta_3$	Tejido adiposo pardo, pene y vejiga	Lipólisis, termogénesis, relajación

**Tabla 1. Localización tisular de los receptores colinérgicos y adrenérgicos** (Landsberg *et al.*, 1994; Perez, 2006).

Por su parte, las neuronas adrenérgicas liberan noradrenalina, el neurotransmisor por excelencia del sistema nervioso simpático, que se sintetiza y almacena en

vesículas presinápticas y se secreta por exocitosis; sus receptores se encuentran localizados en la membrana postsináptica, y son denominados receptores adrenérgicos (Tabla 1) (Landsberg *et al.*, 1994; Perez, 2006).

### **2.3. Acciones del sistema nervioso simpático**

Durante el esfuerzo físico o el estrés emocional el Sistema Nervioso Simpático predomina sobre el Sistema Nervioso Parasimpático. El tono simpático favorece a la actividad física intensa debido a la producción de energía en forma rápida y prolongada. El miedo, la confusión y la ira también estimulan al Sistema Nervioso Simpático.

La reacción de huida o de lucha es la señal de activación del Sistema Nervioso Simpático sobre la médula suprarrenal, produce liberación de adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo, las cuales a su vez causan los siguientes efectos:

- Dilatación de las pupilas, para permitir una mayor captación de estímulos luminosos en ambientes de semioscuridad.
- Aumento de la frecuencia cardíaca (cronotropismo) y de la fuerza de contracción (inotropismo), así como de la presión arterial, debidas a la acción de la adrenalina sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos.
- Broncodilatación, para facilitar el flujo de oxígeno a los pulmones.
- Constricción de las vasculaturas de los órganos que no son esenciales para la reacción de huida o lucha, como las vísceras abdominales y el riñón, reduciendo el flujo sanguíneo y evitando el gasto innecesario de energía, inducida principalmente por la noradrenalina.
- Vasodilatación en los músculos, corazón, hígado y tejido graso, para aumentar la circulación sanguínea y la producción de energía, necesarias para responder en una situación de peligro.
- Aumento en la tasa metabólica para preparar al cuerpo para la situación de peligro, aumenta el gasto de oxígeno, la glucogenólisis hepática y la lipólisis del tejido adiposo para incrementar la producción de energía.
- Hay un efecto supresor en el sistema inmune.
- Aumento de la concentración de glucosa en sangre, para proveer la energía necesaria en el momento de peligro (Emson, 1984; Landsberg *et al.*, 1994).

Las catecolaminas endógenas juegan un papel muy importante en la homeostasis del organismo, su mecanismo de acción y la regulación de la vía metabólica serán descritos en las secciones posteriores.

#### **2.4. Antecedentes históricos en la investigación de la adrenalina**

Antes de que fuera descubierto el principio activo secretado por la médula de las glándulas suprarrenales, fue aislada la efedrina, un alcaloide proveniente de la hierba de origen chino *ma huang*. En 1856 Vulpian demostró que el cromógeno reductor presente en las células cromafines era un derivado de pirocatecol, altamente inestable y de muy fácil oxidación. En 1895, Oliver y Schäfer demostraron la acción vasopresora de los extractos de glándulas suprarrenales (Bracfort y Talbot., 1968).

En 1901 Abel, Von Fürth y Takamine, entre otros, purificaron el extracto suprarrenal para posteriormente identificar y sintetizar químicamente a la adrenalina. En 1910, Berger y Dale describieron muchas de las relaciones básicas entre la estructura química de la adrenalina y su actividad adrenérgica. En 1930, Chen y Schmidt introdujeron a la adrenalina en la práctica médica occidental.

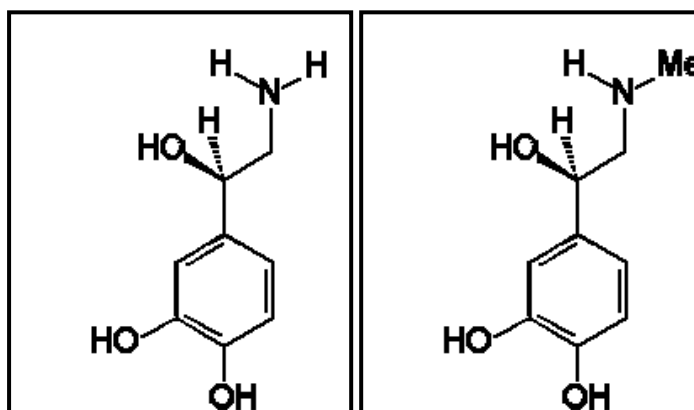
Desde su descubrimiento, se la han asignado varios nombres a la adrenalina: esfigogenina, suprarrenina, epinefrina, o bien su nombre químico (L)-1-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilamino-etanol (Figura 2). Por supuesto, la noradrenalina, también se conoce como levarterenol, norepinefrina o (L)-1-(3,4-dihidroxifenil)-2-amino-etanol. Ambas catecolaminas endógenas se sintetizan en la médula suprarrenal de animales superiores, y las proporciones en las que se encuentran cada una en los extractos de médula suprarrenal son variables, aunque generalmente la proporción en adultos es aproximadamente 85 % de adrenalina y 15 % de noradrenalina, mientras que durante la niñez es la noradrenalina la que predomina. En un extracto de tumor de feocromocitoma, la proporción de noradrenalina puede aumentar hasta casi un 90 % (Mcgeer, 1978).

#### **2.5. Almacenamiento y síntesis fisiológica de las catecolaminas**

En el Sistema Nervioso Simpático la noradrenalina se almacena en las vesículas de secreción de las terminales axónicas de las neuronas postganglionares simpáticas, es liberada hacia el torrente sanguíneo en respuesta a la transmisión sináptica del impulso nervioso (o *in vitro* por medio de la despolarización por potasio, así como por otros tratamientos despolarizantes) en un mecanismo dependiente de calcio. La mayor parte de la noradrenalina es metilada por una feniletanolamina N-metil-



transferasa, para producir adrenalina, que también se almacena en vesículas de secreción.

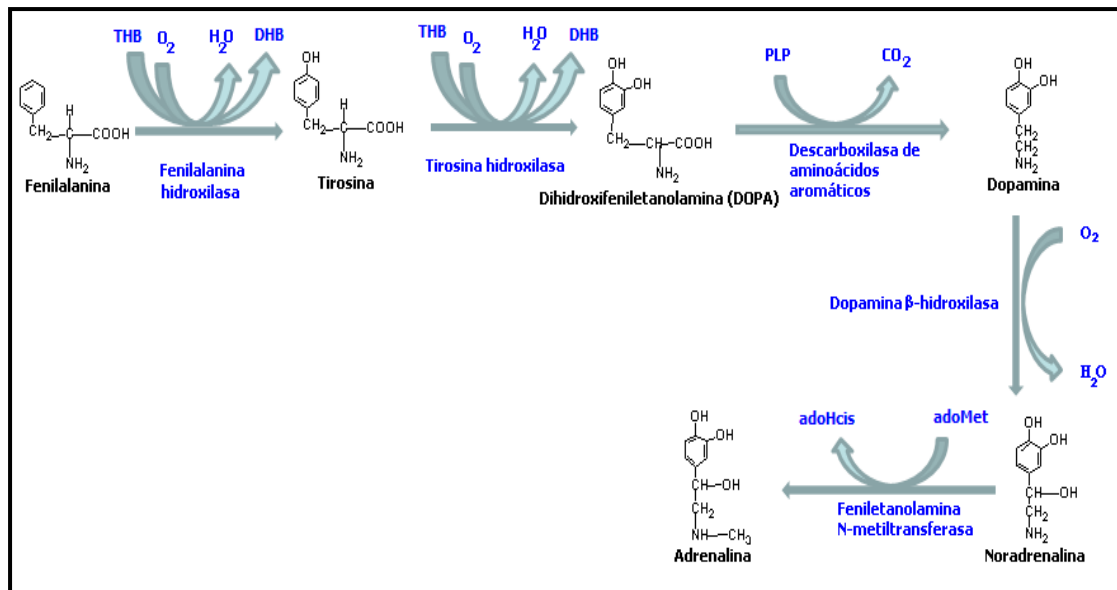


**Figura 2. Estructura química de la noradrenalina y la adrenalina.**

La síntesis biológica de la adrenalina y noradrenalina ocurre a través de la misma ruta metabólica. Se originan a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina: la fenilalanina se oxida por acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa para generar tirosina; una posterior oxidación mediada por la enzima tirosina hidroxilasa origina dihidroxi-para-fenilalanina (DOPA), una descarboxilación mediada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos produce dopamina, que a su vez es hidroxilada en el carbono  $\beta$  por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, para formar noradrenalina. La reacción que lleva a la producción de adrenalina ocurre por medio de la enzima feniletanolamina N-metil transferasa, que produce una metilación en el grupo amino de la noradrenalina (Figura 3). En el riñón y en el hígado existe un sistema enzimático capaz de efectuar la descarboxilación de la DOPA con producción de 3-4-dihidroxi-feniletilamina (al igual que en la médula adrenal). Esta observación sugiere que las fases previas de la síntesis se llevarían a cabo en el hígado, la oxidación en la cadena lateral que conduce a la noradrenalina se llevaría a cabo en la médula suprarrenal (Mcgeer, 1978; Bradford, 1988).

## **2.6. Destino de la adrenalina en el organismo**

La adrenalina se inactiva rápidamente por la enzima catecol-o-metil transferasa (COMT) que reemplaza el protón del grupo hidroxilo en la posición meta por un grupo metilo. La desaminación oxidativa por la monoaminoxidasa (MAO) juega un papel secundario en su inactivación. De estos dos procesos resulta la aparición de ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico en la orina. El nivel de esta sustancia en la orina es una prueba útil en el diagnóstico del feocromocitoma (Bradford, 1988).



**Figura 3. Vía de síntesis biológica de la adrenalina y la noradrenalina.** La fenilalanina se oxida por acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa, generándose tirosina; una posterior oxidación por la tirosina hidroxilasa origina la DOPA. Una descarboxilación mediada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos produce dopamina, que a su vez es hidroxilada por la dopamina β-hidroxilasa, para formar noradrenalina. La feniletanolamina N-metiltransferasa produce una metilación en el grupo amino de la noradrenalina, dando lugar a la adrenalina. Se pueden encontrar sistemas de síntesis de catecolaminas en la médula suprarrenal, el hígado y en el *locus ceruleus* (Nelson *et al.*, 2005).

## 2.7. Toxicidad de la adrenalina

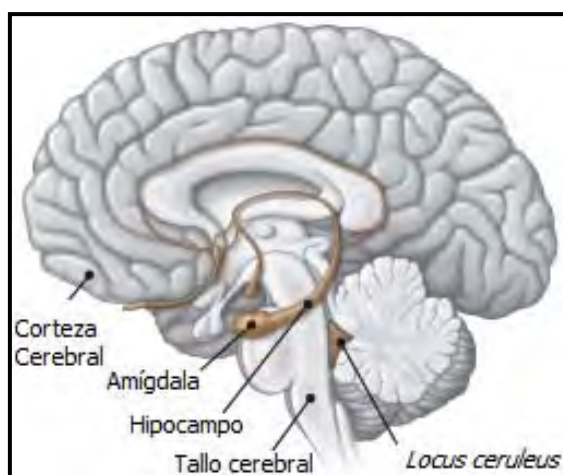
Las dosis terapéuticas usuales de adrenalina pueden producir efectos tóxicos menores. Los síntomas usuales son ansiedad, temblor, cefalea, miedo y palpitaciones. Estos son transitorios y no se consideran de peligro. Los efectos tóxicos del hiperadrenalinismo (hipertensión paroxística), la sobredosificación o de la inyección intravenosa son de tres clases:

- 1) La presión arterial elevada puede causar hemorragia cerebrovascular y muerte.
- 2) A causa de la constricción periférica y de la estimulación cardíaca, puede haber edema pulmonar debido a hipertensión pulmonar arterial, como respuesta tóxica mortal a la adrenalina.
- 3) Hiperirritabilidad ventricular, generadora de arritmias.

## 2.8. Mecanismo de acción de la adrenalina

La adrenalina y la noradrenalina están contenidas dentro de la médula suprarrenal, pero en tipos celulares diferentes, y son liberadas al torrente sanguíneo por acción de la acetilcolina, mediante impulsos nerviosos de las fibras autónomas

preganglionares que inervan a las células medulares. La médula suprarrenal es esencialmente un ganglio simpático, con neuronas postganglionares reemplazadas por un tipo de células histológicamente diferentes. Aunque la adrenalina puede funcionar como neurotransmisor, el funcionamiento del sistema nervioso simpático queda completamente a cargo de noradrenalina, que es su neurotransmisor. La masa más compacta y densa de neuronas adrenérgicas la constituye el *locus ceruleus*, el cual se ha identificado en el tronco cerebral (figura 4) (Emson, 1984; Björkund 1988).



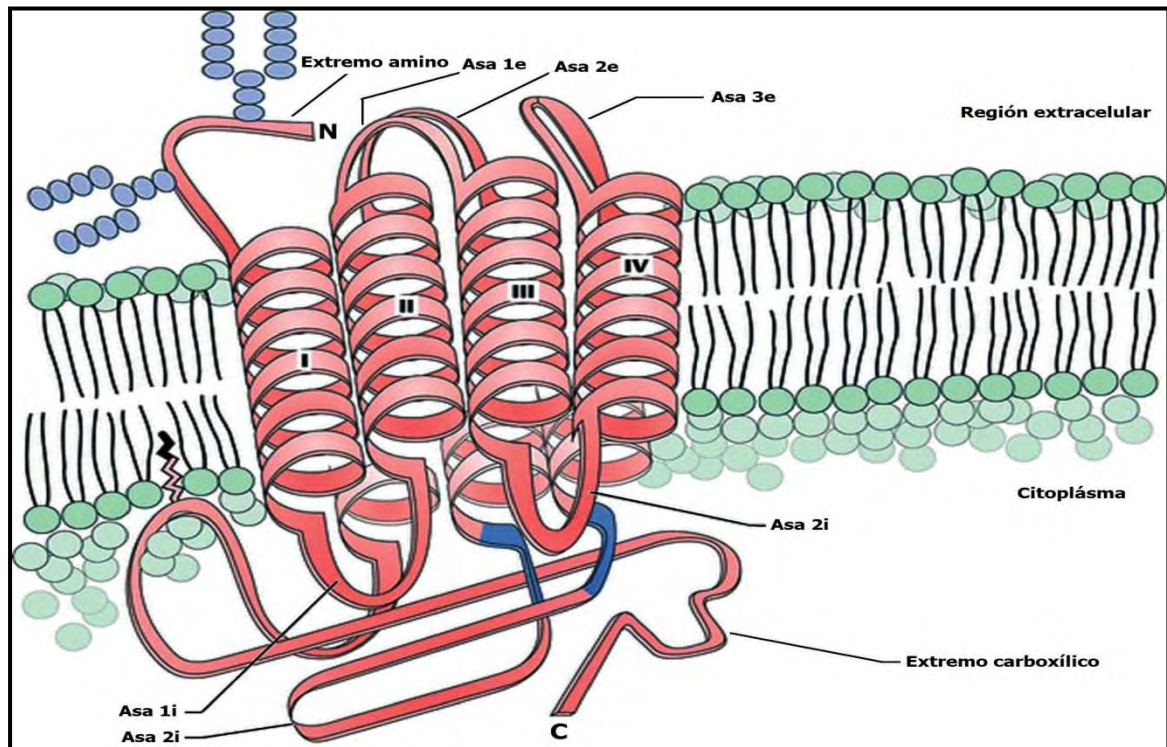
**Figura 4. Localización del *locus ceruleus*.** Es la masa de neuronas adrenérgicas ubicada en el tronco cerebral, produce grandes cantidades de noradrenalina cuando existen situaciones de peligro.

Los receptores adrenérgicos (ARs) son el sitio de acción de las catecolaminas, y son considerados como pertenecientes a una célula efectora más que a una terminación nerviosa. La denervación no inactiva la respuesta de los receptores a la adrenalina, por el contrario, la aumenta. Existe evidencia de que los receptores adrenérgicos están presentes antes de que se establezca la inervación y de que ciertas células efectoras que nunca son inervadas responden característicamente a la adrenalina y a otros agentes adrenérgicos (Emson, 1984).

La adrenalina y los compuestos relacionados producen efectos adrenérgicos que son tanto excitadores como inhibidores. Aquellas respuestas atribuidas a la activación de un receptor  $\alpha$  son primariamente excitadoras, con la excepción de la relajación intestinal. Aquellas respuestas atribuidas a la activación de un receptor  $\beta$  son primariamente inhibidoras, con la excepción de los efectos estimulantes miocárdicos (Tabla 1).

## 2.9. Los receptores adrenérgicos

Los ARs se expresan de manera ubicua en mamíferos, median las acciones de la adrenalina y la noradrenalina, regulando aspectos críticos en el control de la presión sanguínea, la contractilidad del miocardio, la función pulmonar, metabolismo y la actividad del sistema nervioso simpático (Hoffman *et al.*, 1995). Los agonistas y antagonistas adrenérgicos constituyen el mayor grupo de drogas terapéuticas prescritas para la falla cardíaca congestiva, hipertensión y asma, entre otras. Los ARs son proteínas integrales de la membrana pertenecientes a la súper familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) con estructura típica de siete dominios transmembranales (TM), conectados por 3 asas intracelulares (i) y 3 extracelulares (e) (Figura 5) (Cotecchia *et al.*/2000; Malbon *et al.*/2001).



**Figura 5. Representación esquemática de la topología de los ARs.** En la figura se puede observar la formación de 3 asas extracelulares (e) y de 3 asas intracelulares (i). Las asas extracelulares, en conjunto con el extremo amino forman el sitio de unión al ligando (Tomada de Malbon *et al.*, 2001)

Un estudio con mutantes de varios GPCRs, ha revelado que la conformación tridimensional cilíndrica formada por las  $\alpha$ -hélices del receptor contribuye a la formación del sitio de unión al ligando, mientras que las secuencias de aminoácidos localizadas en las regiones intracelulares median la interacción del receptor con las proteínas G, así como con diversas proteínas de señalización y reguladoras (Wess, 1997). Estudios recientes se han concentrado en estudiar las interacciones

moleculares de la adrenalina y la noradrenalina con los subtipos  $\alpha_{1A}$ -AR y  $\alpha_{1B}$ -AR, con el fin de encontrar los aminoácidos clave en la interacción ligando-receptor (Cavalli *et al.*, 1996; Hwa y Perez, 1996). La expresión de los ARs pueden ser regulada positiva o negativamente, ya sea mediante la activación de factores de transcripción ó bien por la represión genética cuando son estimulados de manera crónica con su ligando; post-trascricionalmente a través de la desestabilización de mRNA y post-traduccionalmente mediante palmitoilación y fosforilación (Malbon *et al.*, 2001). El estudio farmacológico de los diferentes subtipos de ARs ha permitido a los investigadores clasificarlos de acuerdo a la afinidad que presentan a diversos compuestos sintéticos.

### **2.9.1. Farmacología de los ARs**

En 1948 Ahlquist describió, por caracterización farmacológica (observando el orden de afinidad por sus agonistas), la existencia de dos clases de receptores adrenérgicos:  $\alpha$  y  $\beta$ . Posteriormente con el refinamiento de la farmacología y la creación de nuevos compuestos, así como la clonación molecular de nuevos receptores, se propuso la existencia de tres grandes familias de ARs con tres subtipos cada una: Los  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ), los  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) y los  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). Cada uno de los subtipos puede ser diferenciado por farmacología, usando diferentes agonistas y antagonistas. Algunos estudios han demostrado que existen AR "vacíos" o no ocupados por su ligando que presentan un nivel intrínseco de señalización. En algunos casos se ha observado que ciertos ligandos que actúan típicamente como antagonistas estrictos, no solamente bloquean las acciones de los agonistas, sino que por sí mismos pueden disminuir la señalización basal. Estos agentes se han denominado "agonistas inversos" y proporcionan una nueva dimensión en farmacología y posibilitan una intervención terapéutica para las vías de señalización controladas por los receptores adrenérgicos (Malbon *et al.*, 2001).

### **2.9.2. Aspectos moleculares de los ARs**

Aunque la clasificación de los ARs se llevó a cabo principalmente mediante farmacología, la estructura molecular de las distintas isoformas fue dilucidada hasta mediados de los años 80. Los ARs son muy difíciles de purificar, debido principalmente a que la mayoría de los miembros de la familia son expresados por las células en niveles relativamente bajos, además de ser receptores que por sus

características bioquímicas necesitan ser solubilizados en detergentes, lo que disminuye la eficiencia de la purificación.

Partiendo de grandes cantidades de células se logró la purificación de los receptores  $\beta_1$ -AR y  $\beta_2$ -AR a través de la técnica de cromatografía de afinidad, revelando un peso molecular de 65 kDa. La clonación molecular fue posible gracias a la fragmentación química y secuenciación de los fragmentos de la proteína, primero fue el  $\beta_2$ -AR (Dixon *et al.*, 1987), posteriormente el  $\beta_1$ -AR (Yarden *et al.*, 1986) y finalmente del  $\alpha_{1B}$ -AR (Cotecchia *et al.*, 1990). La clonación molecular ayudó a completar el conocimiento de la familia de los AR y permitió el análisis de su estructura y función por medio de la mutagénesis y la creación de diversos receptores adrenérgicos quiméricos, que diferían en el sitio de unión al ligando o bien en la selectividad de las vías de señalización que se dan entre dos miembros de la familia (Kobilka *et al.*, 1988). La clonación molecular del  $\beta_3$ -AR, que es considerado como un receptor  $\beta$  atípico, debido a su farmacología única, es la más recientemente reportada; aparentemente el  $\beta_3$ -AR es responsable de la degradación de lípidos y de la termogénesis cuando es estimulado por las catecolaminas (Emorine *et al.*, 1989).

Todos los ARs muestran una configuración de siete dominios transmembranales, en donde el extremo amino se localiza en la región extracelular, mientras que el extremo carboxílico se encuentra en la región intracelular. El tamaño de las moléculas de los ARs va desde los 408 aminoácidos ( $\beta_3$ ) hasta los 572 ( $\alpha_{1D}$ ). Los ARs contienen carbohidratos unidos a residuos de asparagina (glicosilación) y existe un posible sitio de palmitoilación en el extremo carboxílico. La topología del  $\beta_2$ -AR se dedujo mediante el uso de anticuerpos, que tienen como blanco la porción extracelular hidrofílica de la proteína, que se forma por la interdigitación con los siete segmentos transmembranales hidrofóbicos. Los segmentos hidrofóbicos de los ARs se ordenan en la membrana creando una canasta, de la cual sobresalen las 3 asas extracelulares hidrofílicas, que junto con el extremo amino del receptor y mediante la alineación de fuerzas electrostáticas débiles, forman el sitio de unión para la catecolamina que actúa como ligando. Dicha conformación de canasta se encuentra embebida en la bicapa membranal, posiblemente en contacto con un dominio citoplasmático del receptor, que al unirse a la proteína G indicada, es capaz de activarla una vez que se une el agonista. Otros miembros de la súper familia de los GPCRs que tienen como ligandos a moléculas de naturaleza proteica, tienen un extremo amino mucho más largo y complejo que el de los ARs, pues la formación del sitio de unión del ligando requiere una mayor cantidad de interacciones

electrostáticas débiles. Finalmente, investigaciones hechas sobre la conformación "activa" de los receptores adrenérgicos y otros receptores acoplados a proteínas G, han generado por mutación dirigida receptores constitutivamente activos, que llevan a una activación prolongada de sus proteínas G acopladas y de las moléculas de señalización activadas cascada abajo. Así, el receptor  $\beta_2$ -AR con mutaciones específicas localizadas en la tercera asa intracelular se activa, fosforila y desensibiliza constitutivamente. Mutaciones similares en el  $\alpha_{1B}$ -AR muestran que el receptor no solamente es activo, sino que se comporta como un protooncogen, incrementando la proliferación celular y la capacidad transformante de las células en donde es expresado (Malbon *et al.*, 2001).

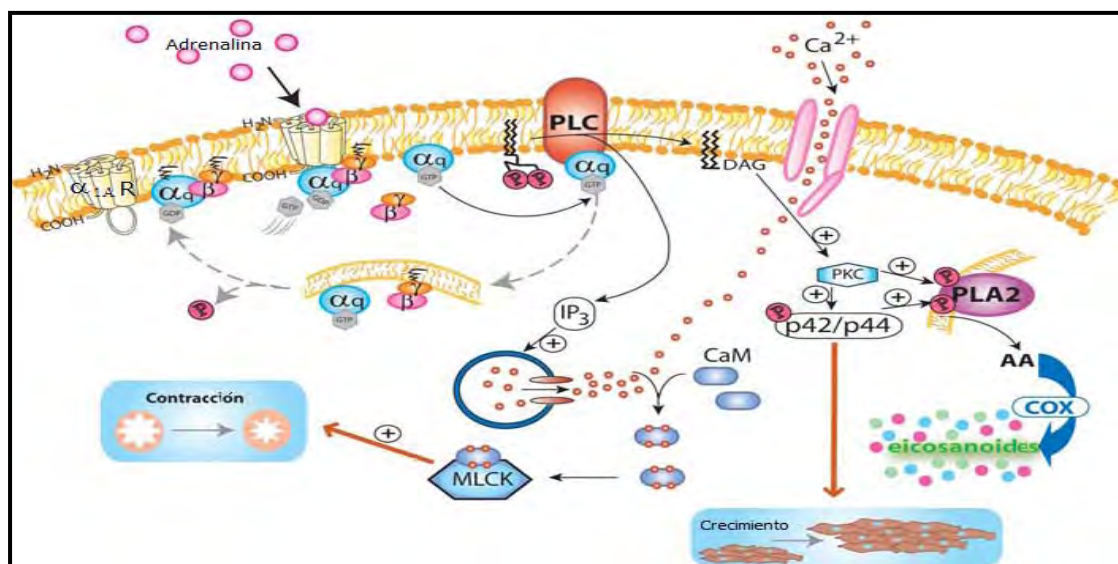
Gracias a los estudios hechos sobre ARs mediante mutaciones específicas y la generación de receptores truncados, así como de los receptores silvestres y proteolizados, se han localizado dos regiones de los ARs involucradas en la señalización de las proteínas G heterotriméricas: los extremos amino y carboxilo del asa 3i. En ambos casos las regiones parecen tener una longitud relativamente corta (6–9 aminoácidos) y la integridad de la secuencia participante parece no tener relevancia sobre la señalización de las proteínas G. Usando anticuerpos contra la región del asa 3i, se demostró que dicha región es la encargada de las interacciones proteína-proteína con las proteínas G. Los sitios de contacto de los receptores adrenérgicos incluyen probablemente aquellos que interactúan con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta/\gamma$  del complejo heterotrimérico de las proteínas G (Malbon *et al.*, 2001).

En resumen, las estructuras más importantes para la actividad biológica de los ARs son: las asas extracelulares y el extremo amino como formadores del sitio de unión del ligando, y la tercera asa intracelular y el extremo carboxílico como sitios de reconocimiento, unión y activación de la proteína G heterotrimérica. Además de la activación de la proteína G y la propagación de la señal hormonal al interior de la célula, los ARs también se encargan de regular positiva ó negativamente los efectos de su propia activación. La señalización y la regulación de los ARs serán el tema de los siguientes apartados.

### **2.9.3. Señalización de los ARs**

Las similitudes entre los miembros de la familia de los ARs sólo existen en las regiones extracelular y transmembranal de éstos. Son capaces de unir cierto número de agonistas comunes y llevar a cabo una señalización vía proteínas G. Sin embargo los ARs difieren en la especificidad y naturaleza de los efectores que se encuentran

río abajo de su señalización. Los miembros de la familia de los  $\alpha_1$ -AR (en esta investigación será estudiado el  $\alpha_{1A}$  AR) transducen la señal hormonal a través de la unión de las catecolaminas endógenas y la subsecuente activación de la proteína  $G_{q/11}$ . El resultado es la activación de la fosfolipasa C $\beta$  (PLC- $\beta$ ), que hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana, rompiendo el enlace éster situado en la tercera posición del esqueleto del glicerol, liberando 1,2 diacilglicerol y una cadena alifática con un fosfato que la hace soluble (1,4,5-inositol trifosfato o IP<sub>3</sub>). La generación de fosfatos de inositol eleva la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular de 0.1  $\mu$ M a 1  $\mu$ M, a través de su unión activadora a canales de calcio en el retículo endoplásmico. La concentración elevada de calcio, junto con el diacilglicerol activan diversas isoformas de la proteína cinasa C (PKC). La simple unión del agonista a los  $\alpha_1$ -AR puede activar canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje situados en la membrana plasmática. Un claro ejemplo de una respuesta tisular a los  $\alpha_1$ -AR es la contracción del músculo liso (Figura 6) (DeGasparo *et al.*, 2000).



**Figura 6. Vía de señalización del  $\alpha_{1A}$  AR.** Una vez que la adrenalina se ha unido al  $\alpha_{1A}$  AR, se produce la activación de la proteína  $G_q$  heterotrímica, que recambia GDP por GTP y se separa en subunidades  $G_{\alpha_q}$  y  $G_{\beta\gamma}$ . La subunidad  $G_{\alpha_q}$  activa a la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfolípidos de membrana, produciendo diacilglicerol (DAG) y 1,4,5 inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> se une y activa canales de calcio en el retículo endoplásmico, produciendo la liberación de calcio al citoplasma. El  $Ca^{2+}$  junto con el DAG activan isoformas clásicas y novel de PKC, que a su vez es capaz de activar la cascada de fosforilación de las MAP cinasas (p42/p44), teniendo como efecto final la proliferación celular. La PKC también puede activar a la fosfolipasa A2 (PLA2), promoviendo la formación de ácido araquidónico (AA) y eicosanoides, que participan en el proceso inflamatorio. El  $Ca^{2+}$  se une y activa a la calcio calmodulina (CaM), que es una proteína que funciona como activadora de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La MLCK fosforila a la cadena ligera de la miosina, produciendo la contracción del músculo liso vascular (Modificado de Billington y Penn, 2003).



Los  $\alpha_2$ -AR activan a las proteínas  $G_i$  y  $G_o$ , que inhiben a las adenilato ciclasas [disminuyendo los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP) y la actividad de la proteína cinasa A (PKA)], inhiben a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y activan a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de  $K^+$ . Las respuestas fisiológicas mediadas por los  $\alpha_{2A}$ -AR incluyen sedación, analgesia e hipertensión, mientras que para los  $\alpha_{2B}$ -AR la respuesta más notable es la vasoconstricción. En contraste, la estimulación por el agonista sobre los  $\beta_{1-3}$ -AR generalmente activa a la adenilato ciclasa, vía  $G_s$ , que a su vez activa a la PKA. En corazón, la activación de los  $\beta_1$ -AR incrementa el ritmo cardiaco y la fuerza de contracción, mientras que la activación de los  $\beta_2$ -AR induce la relajación del músculo liso. El hecho de que existan células que expresen a múltiples miembros de la familia de los AR demuestra que un solo ligando -la adrenalina-, puede activar simultáneamente a varios tipos de proteínas G, acoplándose a diversos efectores que tienen el potencial de generar efectos opuestos en la señalización de una sola célula. Este potencial para la diversidad de señalización muestra la complejidad del proceso de señalización, que es característico de las catecolaminas, así como de las drogas que mimetizan o bloquean los efectos de dichas hormonas (Emorine *et al.*, 1989; Malbon *et al.*, 2001).

#### **2.9.4. Desensibilización de los ARs**

La estimulación crónica de los ARs provoca a largo plazo la regulación negativa de la expresión genética, mediante mecanismos transcripcionales que reducen la cantidad de mRNA de los receptores. A corto plazo ocurre una atenuación reversible de la señalización, que desensibiliza a la vía por la estimulación continua con el agonista. La reversibilidad refleja la modificación post-traducciona, que es la característica de la desensibilización, y por lo tanto, de la fosforilación de proteínas (Hausdorff *et al.*, 1990).

Existen dos modos básicos de desensibilización para los ARs:

1. La desensibilización heteróloga consiste en la activación por un ligando que resulta en la desensibilización de otros receptores, además de los activados directamente por el ligando. La estimulación de los GPCRs acoplados por ejemplo a la adenilato ciclasa vía la proteína  $G_s$ , a menudo desensibiliza muchos receptores que también están acoplados a la proteína  $G_s$ , incluso aquellos no implicados en el reconocimiento inicial del agonista y la activación. En esta situación, la activación de la adenilato ciclasa promueve la acumulación de cAMP y la activación de la PKA. Los GPCRs con sitios

canónicos para PKA, después de ser fosforilados, son incapaces de activar a la adenilato ciclasa. Así, la fosforilación de los GPCRs por PKA induce el desacoplamiento de la proteína  $G_s$  en varios tipos de receptores, aunque solamente se haya activado un solo tipo de receptor y este comparta una vía de señalización (por ejemplo activación de la adenilato ciclasa) con los otros. Muchos subtipos de ARs tienen sitios consenso para la fosforilación por PKA, lo cual sugiere que la activación de un AR acoplado a la proteína  $G_s$  es capaz de desensibilizar a ARs que están acoplados a las proteínas  $G_q$  ó  $G_i$  (Figura 7) (Billington y Penn, 2003).

Un mecanismo alternativo de desensibilización heteróloga ocurre en los receptores acoplados a  $G_{q/11}$ , los cuales una vez unidos a su ligando son capaces de activar a la PKC vía la producción de DAG e IP3. Las isoformas de PKC son capaces de fosforilar a los receptores que contienen sitios consenso de fosforilación por PKC en la tercera serina intracelular y en el extremo carboxílico, desensibilizándolos. Como en el caso de la activación de PKA, la PKC fosforila a cualquier receptor con sitios consenso, aún cuando dicho receptor no esté involucrado directamente en la señalización activada por el receptor acoplado a  $G_{q/11}$  (Figura 7) (Billington y Penn, 2003).

La desensibilización heteróloga mediada por isoformas de PKC será el aspecto más importante que se analizará en esta investigación, en la cual se generaron mutantes del  $\alpha_{1A}$  AR humano, cambiando las serinas y treoninas por alaninas y valinas en los sitios consenso para PKC, con el fin de determinar el papel de dichos sitios en la desensibilización del receptor.

2. La desensibilización homóloga se presenta en la atenuación de la transducción de señales de la propia vía de señalización de los GPCRs. Solamente los receptores ocupados por el agonista son blancos para la desensibilización homóloga, en contraste con la desensibilización heteróloga, que se puede extender a GPCRs no ocupados por ligando e incluso a los no relacionados con la vía activada, pero que contienen sitios para la fosforilación de PKA, por ejemplo. Aunque ambas formas de desensibilización funcionan a través de la fosforilación de proteínas, los mecanismos son distintos. La fosforilación de ARs ocupados por el agonista es catalizada por los miembros de una nueva familia de proteína cinasas, llamadas cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Se han clonado molecularmente

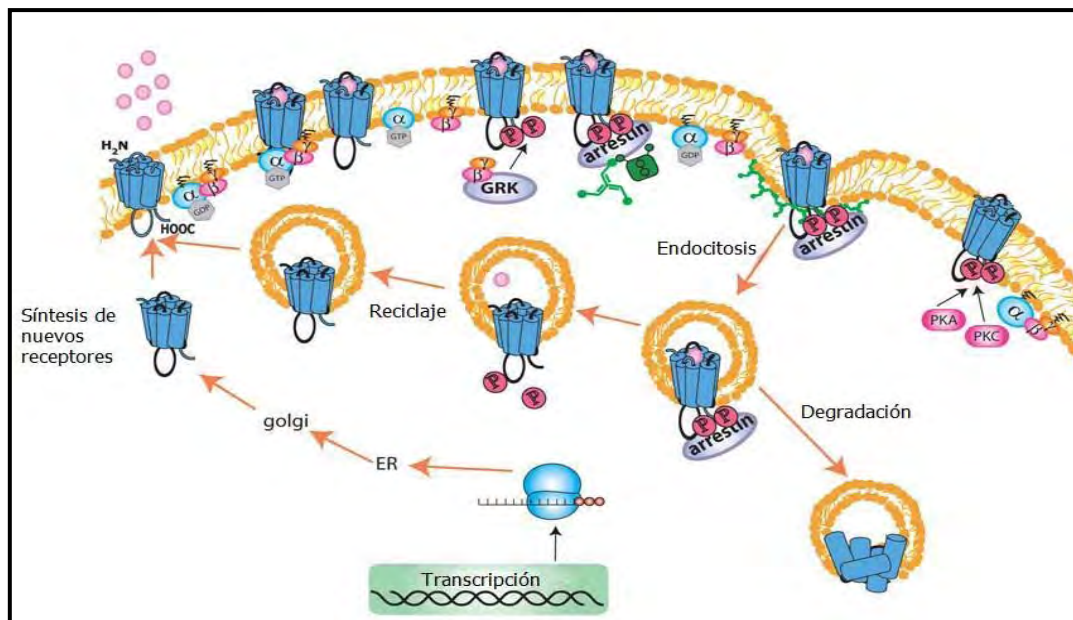
a seis GRKs, de las cuales tres (GRK2, GRK3 y GRK5) se ha observado que fosforilan a los miembros de la familia de los ARs (Krupnick y Benovic, 1998). A diferencia de la desensibilización heteróloga, en la cual simple la fosforilación de  $\beta$ -AR por PKA conduce a una atenuación en la señalización del receptor mediada por la proteína  $G_s$ , la desensibilización homóloga mediada por las GRKs no es suficiente para atenuar completamente la función del receptor sin la participación de otras proteínas accesorias. En particular, el receptor adrenérgico fosforilado por GRK muestra una alta afinidad para el reclutamiento de algunos miembros de la familia de proteínas denominadas arrestinas. El mecanismo fue descrito inicialmente en la vía de fototransducción visual, en la cual el receptor de luz llamado rodopsina es fosforilado por GRK1, posteriormente se une la arrestina, imposibilitando el acoplamiento y la activación de la proteína G. Las arrestinas parecen desempeñar un papel más amplio en la regulación del acoplamiento de los ARs con la proteína G. Para el  $\beta$ 2-AR, dos arrestinas ( $\beta$ -arrestina 1 y  $\beta$ -arrestina 3) se unen al receptor fosforilado por GRK, e imposibilitan el acoplamiento a la proteína  $G_s$ . Aunque se encuentran confinados al extremo carboxilo de los ARs, la identificación exacta de los sitios de fosforilación por GRK no ha sido determinada (Figura 7) (Tran *et al.*, 2004).

En esta investigación se retomarán de los conceptos de la desensibilización homóloga y heteróloga para el estudio del  $\alpha_{1A}$  AR humano, del cual se sabe muy poco acerca de los mecanismos por los cuales regula negativamente su señalización. Se especula que en la regulación del  $\alpha_{1A}$  AR están involucradas tanto la fosforilación por PKC como por GRK de la tercera asa intracelular y del extremo carboxílico, y que hay una participación importante de la maquinaria de las vesículas recubiertas de clatrina/arrestinas.

Las arrestinas participan en un aspecto adicional de la regulación de receptores: el secuestro de GPCRs después de la activación de los receptores, seguido de la desensibilización (Kohout y Lefkowitz, 2003). Existe evidencia de que la  $\beta$ -arrestina funciona como una proteína de anclaje que une los receptores fosforilados a una proteína del citoesqueleto llamada clatrina. Se piensa que las clatrininas median el movimiento endocítico de proteínas desde la superficie celular, a través de vesículas

recubiertas de clatrina, hacia los sitios intracelulares en los cuales se degradan o reciclan los GPCRs (Figura 7) (Marchese *et al.*, 2003).

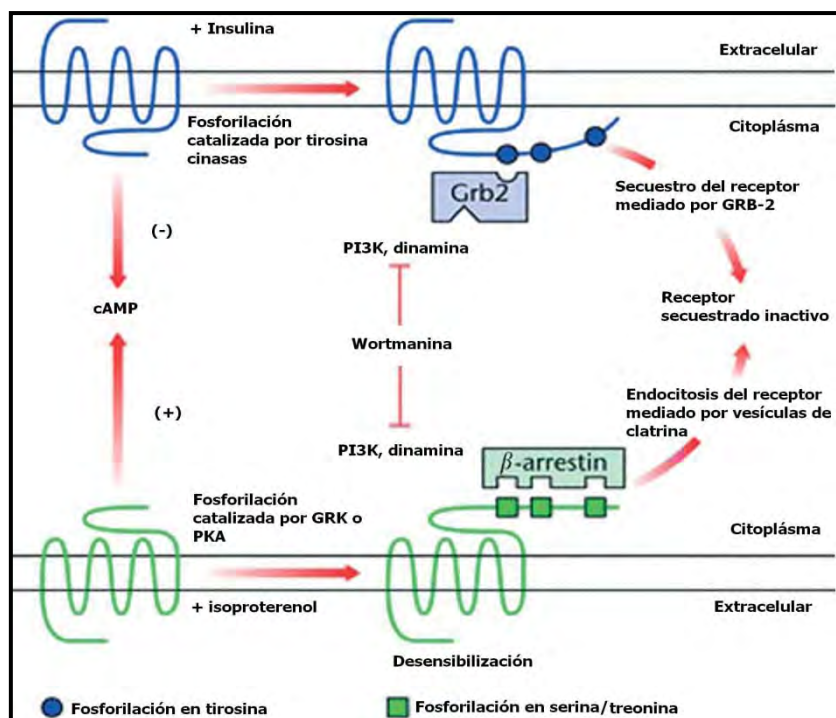
Después de una activación crónica y la subsiguiente desensibilización en respuesta de la adenilato ciclasa, se ha observado que el  $\beta_2$ -AR estimula a las proteína-quinasas activadas por mitógeno ERK1 y ERK2. Este cambio único en la señalización del GPCR es un claro ejemplo de conmutación en la señalización, que sugiere que las vías que están experimentando una regulación, pueden cambiar durante la desensibilización de la vía regulada a una segunda vía de señalización. Así, la desensibilización heteróloga del  $\beta_2$ -AR catalizada por PKA conduce en última instancia a la activación de ERK1 y ERK2, de forma que es sensible a la inhibición y por lo tanto dependiente de la actividad de PKA.



**Figura 7 . Vías de desensibilización-resensibilización de los GPCRs.** Una vez que el receptor se ha unido a su ligando, pueden ocurrir 3 diferentes eventos de fosforilación: 1. La subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G activa a GRK, que a su vez fosforila al receptor y promueve el reclutamiento de las arrestinas. Las arrestinas reclutan clatrina, que forman una vesícula en la membrana que es endocitada por la acción de la dinamina y el citoesqueleto (desensibilización homóloga). La vesícula endocítica puede fusionarse con lisosomas, conduciendo al receptor a la degradación, o bien puede permear protones, acidificando el medio intravesicular y promoviendo la disociación del ligando, para posteriormente reciclar al receptor a la membrana celular. 2. El receptor puede ser fosforilado por PKC, imposibilitando la unión de la proteína G heterotrimérica por impedimento estérico (desensibilización heteróloga). 3. El receptor puede ser fosforilado por PKA, imposibilitando la unión de la proteína G heterotrimérica por impedimento estérico (desensibilización heteróloga). Los tres procesos de fosforilación son reversibles, mediante la acción de fosfatasas y serina y treonina, como P2A, posibilitando así la resensibilización del receptor. También existe la síntesis *de novo* de receptores (Billington y Penn, 2003).

### 2.9.5. Transinactivación de los ARs mediada por tirosina cinasas.

Un mecanismo adicional de desensibilización heteróloga de los ARs es la transinactivación por fosforilación en tirosina mediada por factores de crecimiento o receptores con actividad de tirosina cinasa. Un ejemplo de este tipo de regulación es la transinactivación del  $\beta_2$ -AR por la insulina e IGF-1. Es bien conocida la capacidad de la insulina para contrarrestar las acciones de las catecolaminas, sin embargo, no se conocen los efectos moleculares de la regulación a nivel de los ARs (Baltensperger *et al.*, 1996). Un tratamiento corto de insulina sobre las células, conduce a una pérdida de la función del  $\beta_2$ -AR. A través de estudios de marcaje metabólico se observó que el  $\beta_2$ -AR es fosforilado en células pre-estimuladas con insulina y que la fosforilación está localizada en tirosina (Baltensperger *et al.*, 1996). Se generaron dos hipótesis igualmente plausibles para dicha fosforilación: la activación indirecta vía insulina de una cinasa de tirosina río abajo del receptor; o bien la fosforilación directa del  $\beta_2$ -AR por el mismo receptor de insulina. A la par de los estudios de marcaje metabólico, se realizaron estudios de reconstitución *in vitro*, utilizando el receptor de insulina purificado y el  $\beta_2$ -AR recombinante, en donde se demostró que los GPCRs son de hecho capaces de actuar como sustratos para los receptores con actividad de cinasas de tirosina. El  $\beta_2$ -AR es fosforilado en tres residuos de tirosina localizados en el extremo carboxílico del receptor. El residuo de tirosina del  $\beta_2$ -AR que es fosforilado preferencialmente por el receptor de insulina, constituye un dominio de unión con homología a Src tipo 2 (dominio SH2) al cual se pueden unir varias moléculas después de la fosforilación. Una de estas proteínas -Grb-2- que es capaz de interactuar con dominios SH2, también contiene un sitio de unión para dominios SH3 de otras proteínas, proporcionando así un acoplamiento proteína-proteína entre el  $\beta_2$ -AR fosforilado y otras moléculas reguladoras. Además de Grb2, la cinasa del fosfatidil-inositol 3 (PI3K) y la GTPasa dinamina, también se unen al  $\beta_2$ -AR cuando es fosforilado. La PI3K y la dinamina están implicados en el tráfico celular de proteínas, una actividad sumamente relevante en desensibilización por secuestro de los AR. La mutación de este dominio potencial de unión SH2 del  $\beta_2$ -AR conduce a una pérdida en la capacidad de la insulina para contrarregular las acciones de las catecolaminas sobre la adenilato ciclasa, demostrando la funcionalidad del  $\beta_2$ -AR como sustrato alternativo del receptor de insulina (IR) (Figura 8) (Malbon *et al.*, 2001).



**Figura 8. Transinactivación de los ARs mediada por insulina.** Arriba, se observa un AR fosforilado en tirosina por acción de la insulina, dicha fosforilación promueve el reclutamiento de Grb2, que induce el secuestro del receptor (transinactivación por fosforilación en tirosina). Abajo, se observa a un AR fosforilado en serina y treonina por la acción de GRK ó PKA, la fosforilación induce el reclutamiento de las arrestinas y la endocitosis vía vesículas recubiertas de clatrina (Modificada de Malbon *et al.*, 2001).

Cuando las células que expresan al  $\beta_2$ -AR son estimuladas con el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), se induce la fosforilación en tirosina en la segunda asa intracelular del  $\beta_2$ -AR. Dichos sitios de fosforilación son distintos a los fosforilados por el receptor de insulina, y forman un sitio de unión a la proteína adaptadora Shc. La diferencia en los sitios de fosforilación para IGF-1 e insulina es una muestra de que la regulación negativa de los ARs por diversas señales puede ser tan específica, que es capaz de reconocer a los efectores provenientes de la activación de determinado tipo de receptor, teniendo estructuras blanco para cada caso particular.

### 2.9.6. Secuestro de los ARs mediado por el agonista.

La desensibilización del  $\beta_2$ -AR inducida por el agonista y por los receptores con actividad de tirosina cinasa es hasta cierto punto similar. Ambos procesos emplean la fosforilación del receptor para alterar su función, además de involucrar diversas proteínas accesorias y mecanismos celulares para secuestrar al  $\beta_2$ -AR. El secuestro

de los ARs en respuesta a un estímulo de catecolaminas es un fenómeno frecuentemente observado, y está presente en la mayoría de los GPCRs después de un estímulo con sus agonistas. Las primeras observaciones del secuestro del  $\beta_2$ -AR fueron hechas usando un radioligando del receptor  $\beta$ -adrenérgico. En respuesta al agonista, las células exhibieron una reducción en la unión del radioligando (Kallal *et al.*, 1998). Utilizando construcciones del receptor  $\beta_2$ -AR fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP)- $\beta_2$ -AR, y mediante el uso de microscopía confocal, se observó la distribución del GFP- $\beta_2$ -AR en un corte óptico hecho en el punto medio de una célula de mamífero en cultivo, la señal más fuerte de fluorescencia se localizó en la membrana plasmática de la célula. Con un tratamiento con agonista (isoproterenol), la señal se relocaliza en gran medida en el espacio perinuclear, reflejando el secuestro desde la membrana plasmática hasta otros compartimentos de la célula. Este proceso es reversible y se cree que representa la fase de recuperación de la desensibilización, una vez que el agonista ha sido eliminado del medio en el que crecen las células. La cantidad de proteínas implicadas en la transducción de señales, la desensibilización, la resensibilización y el secuestro de los ARs deja la interrogante de cómo los ARs, y los GPCRs en general, se organizan en la bicapa lipídica, sin embargo, sí se sabe que las interacciones entre las cinasas, las fosfatasa, algunas proteínas accesorias tales como  $\beta$ -arrestina y Grb2 y las moléculas involucradas en el tráfico del  $\beta_2$ -AR mediado por la insulina (desensibilización heteróloga) ó por los agonistas de los  $\beta$ -AR (desensibilización homóloga) ocurren en distintas regiones del citoesqueleto (Shumay *et al.*, 2004), siendo la  $\beta$ -arrestina una de las moléculas más importantes en el proceso de secuestro del receptor, pues además de reclutar a las clatrin a la membrana plasmática, también tiene funciones de proteína adaptadora, reclutando y acercando espacialmente a otras proteínas importantes en el mantenimiento y direccionamiento del receptor secuestrado.

Cuando la  $\beta$ -arrestina recluta clatrin a la membrana plasmática, forma un sitio de acoplamiento para  $\beta_2$ -AR con esta importante proteína del citoesqueleto. También se ha identificado una proteína adaptadora llamada gravina en la vía de señalización de algunos GPCRs. La gravina es un miembro de la familia de las proteínas de anclaje a PKA, denominadas AKAPs, que proporcionan un dominio adaptador para la interacción de complejos súper moleculares. Se ha demostrado que las proteínas adaptadoras organizan la red de vías de señalización de las MAPK en levaduras y células de mamífero, señalización que sólo es posible cuando el receptor ha sido

internalizado. Recientemente se ha observado que la gravina se une al  $\beta_2$ -AR, a PKA y algunas fosfatasas importantes, y que la supresión de la gravina afecta negativamente algunas características de la señalización del GPCR. Los sitios para la interacción dinámica entre el  $\beta_2$ -AR y la gravina han sido mapeados en ambas moléculas y se encontró que son dependientes de fosforilación por PKA en ambos casos, es decir, la PKA fosforila al receptor y a la proteína adaptadora, posibilitando así su unión a la proteína adaptadora (Tao et al., 2003). La unión de PKA con la gravina es evidencia de un asa de regulación negativa de la PKA, que al ser activa durante un periodo prolongado es capaz de fosforilar a la gravina, creando sus propios sitios de unión a la proteína inactivadora.



### 3. Marco teórico

Los mecanismos de regulación negativa mencionados arriba han sido estudiados y descritos principalmente en los  $\alpha_2$  y  $\beta$  ARs; sin embargo, hasta el momento se conoce muy poco acerca de los mecanismos de regulación negativa empleados por los  $\alpha_1$  ARs. Tampoco se conoce el papel que juegan las cinasas y fosfatasa en dicho proceso, ni las estructuras del receptor implicadas en dicho proceso.

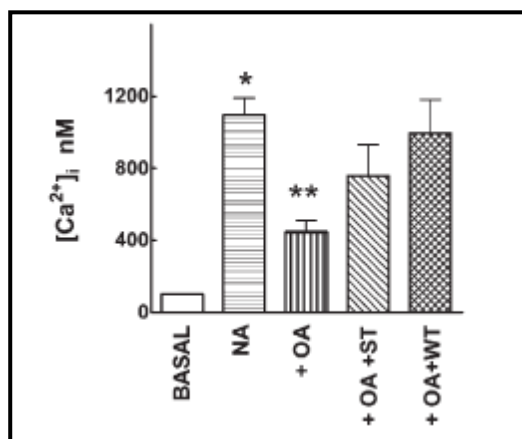
Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación muestran que el  $\alpha_{1A}$  AR de bovino no se desensibiliza cuando las células que lo expresan son preincubadas con el activador directo de la PKC, forbol miristrato acetato (PMA), sugiriendo que la fosforilación por la PKC no está implicada en la regulación del receptor. Sin embargo, como demostraron Vázquez-Prado *et al.*, en el año 2000, la estimulación del  $\alpha_{1A}$  AR de bovino por NA o bien la activación directa de la PKC por PMA, inducen un aumento considerable en la fosforilación global del receptor.

Comparando la magnitud de la fosforilación y la desensibilización del  $\alpha_{1A}$  AR de bovino y del  $\alpha_{1B}$  AR de hámster, se encontró que ambos eventos en el subtipo  $\alpha_{1A}$  AR de bovino son mucho menores en intensidad que aquellos observados en el subtipo  $\alpha_{1B}$  AR de hámster (Vázquez Prado *et al.*, 1997; Casas-González *et al.*, 2003).

Por otra parte, se realizó una investigación para saber el papel que tienen las fosfatasa en la regulación negativa del  $\alpha_{1A}$  AR de bovino. El pre-tratamiento con ácido okadaico (un inhibidor de fosfatasa de serina/treonina) en células Rat-1 que expresan al  $\alpha_{1A}$ -AR de bovino, produce un incremento en la fosforilación basal del receptor, induciendo su desensibilización. Cuando las células fueron pre-tratadas con staurosporina (un inhibidor de cinasas en serina/treonina) ó wortmanina (un inhibidor de la PI3K) se tornaron resistentes a la desensibilización mediada por el ácido okadaico. La wortmanina tuvo un efecto mayor sobre el restablecimiento de la resistencia a la desensibilización, lo cual sugiere la participación de Akt/PKB en la fosforilación y desensibilización del receptor (Figura 9) (Alcántara-Hernández *et al.*, 2005).

En 2002, Price *et al.*, encontraron que el  $\alpha_{1A}$  AR silvestre de humano transfectado en células Rat-1 es desensibilizado cuando las células se pre-tratan con PMA. Cuando usaron un receptor truncado en el aminoácido 348 no observaron cambios significativos en su desensibilización. Estos resultados sugieren una diferencia importante en la regulación negativa de los  $\alpha_{1A}$  ARs humano y bovino; y a que el receptor de bovino muestra resistencia a la desensibilización por PMA, mientras que el receptor humano es capaz de desensibilizarse bajo un pre-estímulo con PMA,

dando mayor relevancia a la tercera asa intracelular como una estructura reguladora del receptor.



**Figura 9. Consecuencias funcionales de los efectos del ácido okadaico sobre el  $\alpha_{1A}$  AR.**

En el histograma se puede observar la liberación basal de  $Ca^{2+}$  (BASAL) y cuando las células son estimuladas con noradrenalina 10  $\mu$ M (NA). Las células pre-incubadas solo con ácido okadaico 1  $\mu$ M (+OA), con staurosporina 100 nM (+OA+ST) ó con wortmannina 100 nM (+OA+WT).

En 2002, Price *et al*, encontraron que el  $\alpha_{1A}$  AR silvestre de humano transfectado en células Rat-1 es desensibilizado cuando las células se pre-tratan con PMA. Cuando usaron un receptor truncado en el aminoácido 348 no observaron cambios significativos en su desensibilización. Estos resultados sugieren una diferencia importante en la regulación negativa de los  $\alpha_{1A}$  ARs humano y bovino; y a que el receptor de bovino muestra resistencia a la desensibilización por PMA, mientras que el receptor humano es capaz de desensibilizarse bajo un pre-estímulo con PMA, dando mayor relevancia a la tercera asa intracelular como una estructura reguladora del receptor.

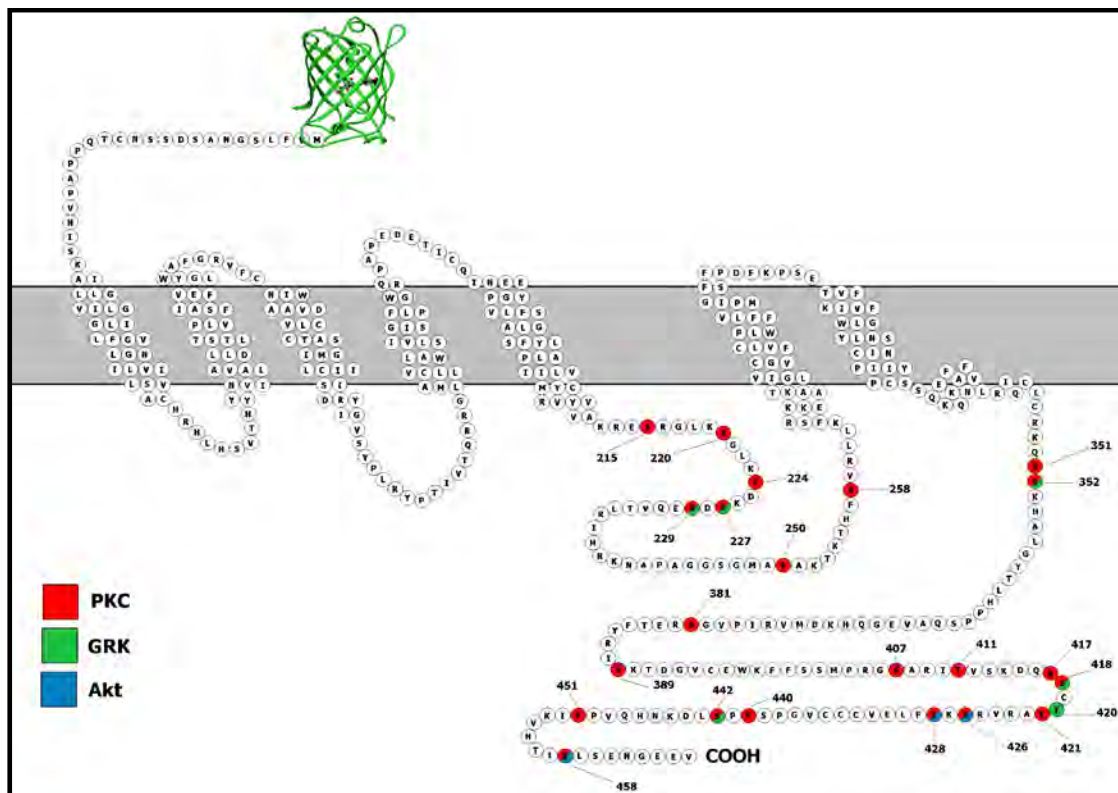
En el trabajo de doctorado aún no publicado de Alejandro Cabrera Wrooman, en colaboración con María Teresa Romero Avilés y Jesús Adolfo García Sáinz, encontraron que el  $\alpha_{1A}$  AR de bovino (que en estado silvestre es resistente a la desensibilización por PMA), truncado en aminoácido 348 (eliminando toda la cola carboxílica), es capaz de desensibilizarse cuando las células son pre-incubadas con PMA. Este resultado es difícil de explicar, pues en la mayoría de los GPCRs el extremo carboxílico contribuye a la regulación negativa de sus acciones biológicas. Una posible explicación es que el  $\alpha_{1A}$  AR silvestre de bovino es resistente a los efectos de PMA debido a que su extremo carboxílico le confiere una especie de protección estérica, que impide el paso de las cinasas hasta la tercera asa intracelular.

#### 4. Justificación

El  $\alpha_{1A}$  AR está presente en una gran cantidad de tejidos: cerebro, corazón, vasculatura, hígado, riñones, próstata y vejiga; son mediadores importantes de la contracción del músculo liso y tienen una acción muy importante sobre la regulación de la función neurológica y cardiovascular. La regulación de su actividad es clave en la adaptación del organismo a los cambios en el ambiente interno y en el mantenimiento de la homeostasis en general. Las alteraciones en la regulación o la señalización del  $\alpha_{1A}$  AR pueden conducir al desarrollo de procesos patológicos.

Mediante la identificación de los mecanismos moleculares que se encargan del proceso regulatorio del  $\alpha_{1A}$  AR, es posible comprender mejor el proceso patológico desarrollado en un sistema desregulado, además de ser un paso crucial en la identificación de posibles blancos terapéuticos.

Un análisis *in silico* de la secuencia del  $\alpha_{1A}$  AR humano reveló la presencia de sitios consenso para la fosforilación por PKC, GRK y PKB en la tercera asa intracelular (3AI) y en el extremo carboxílico, lo cual sugiere una participación importante de dichas cinasas en la regulación de la actividad del receptor (Figura 10) (García-Sáinz *et al.*, 2004; Alcántara-Hernández *et al.*, 2008).



**Figura 10. Representación esquemática del  $\alpha_{1A}$  AR WT.** Cada aminoácido está representado por una letra encerrada en un círculo, los sitios consenso de fosforilación por PKC están marcados en rojo, por PKB en azul y por GRK en verde y marcados con números correspondientes a la posición del aminoácido. El receptor está unido a la proteína verde fluorescente en su extremo amino.

## 5. Hipótesis

En trabajos previos se ha observado que el  $\alpha_{1A}$  AR humano, a diferencia de su ortólogo de bovino, es capaz de desensibilizarse cuando las células que lo expresan son pre-tratadas con PMA. Se sugiere que los sitios consenso para fosforilación por PKC presentes en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxílico del receptor tienen una participación muy importante dicho proceso.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

- Determinar si la tercera asa intracelular ó el extremo carboxílico del  $\alpha_{1A}$  AR son esenciales para el proceso de desensibilización inducido por PMA

### 6.2. Objetivos específicos

- Generar líneas celulares transfectadas establemente con el  $\alpha_{1A}$  AR humano silvestre insertado en el vector pEGFP N1.
- Subclonar al gen del  $\alpha_{1A}$  AR humano desde el vector pEGFP N1 hacia el vector pCEFLP.
- Obtener al  $\alpha_{1A}$  AR mutante en la tercera asa citoplasmática, para eliminar todos los sitios consenso de fosforilación para PKC y GRK.
- Obtener al  $\alpha_{1A}$  AR truncado en el extremo carboxílico y mutado en la tercera asa, para eliminar completamente los sitios de fosforilación del receptor.
- Generar líneas celulares HEK-293 transfectadas establemente con el receptor  $\alpha_{1A}$  AR humano silvestre, mutante y truncado.
- Medir la  $[Ca^{2+}]_i$  en células HEK-293 y Rat-1 transfectadas establemente con las construcciones del receptor  $\alpha_{1A}$  AR humano y bovino, mediante la técnica de espectrofluorescencia con FURA 2, para observar la desensibilización de la respuesta a noradrenalina después del pre-tratamiento con PMA.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Cultivo celular**

Se usaron células de riñón de embrión humano HEK-293, que no expresan endógenamente al  $\alpha_{1A}$  AR y que expresan cantidades muy pequeñas (7-20 fmol/mg de proteína) de  $\beta$  ARs, lo que las hace un buen modelo para la transfección del  $\alpha_{1A}$  AR; y fibroblastos de rata Rat-1, que no expresan endógenamente ningún AR. Las células transfectadas con el receptor  $\alpha_{1A}$  AR silvestre, mutante ó mutante truncado, fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo DMEM con glutamina y alta concentración de glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 µg/mL de estreptomycin, 100 µg/mL de penicilina y 0.25 µg/mL de anfotericina B.

### **7.2. Transfección de células HEK-293**

Se usaron células HEK-293 con una confluencia de entre 60-80%, para una caja petri de 10 cm de diámetro se prepararon las soluciones A y B:

- Solución A: 60 µL de Optimem + 15 µL de lipofectamina, dejar incubando 5 minutos a temperatura ambiente.
- Solución B: 70 µL de Optimem + 3µg de DNA plasmídico.

Se mezclan perfectamente ambas soluciones, se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 20 minutos, se lavan las células y se cambia el medio por 2 mL de Optimem, y se agrega la mezcla A+B (150 µL). Las células se dejan incubando a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas, después de las cuales se cambió nuevamente el medio de cultivo a DMEM completo, incubándolas durante 18 horas.

### **7.3. Selección de las líneas celulares estables**

Para seleccionar clonas estables, la transfección se hace en cajas de 6 pozos, con 1/3 de las mezclas preparadas para una caja de 10 cm de diámetro por pozo. La selección se lleva a cabo mediante la adición de medio DMEM completo + 300 ó 600 ng/mL del antibiótico G418 (geneticina), la concentración de 600 ng/mL se usó para hacer más estricta la selección de las clonas transfectadas. Las células no transfectadas no sobreviven en presencia del antibiótico G418, únicamente las que incorporaron el DNA plasmídico (que contiene la resistencia al G418) a su genoma serán viables. Para obtener una clona estable genéticamente homogénea se hace

una dilución limitante, que consiste en calcular el volumen en el que habrá únicamente una célula. Posteriormente se coloca dicho volumen en cada uno de los 12 pozos de una caja de cultivo celular, siguiendo la selección el tiempo que sea necesario, hasta tener a las células confluentes. Para asegurar que el receptor se está expresando, las células se deben observar en el microscopio confocal, a fin de visualizar a la proteína verde fluorescente que se expresa en el extremo carboxílico del receptor.

#### **7.4. Transformación de bacterias**

Se agregan 5  $\mu\text{L}$  de DNA a incorporar en 50  $\mu\text{L}$  de bacterias DH5 $\alpha$  competentes, se incuban durante 30 minutos en hielo, posteriormente se realiza un "shock" térmico durante 90 segundos a 42 $^{\circ}$  C. Las bacterias se incuban durante 2 minutos en hielo, después de los cuales se agrega 1 mL de caldo LB sin antibióticos. Las bacterias se incuban a 37 $^{\circ}$  C/250 rpm durante 1 hora. Terminada la incubación, se centrifugan a 14000 rpm durante 1 minuto, se decanta el sobrenadante dejando 50  $\mu\text{L}$  de LB para resuspender; finalmente se distribuyen en agar LB (bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, agar 2%, pH 7.5) + 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina ó 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina (dependiendo de la resistencia que confiera el vector en el que esté insertado el gen de interés) y se incuban a 37 $^{\circ}$ C toda la noche.

#### **7.5. Extracción de DNA plasmídico**

Se elige una de las colonias bacterianas que se desarrollaron en la placa de agar LB, con un palillo estéril o bien con asa bacteriológica se toma el inóculo por picadura, que será transferido a la cantidad deseada de caldo LB líquido (bacto triptona 1 %, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1 %, pH 7.5) con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina ó 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina a 37 $^{\circ}$ C durante toda la noche. El DNA plasmídico se extrae con el kit de QIAprep de QIAGEN<sup>®</sup>, obteniendo la pastilla bacteriana del cultivo de toda la noche por centrifugación a 14000 rpm durante 2 minutos, y resuspendiéndola completamente en 250  $\mu\text{L}$  de buffer P1 (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM y RNasa-A 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El cultivo bacteriano se lisa con 250  $\mu\text{L}$  de buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) durante no más de 5 minutos, agitando por inversión de 4 a 6 veces. Se neutraliza el pH del lisado con la adición de 350  $\mu\text{L}$  de buffer N3 (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub> 3 M, CH<sub>3</sub>COOH 5 M, pH 5.5) por inversión, no se debe agitar bruscamente al lisado, ya que contiene el DNA genómico, que se fragmenta por acción mecánica e interfiere en la obtención del

DNA plasmídico. El lisado se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos, para obtener una pastilla de detritos celulares y DNA genómico. El sobrenadante producto de la centrifugación se transfiere con una micropipeta de 1000  $\mu$ L a las columnas de afinidad a DNA del kit, las cuales son centrifugadas a 14000 rpm durante 1 minuto para eliminar al sobrenadante. Las columnas se lavan con 700  $\mu$ l de buffer PE (Tris HCl 2mM pH 8, EDTA 0.2 mM y etanol al 80%) y se centrifugan a 14000 rpm dos veces, con el fin de eliminar el exceso de etanol. El DNA plasmídico se eluye con 75  $\mu$ L de buffer EB (Tris HCl 10 mM pH 8.5), dejando 1 minuto en reposo y después centrifugando la columna a 14000 en un tubo eppendorf nuevo. El DNA se almacena a -20°C.

### **7.6. Mutagénesis sitio dirigida**

La mutagénesis sitio dirigida se hace mediante el diseño de oligonucleótidos en sentido y antisentido, que incluyen la mutación de interés. Los oligonucleótidos son complementarios al DNA molde, excepto en la región que va a ser mutada. La reacción de PCR se realizó con el kit Quickchange de Stratagene®. Las proporciones de reactivos para la reacción de PCR son las siguientes:

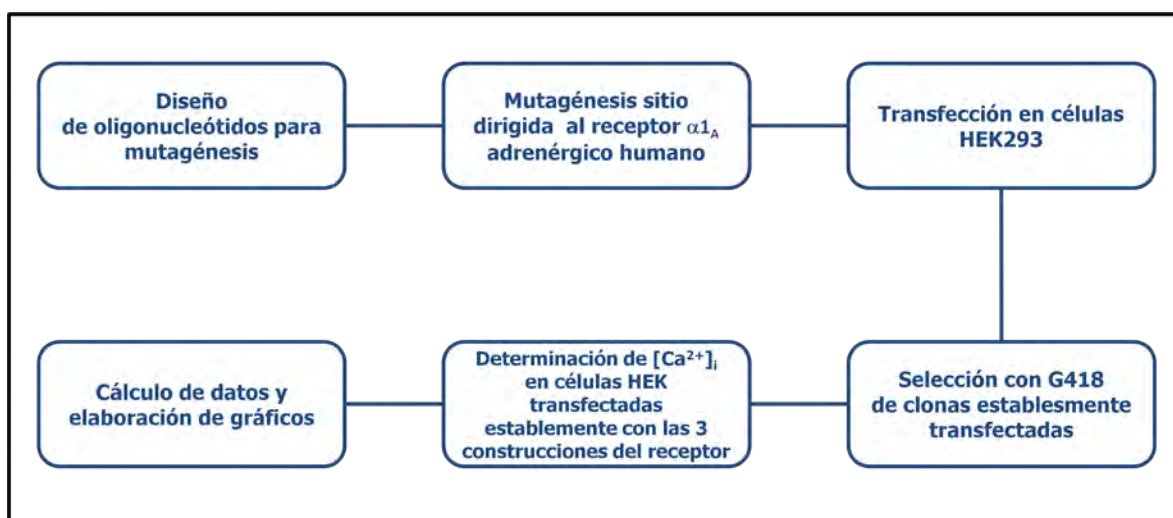
5 $\mu$ L de buffer para PCR 10X  
125 ng del oligonucleótido reverso  
125 ng del oligonucleótido en sentido  
100 ng de DNA molde  
1  $\mu$ L de la mezcla de dNTP  
H<sub>2</sub>O inyectable hasta completar 50  $\mu$ L  
1  $\mu$ l de DNA polimerasa

La PCR se llevó a cabo en un termociclador, con un programa que utilice la TM calculada de los oligonucleótidos y 18 ciclos de amplificación. El producto de la PCR se utiliza para transformar bacterias X L-blue, con el fin de amplificar el DNA plasmídico. Los plásmidos purificados se secuenciaron, para asegurar la obtención de las mutantes deseadas.

### **7.7. Determinación de la concentración de calcio intracelular**

Las células HEK transfectadas con las diferentes construcciones del  $\alpha_{1A}$  AR humano y bovino fueron incubadas con 4 mL de buffer Krebs-Hepes-glucosa (KRH) (NaCl 130 mM, K Cl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, Hepes 20 mM, 1.2 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mM, glucosa 10 mM, BSA 0.1% (w/v), pH 7.4 + 2.5  $\mu$ M de Fura-2/AM) durante una hora a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación,

las células son despegadas mecánicamente (o si es necesario, se usa tripsina) de la caja de cultivo, mediante resuspensión con KRH, y transferidas a un tubo de ensaye cónico de 15 mL. Las células son lavadas 3 veces con 12 mL de KRH, centrifugadas y resuspendidas en 6 mL de KRH. La medición de  $[Ca^{2+}]_i$  se realiza a 37°C y en agitación en un espectrofluorómetro A MINCO-Bowman Serie-2, adicionando las hormonas y demás reactivos durante la medición. Los registros se hacen a 340 nm de excitación y 510 nm de emisión. La  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó usando el software de AMINCO-Bowman que incluye el aparato.



**Figura 11. Diagrama de flujo general de la metodología usada para llevar a cabo la presente investigación.**



## 8. Resultados

### 8.1. Mutagénesis

Con la finalidad de establecer los sitios a mutar en el  $\alpha_{1A}$  AR de humano, se realizó un análisis *in silico* mediante el uso de los programas Netphos 2.0 del NIH, GPS de Cuckoo Workgroup (Yu *et al.*, 2008) y Scansite del MIT, los cuales revelaron que existen al menos 7 sitios con alta probabilidad de ser fosforilados por PKC en la tercera asa intracelular (S215, S220, T224, S227, S229, S250, S258) (Tabla 2), dos de los cuales también tienen una alta probabilidad de ser fosforilados por GRK (S227 y S229).

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	215	AKRE <u>S</u> RGLK	0.763	*S*
Sequence	220	RGLK <u>S</u> GLKT	0.899	*S*
Sequence	224	SGLK <u>T</u> DKSD	0.529	*T*
Sequence	227	KTDK <u>S</u> DSEQ	0.994	*S*
Sequence	229	DKSD <u>S</u> EQVT	0.980	*S*
Sequence	250	SGMA <u>S</u> AKTK	0.588	*S*
Sequence	258	KTHF <u>S</u> VRLI	0.892	*S*

**Tabla 2. Predicciones para fosforilaciones en serinas y treoninas de la tercera asa del receptor  $\alpha_{1A}$ -AR WT humano.**

En el extremo carboxílico encontramos 16 sitios consenso para fosforilación por PKC, 3 de los cuales (S426, S428 y S458) también son sitios consenso para la fosforilación por AKT, 3 para también para GRK (S352, S418 y S442), además de un sitio para fosforilación exclusiva por GRK (T420) (Tabla 3).

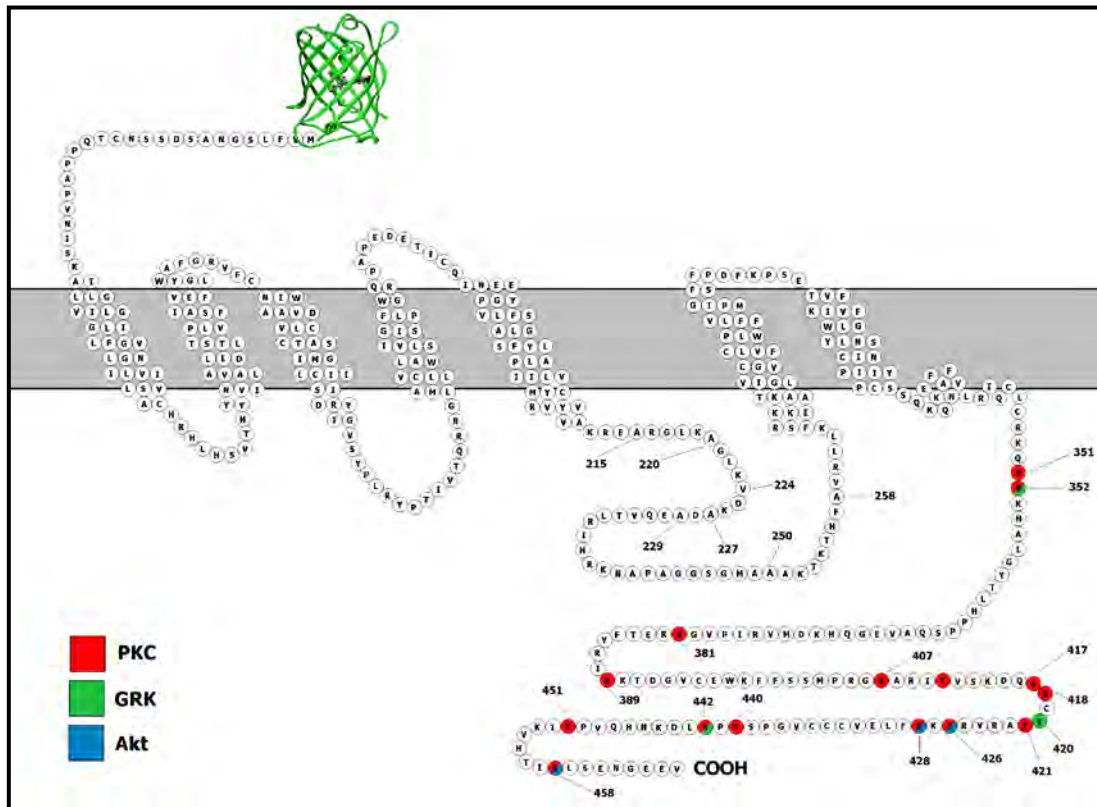
Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	351	CRKQ <u>S</u> SKHA	0.953	*S*
Sequence	352	RKQS <u>S</u> KHAL	0.495	*S*
Sequence	381	IPVG <u>S</u> RETF	0.684	*S*
Sequence	389	FYRI <u>S</u> KTDG	0.995	*S*
Sequence	407	MPRG <u>S</u> ARIT	0.986	*S*
Sequence	411	SARI <u>T</u> VSKD	0.820	*T*
Sequence	417	SKDQ <u>S</u> SCTT	0.551	*S*
Sequence	418	KDQS <u>S</u> CTTA	0.890	*S*
Sequence	420	QSSC <u>T</u> TARV	0.506	*S*
Sequence	421	SSC <u>T</u> TARVR	0.871	*T*
Sequence	426	ARVR <u>S</u> KSFL	0.968	*S*
Sequence	428	VRSK <u>S</u> FLQV	0.869	*S*
Sequence	440	VGPS <u>T</u> PSLD	0.783	*T*
Sequence	442	PSTP <u>S</u> LDKN	0.769	*S*
Sequence	451	HQVP <u>T</u> IKVH	0.610	*T*
Sequence	458	VHTI <u>S</u> ISEN	0.944	*S*

**Tabla 3 . Predicciones para fosforilaciones en serinas y treoninas del extremo carboxílico del receptor  $\alpha_{1A}$ -AR WT humano.**

La subclonación y mutación al gen del  $\alpha_{1A}$  AR humano fueron realizadas por la empresa Mutagenex Inc, siguiendo el diseño de las mutantes hecho en el laboratorio. La empresa envió el archivo electrónico de la secuenciación completa de cada construcción, plásmidos purificados (40 $\mu$ L c/u) y bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con las siguientes construcciones:

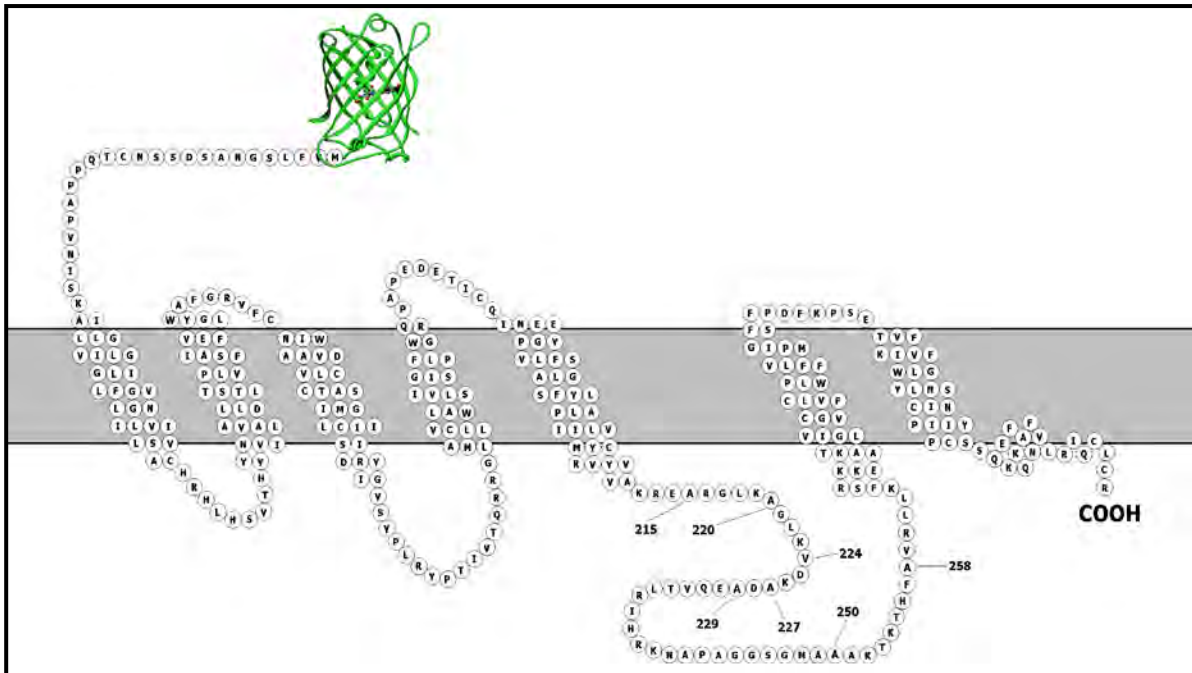
1. El  $\alpha_{1A}$  AR humano silvestre ( $\alpha_{1A}$  WT) (Figura 10), subclonado del vector pEGFP N1 al vector pCEFLP-3X-Flag-EGFP, entre los sitios de restricción BamHI y EcoRI. La finalidad de la subclonación fue cambiar la posición de la proteína verde fluorescente (GFP), del extremo carboxílico (intracelular), al extremo amino (extracelular), dado que una de las construcciones ( $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C) tiene truncado el extremo carboxílico.

2. El  $\alpha_{1A}$  AR humano mutado en los 7 sitios consenso para fosforilación por PKC y GRK presentes en la tercera asa intracelular ( $\alpha_{1A}$  3AI) (Tabla 2 y Figura 12).



**Figura 12. Representación esquemática del  $\alpha_{1A}$  AR 3AI.** Cada aminoácido está representado por una letra encerrada en un círculo, los sitios consenso de fosforilación por PKC están marcados en rojo, por PKB en azul y por GRK en verde y marcados con números correspondientes a la posición del aminoácido. Los aminoácidos en círculos blancos señalados por números indican las mutaciones hechas al receptor para eliminar los sitios consenso de fosforilación. El receptor está unido a la proteína verde fluorescente en su extremo amino.

3. El receptor  $\alpha_{1A}$  humano mutado en los sitios consenso para fosforilación por PKC y GRK de la tercera asa intracelular (Tabla 2) y truncado en el residuo 348 del extremo carboxílico ( $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C) (Figura 13).



**Figura 13. Representación esquemática del  $\alpha_{1A}$  AR 3AI $\Delta$ C.** Cada aminoácido está representado por una letra encerrada en un círculo, los números corresponden a la posición del aminoácido e indican las mutaciones hechas al receptor para eliminar los sitios consenso de fosforilación. El receptor está unido a la proteína verde fluorescente en su extremo amino.

## 8.2. Generación de las líneas celulares HEK-293 transfectadas establemente con las diferentes construcciones del $\alpha_{1A}$ AR humano.

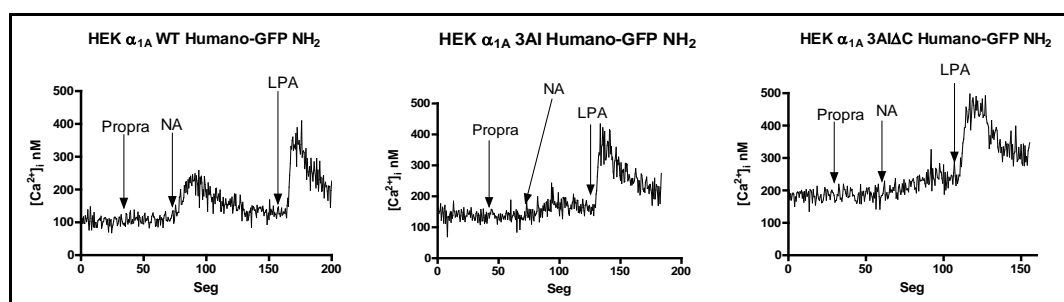
Siguiendo el protocolo descrito en el apartado de metodología de esta tesis, se generaron las líneas celulares HEK-293  $\alpha_{1A}$  WT,  $\alpha_{1A}$  3AI y  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C transfectadas establemente. Se usó una concentración de 300 ng/mL de geneticina (G418) para seleccionar a las clonas resistentes; las cuales se mantuvieron con el antibiótico de selección hasta lograr el 100% de confluencia en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro. Una vez que el cultivo ha llegado a confluencia y después del periodo indicado, las células respondieron satisfactoriamente a los estímulos con NA.

Siguiendo el mismo procedimiento se generó una nueva línea celular transfectada establemente con el vector pEGFP N1  $\alpha_{1A}$  AR WT, que inserta a la EGFP en el extremo carboxílico del receptor, la cual fue posteriormente probada en mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$ . La línea celular con la EGFP en el extremo carboxílico fue útil para hacer un comparativo en la desensibilización del receptor, con respecto a las

construcciones  $\alpha_{1A}$  AR WT,  $\alpha_{1A}$  3AI AR y  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C AR con la EGFP en el extremo amino.

### 8.3. Medición de calcio intracelular en las células HEK-293 transfectadas con los ARs $\alpha_{1A}$ WT, $\alpha_{1A}$ 3AI y $\alpha_{1A}$ 3AI $\Delta$ C de humano.

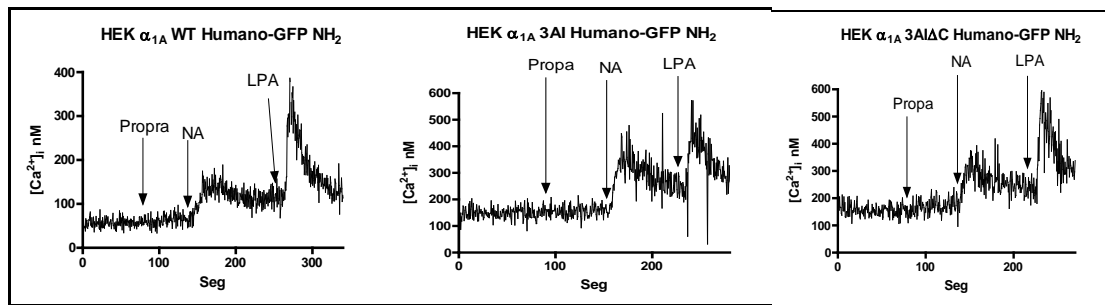
Para probar la funcionalidad de las diferentes construcciones del receptor, se realizaron mediciones de calcio intracelular en células HEK-293 transfectadas, transitoria y establemente. Antes de cada estímulo con noradrenalina (NA), las células fueron pre-incubadas con propranolol, un bloqueador  $\beta$  adrenérgico, ya que las células HEK-293 expresan pequeñas cantidades de  $\beta$  ARs. La adición de propranolol asegura que el aumento de calcio intracelular es sólo debido a la acción de los receptores  $\alpha_{1A}$  AR.



**Figura 14. Medición de la liberación de calcio intracelular mediada por NA 10  $\mu$ M en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con las tres construcciones del  $\alpha_{1A}$  AR.** Se observó un aumento de aproximadamente el 1.5 veces el basal para las células WT, mientras que para las células 3AI y 3AI $\Delta$ C el aumento fue de sólo 0.8 sobre el basal.

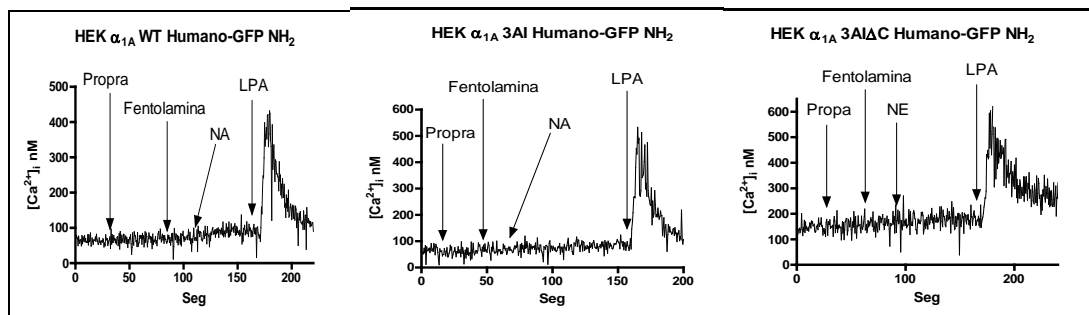
Las líneas HEK-293 transfectadas transitoriamente con las 3 construcciones del  $\alpha_{1A}$  AR muestran una respuesta no mayor 1.5 veces el basal, que es una liberación de calcio intracelular pequeña (Figura 14). Para asegurar que las células no tienen problemas con las pozas de calcio, se estimularon con ácido lisofosfatídico (LPA) 10  $\mu$ M, (un potente movilizador de calcio) que fue usado como control positivo. Las respuestas fueron de alrededor de 4 veces el basal. Dada la escasa respuesta de las líneas transitorias, decidimos desarrollar líneas transfectadas establemente, con el fin de mejorar las respuestas.

Las células transfectadas establemente tuvieron respuestas más robustas a la NA, en comparación a aquellas obtenidas con las transfecciones transitorias, llegando a 2 veces el basal en cada caso (Figura 15). Para comprobar que las respuestas de las 3 diferentes construcciones fueron mediadas por el  $\alpha_{1A}$  AR, las células se pre-incubaron con 10  $\mu$ M de fentolamina, un bloqueador  $\alpha$  adrenérgico.



**Figura 15. Medición de la liberación de calcio intracelular mediada por NA 10  $\mu\text{M}$  en células HEK-293 transfectadas establemente con las tres construcciones del  $\alpha_{1A}$  AR.** Se observó un aumento en la liberación de calcio de aproximadamente el 2 veces el basal en las 3 líneas celulares establemente transfectadas.

En las tres construcciones se observó el abatimiento total de la respuesta a NA, pero manteniéndose la respuesta a LPA, lo que indica que la fentolamina únicamente bloquea los efectos de los  $\alpha_{1A}$  AR y que no afecta a las pozas de calcio (Figura 16).

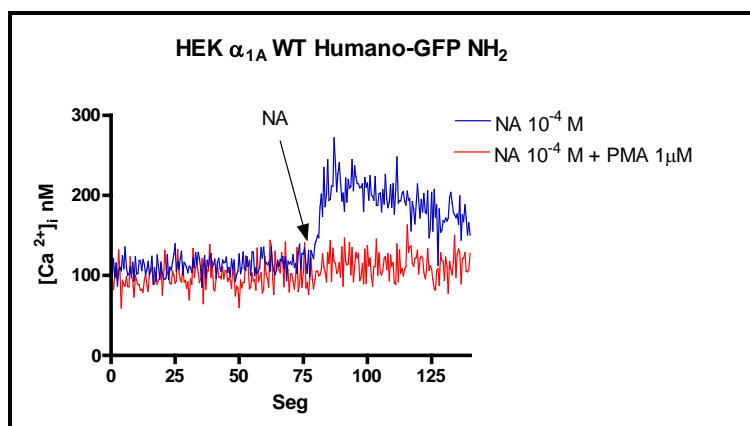


**Figura 16. Efecto de la fentolamina sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK-293 transfectadas establemente.** La fentolamina abatió completamente la liberación de calcio de las tres líneas celulares. El aumento en la liberación de calcio intracelular cuando las células son estimuladas con NA es mediado únicamente por los receptores  $\alpha_{1A}$  adrenérgicos.

#### 8.4. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular mediada por los ARs $\alpha_{1A}$ WT, $\alpha_{1A}$ 3AI y $\alpha_{1A}$ 3AIΔC de humano transfectadas en células HEK-293.

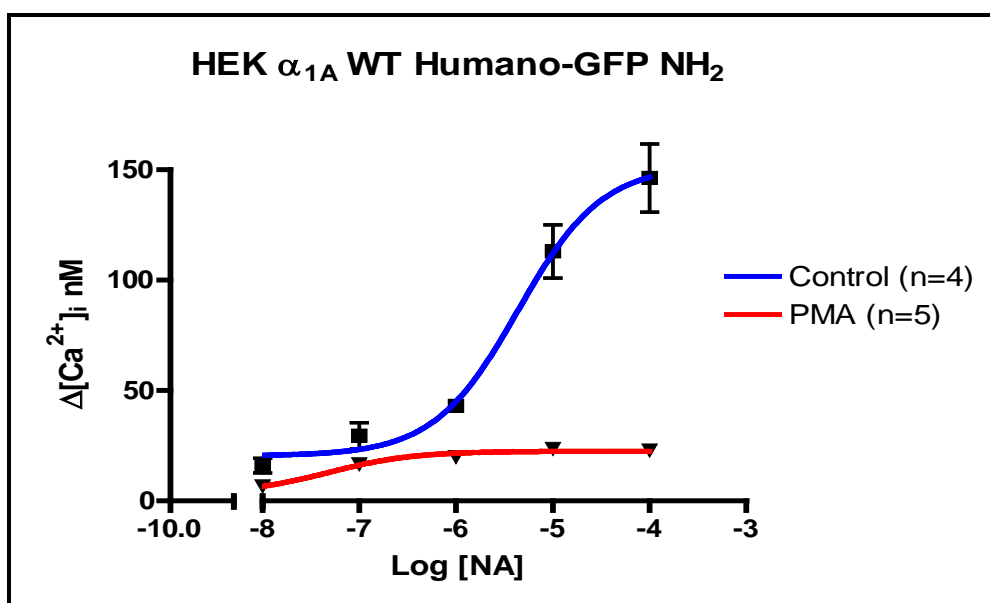
Una vez comprobado que el efecto de la NA sobre las líneas celulares HEK-293 transfectadas establemente es mediado por las construcciones del  $\alpha_{1A}$  AR, se llevaron a cabo experimentos para observar la desensibilización de cada una de las construcciones en respuesta a una pre-incubación con forbol miristrato acetato (PMA), un activador directo de isoformas clásicas y novel de la PKC. El pre-estímulo de 2 minutos con PMA desensibilizó completamente al  $\alpha_{1A}$  AR WT, indicando que una activación directa de la PKC puede mediar la fosforilación del receptor en la tercera

asa intracelular y/o en el extremo carboxílico, conduciéndolo a la atenuación transitoria de la señal (Figura 17).



**Figura 17. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT.** La respuesta máxima del trazo control es de 1.5 veces el basal, mientras que al PMA abatió completamente la liberación de calcio intracelular.

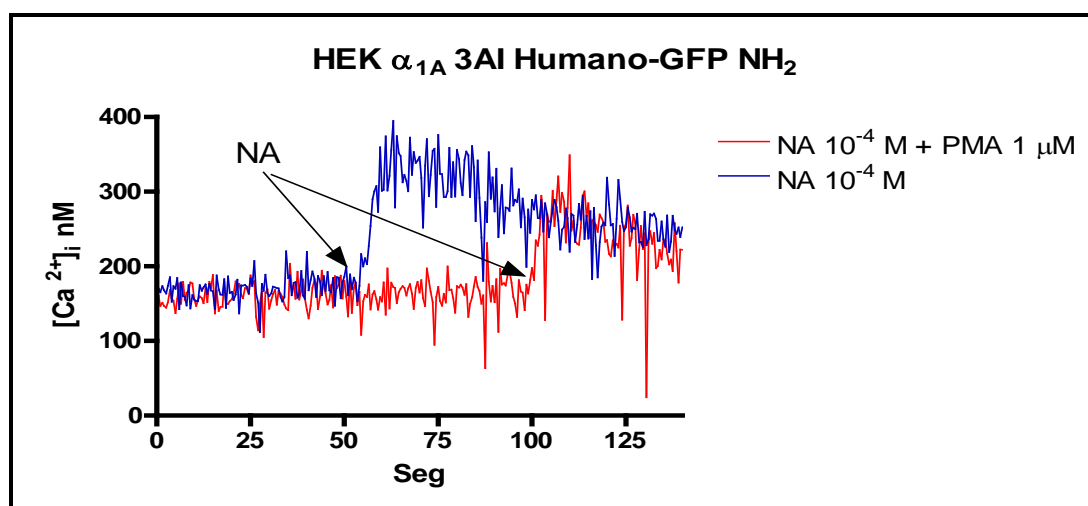
Se realizaron curvas dosis respuesta para las tres construcciones del receptor  $\alpha_{1A}$  WT, usando las líneas celulares HEK establemente transfectadas, bajo dos condiciones: estimuladas únicamente con concentraciones crecientes de NA (desde  $10^{-8}$  M hasta  $10^{-4}$  M) y con células pre-incubadas con PMA durante 2 minutos, y posteriormente estimuladas con las mismas concentraciones de NA.



**Figura 18. Curvas dosis respuesta en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT humano, con y sin PMA.** La liberación promedio de calcio intracelular en las células control llega a un máximo de 1.5 veces el basal, mientras que las células pre-incubadas con PMA alcanzan un máximo de 0.25 veces el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad, n=4 y 5. Datos  $\pm$  error estándar medio, cuando no se aprecian los errores es debido a que caen dentro del símbolo.

La respuesta del receptor  $\alpha_{1A}$  WT de humano muestra una clara caída en la liberación de calcio intracelular cuando las células son pre-incubadas con PMA, mientras que el control estimulado únicamente con NA muestra un efecto máximo de 1.5 veces el basal a una concentración de NA de 10  $\mu$ M. Todos los experimentos para obtener las curvas (control y pre-incubadas con PMA) fueron realizados paralelamente, con 4 repeticiones para la curva control y 5 repeticiones para la curva pre-incubada con PMA (Figura 18).

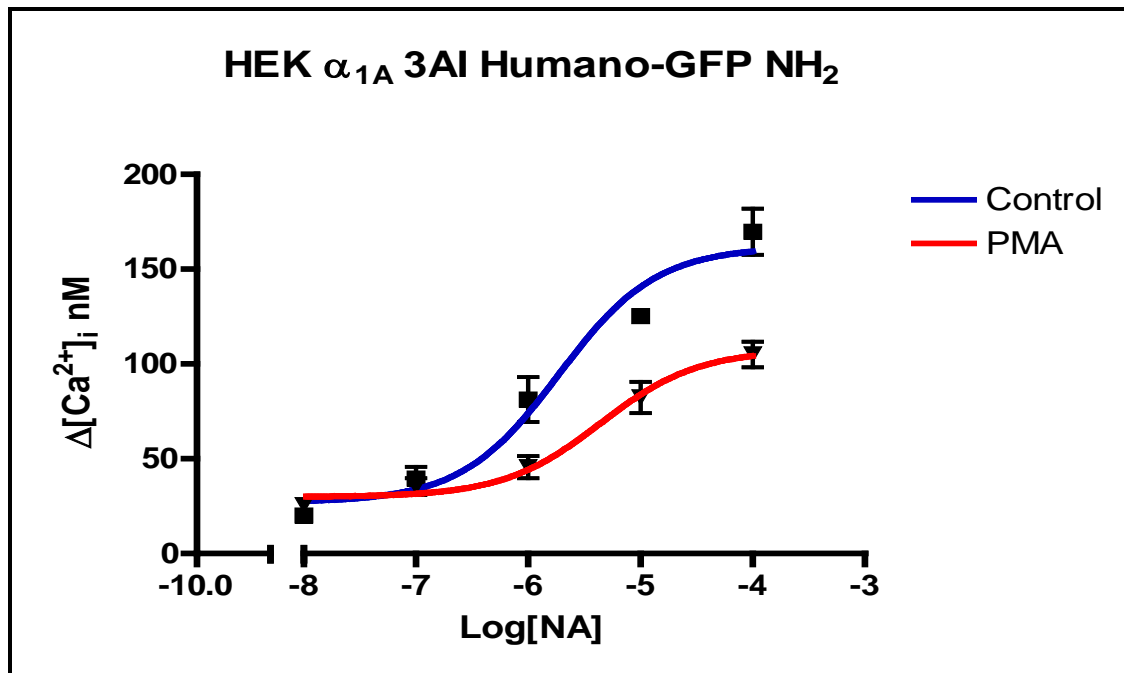
Cuando se hicieron los experimentos de desensibilización por PMA correspondientes a las células HEK  $\alpha_{1A}$  3AI, de manera sorprendente se encontró que gran parte de la caída que se observa en la línea HEK  $\alpha_{1A}$  WT cuando las células se pre-incuban con PMA, se recupera cuando el receptor no presenta sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular (Figura 19).



**Figura 19. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK  $\alpha_{1A}$  3AI.** La respuesta máxima de liberación de calcio en el trazo control es de aproximadamente 1.5 veces el basal, mientras que el PMA abatió la respuesta de liberación de calcio intracelular en alrededor de 0.5 veces el basal, con respecto al control.

La ausencia de los sitios de fosforilación por PKC y GRK en la tercera asa intracelular al parecer es suficiente para conferir al receptor  $\alpha_{1A}$  3AI cierta resistencia a la desensibilización por PMA.

En las curvas dosis respuesta para el  $\alpha_{1A}$  3AI AR con y sin pre-incubación con PMA, se observa que las células pre-incubadas con PMA son capaces de responder de forma significativa a la NA. Aunque no llegan a la respuesta máxima que alcanzan las células sin PMA (1.5 veces el basal), recuperan hasta alrededor de 1 vez el basal, mientras que las células transfectadas con el receptor silvestre no muestran respuesta significativa a la NA (Figuras 18 y 20).

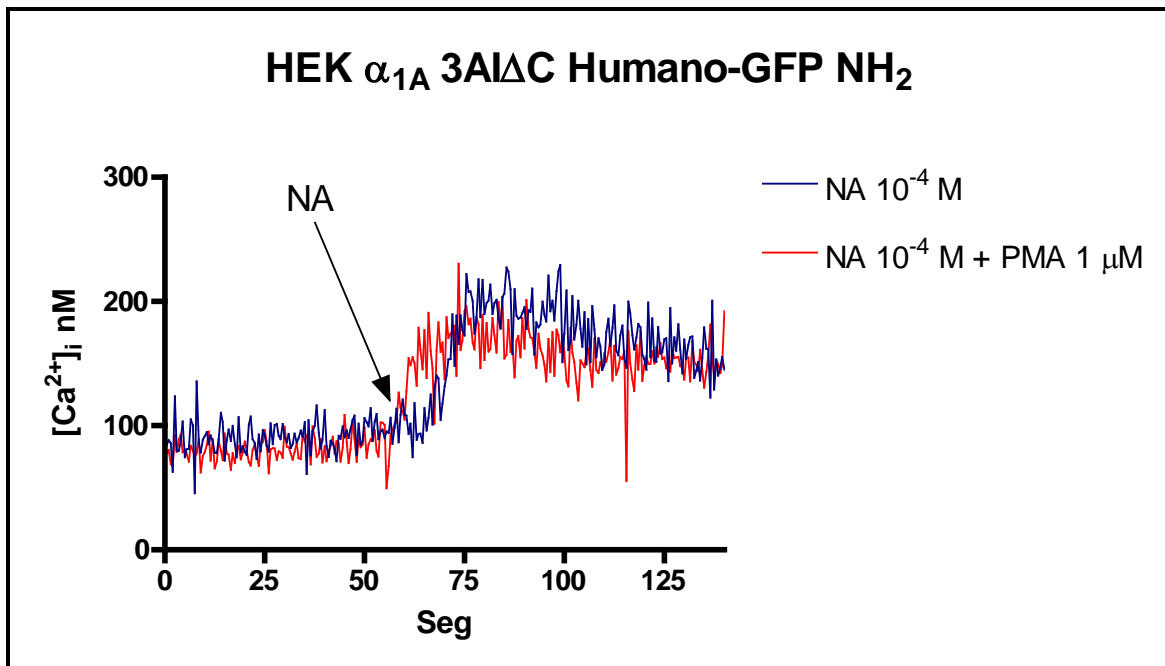


**Figura 20. Curvas dosis respuesta en células HEK  $\alpha_{1A}$  3AI humano, con y sin PMA.** La liberación promedio de calcio intracelular en las células control llega a un máximo de 1.5 veces el basal. Las células pre-incubadas con PMA alcanzan un máximo de 1 vez el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad,  $n=4$  y  $5$ . Datos  $\pm$  error estándar medio, cuando no se aprecian los errores es debido a que caen dentro del símbolo.

Analizando los resultados obtenidos con el receptor mutante  $\alpha_{1A}$  3AI, en donde se observa que los sitios de fosforilación por PKC y GRK ubicados en la tercera asa intracelular participan de forma parcial en la desensibilización del receptor, es de suponer que la otra región importante para llevar al receptor a una desensibilización dependiente de fosforilación es el extremo carboxílico. Usando la construcción  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C, que no presenta ningún sitio de fosforilación ni en la tercera asa intracelular ni en el extremo carboxílico, esperábamos encontrar una resistencia total a la desensibilización por PMA. Como se muestra en la Figura 21, cuando las células transfectadas con el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C son pre-incubadas con PMA, la respuesta es similar a la obtenida en células con el mismo receptor pero sin pre-incubación con PMA.

En la curva dosis respuesta para el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C se observa con detalle que si bien la resistencia a los efectos de PMA no es total, se acerca significativamente a los niveles de respuesta del control, de 150% sobre el basal (Figura 22).

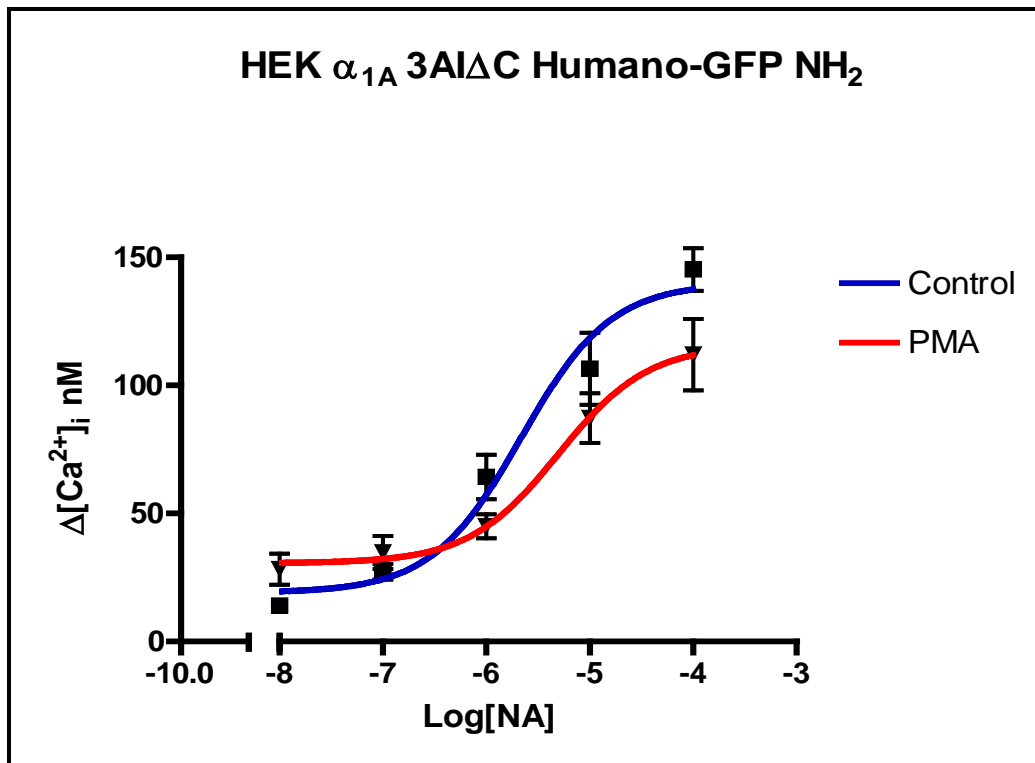




**Figura 21. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C.** La respuesta máxima del trazo control es cercana a los 1.5 veces el basal. Las células preincubadas con PMA muestran una disminución apenas perceptible de la señal de calcio intracelular, de alrededor de un 10%.

Esto nos hace suponer que ambas estructuras del receptor (la tercera asa intracelular y el extremo carboxílico) participan parcialmente en el proceso de desensibilización del receptor  $\alpha_{1A}$  WT dependiente de fosforilación, con una participación mayoritaria de la tercera asa intracelular, que, de acuerdo a nuestras observaciones, por sí sola es responsable de 2/3 partes de la desensibilización del receptor (Figuras 18 y 20). Por supuesto, el extremo carboxílico tiene una participación de aproximadamente 1/3 en la desensibilización del receptor silvestre (Figuras 18, 20 y 22).

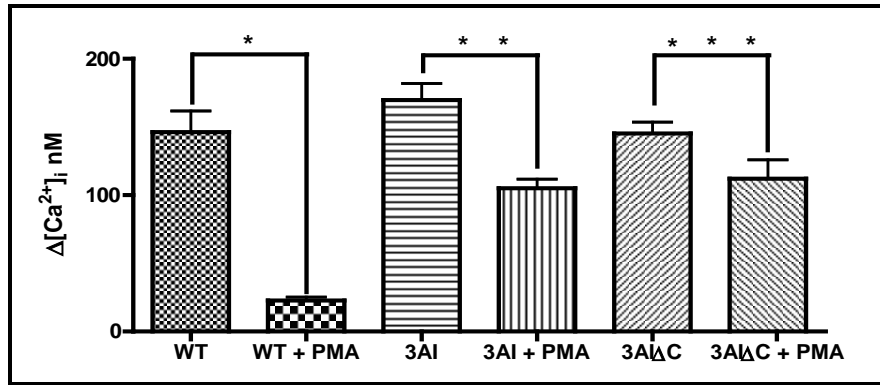
En el histograma de la figura 23 se muestran las diferencias en la desensibilización de las 3 diferentes construcciones del receptor. Se observa claramente que cuando el receptor pierde los sitios de fosforilación por PKC en las líneas  $\alpha_{1A}$  3AI y  $\alpha_{1A}$ 3AI $\Delta$ C se vuelve resistente a los efectos del PMA. Todas las columnas son significativamente diferentes a la columna del receptor  $\alpha_{1A}$  WT. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism GraphPad 4.0, usando el análisis de Bonferroni para una sola variable, con un 95% de confiabilidad.



**Figura 22. Curvas dosis respuesta en células HEK  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C humano, con y sin PMA.** La liberación promedio de calcio intracelular en las células control llega a un máximo de 1.5 veces el basal. Las células pre-incubadas con PMA alcanzan un máximo de 1.3 veces el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad, n=4. Datos  $\pm$  error estándar medio, cuando no se aprecian los errores es debido a que caen dentro del símbolo.

### 8.5. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR-GFP COOH humano transfectado en células HEK-293.

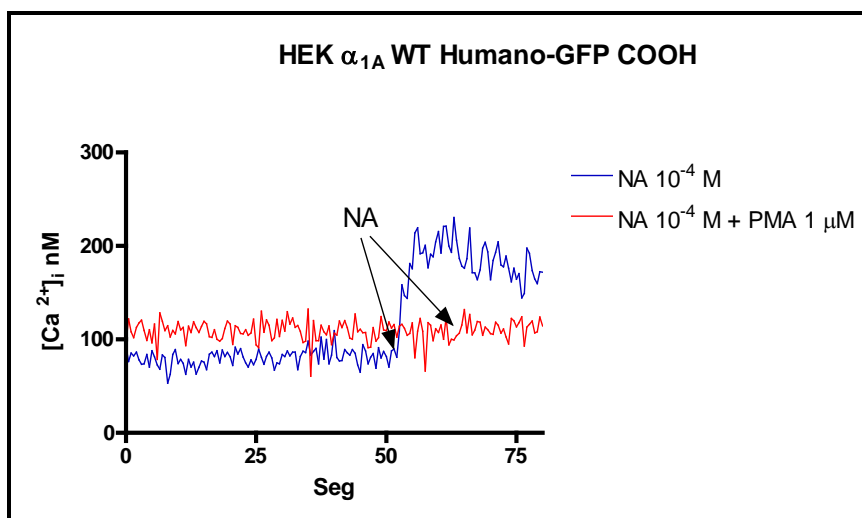
Dado que las respuestas de las tres diferentes construcciones son pequeñas, decidimos realizar experimentos paralelos con otras construcciones: el receptor  $\alpha_{1A}$  WT humano con la EGFP en el extremo carboxilo transfectado establemente en células HEK-293 y Rat-1 (generadas por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz), así como el  $\alpha_{1A}$  WT de bovino sin EGFP transfectado en células HEK-293 (línea celular generada por Alejandro Cabrerá Wrooman). El fin de estos experimentos fue encontrar posibles diferencias en intensidad y sensibilidad de las respuestas de las 3 construcciones hechas con la EGFP situada en el extremo amino y receptores con la EGFP en el extremo carboxílico, así como entre las respuestas obtenidas utilizando células HEK-293 y células Rat-1, para verificar si el contexto celular es importante para la desensibilización de la señal de calcio.



**Figura 23. Histograma comparativo de las respuestas con y sin PMA de las tres construcciones del receptor  $\alpha_{1A}$  humano-GFP-NH<sub>2</sub>.** \* Significativamente diferente  $P < 0.001$ ; \*\* Significativamente diferente  $P < 0.01$ ; \*\*\* Estadísticamente no diferente. El análisis estadístico se realizó con el programan Prism GraphPad 4.0, en ANOVA de una sola variable.

Las células HEK-293 transfectadas establemente con el receptor  $\alpha_{1A}$  WT con la EGFP en el extremo carboxílico muestran una respuesta similar a las células con el receptor  $\alpha_{1A}$  WT con la EGFP en el extremo amino, teniendo un máximo de liberación de calcio intracelular de aproximadamente 1.1 veces el basal, mientras que con la pre-incubación con PMA se observa la desensibilización casi total de la respuesta (Figura 24).

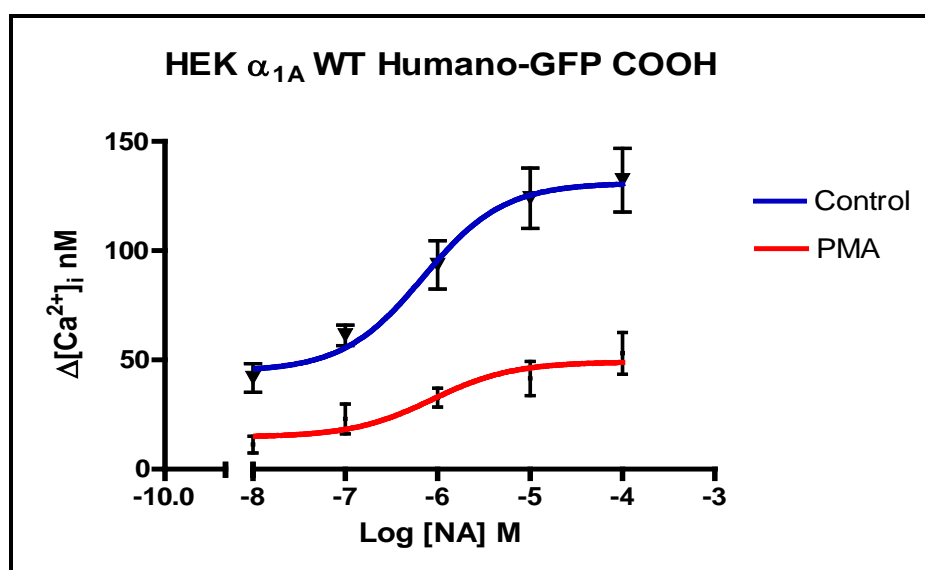
La curva dosis respuesta de la línea HEK  $\alpha_{1A}$  WT-GFP COOH muestra una respuesta ligeramente menor a la que se obtiene con la línea HEK  $\alpha_{1A}$  WT-GFP NH<sub>2</sub>. Sin embargo, la desensibilización mediada por PMA es clara en ambos casos (Figuras 18 y 25). El experimento sugiere que la EGFP al parecer no está interfiriendo en ninguna de las dos posiciones con la respuesta y la desensibilización del receptor.



**Figura 24. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT-GFP COOH.** La respuesta máxima del trazo control es de cerca de 1.5 veces basal. Las células pre-incubadas con PMA muestran un abatimiento total de la señal de calcio.

## 8.6. Efecto del PMA en la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR WT de humano transfectado en células Rat-1.

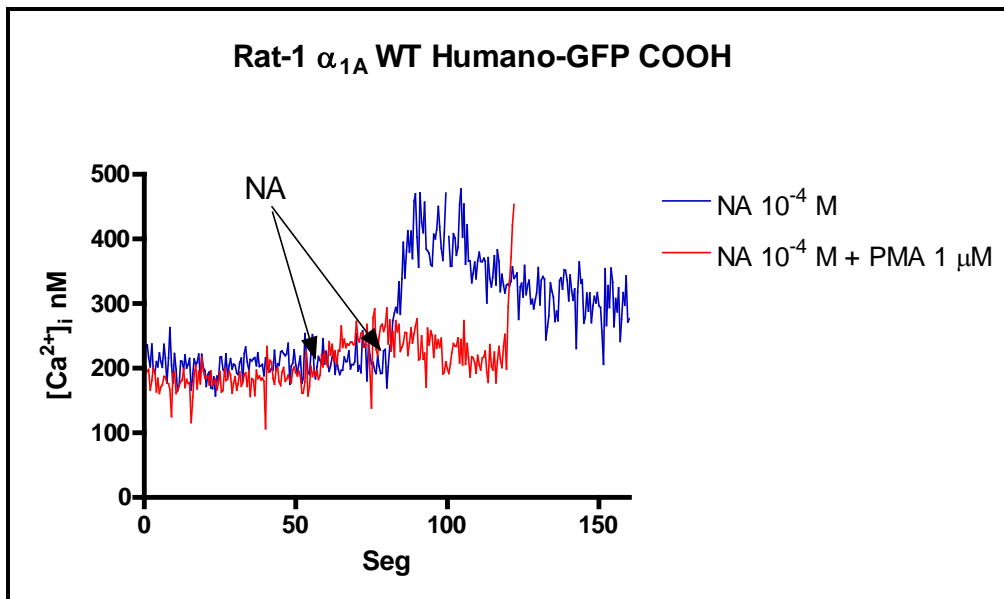
Para saber si el contexto celular es importante para las respuestas obtenidas con el receptor, se usaron las células Rat-1 transfectadas con el receptor HEK  $\alpha_{1A}$  WT-GFP COOH. En dicha línea celular se observó que el PMA induce la desensibilización del receptor, es decir, el receptor transfectado en una línea celular diferente mostró el mismo comportamiento en respuesta a la pre-incubación con PMA que la línea HEK  $\alpha_{1A}$  WT-GFP NH<sub>2</sub> (Figuras 17 y 26).



**Figura 25. Curvas dosis respuesta en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT humano, con y sin PMA.** La liberación promedio de calcio intracelular en las células control es de 1.1 veces el basal, mientras que en las células con PMA apenas alcanza un 0.4 veces el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad, n=4.

Los resultados anteriores nos indican que el efecto de desensibilización por PMA en el receptor  $\alpha_{1A}$  WT es independiente de la posición en la que se encuentre la EGFP y del contexto celular, al menos para el caso de las células Rat-1 y HEK-293.

La curva dosis respuesta hecha en la línea celular Rat-1  $\alpha_{1A}$  WT-GFP COOH muestra una respuesta a la NA ligeramente más robusta, aunque menos sensible que la obtenida en todas las líneas HEK-293, ya que alcanza un máximo cercano a 2 veces el basal, pero comienza a responder de forma clara hasta una concentración de NA de  $10^{-5}$  M (Figura 27). A pesar de estas diferencias en sensibilidad y fuerza de la respuesta, el abatimiento de la respuesta cuando las células son pre-incubadas con PMA es claramente similar al observado en las líneas celulares HEK (Figuras 18, 25 y 27).



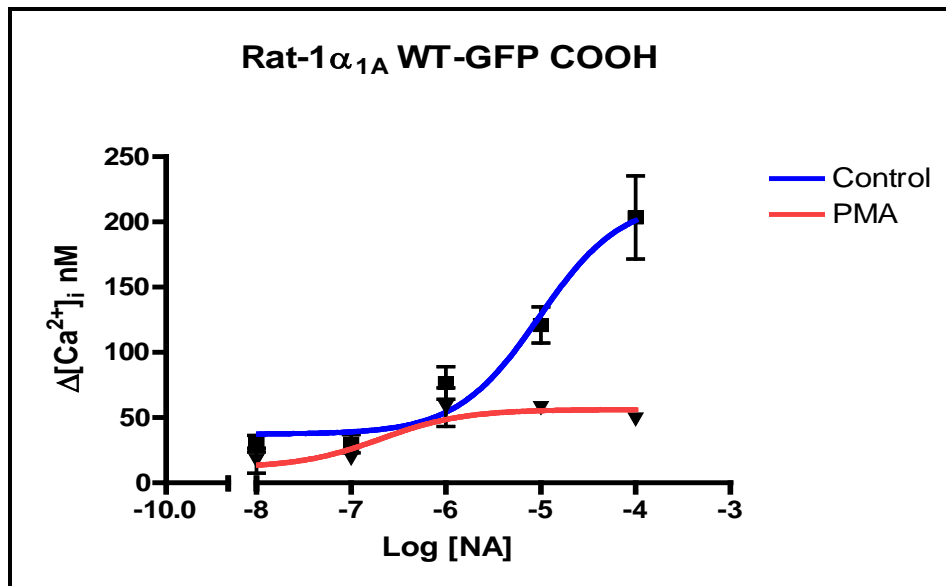
**Figura 26. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células Rat-1  $\alpha_{1A}$  WT-GFP COOH.** La respuesta máxima del trazo control es cercana a 2 veces el basal. Las células pre-incubadas con PMA muestran un abatimiento casi total de la señal de calcio.

### **8.7. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio mediada por el $\alpha_{1A}$ AR WT de bovino transfectado en células HEK-293.**

A lo largo de esta investigación, así como en la investigación realizada por Price *et al.*, en el año 2002, se ha observado que el receptor  $\alpha_{1A}$  WT de humano es desensibilizado después de un pre-estímulo con PMA. Existen reportes previos de que el receptor de bovino es completamente insensible a los efectos del PMA (Vázquez-Prado *et al.*, 2000). Para comprobar que el  $\alpha_{1A}$  AR WT de bovino es resistente a la desensibilización por PMA, se realizaron experimentos transfectándolo en células HEK-293. El receptor de bovino mostró ser más sensible a la NA, además de que la respuesta de liberación de calcio intracelular fue mucho más pronunciada. Tal como se esperaba, el receptor de bovino no es sensible a los efectos del PMA (Figura 29).

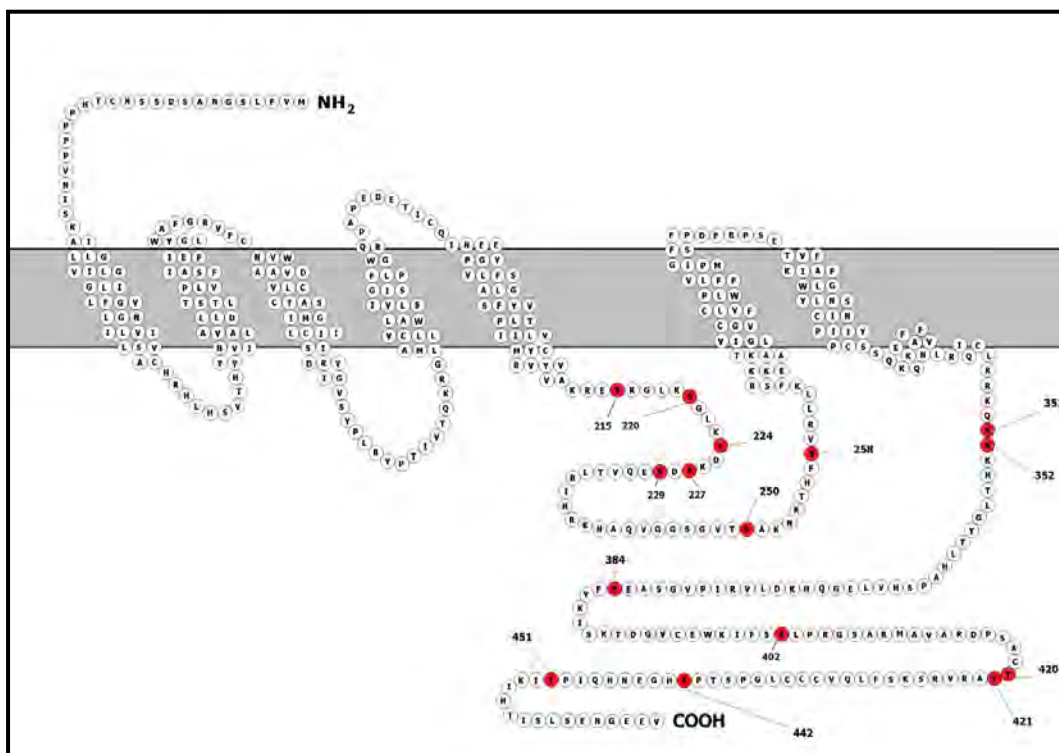
Estas diferencias con respecto al receptor humano son muy interesantes, pues aún cuando la homología entre ambos receptores (bovino y humano) es de 92%, existe una marcada diferencia en la desensibilización por PMA.

Las diferencias más importantes entre ambos receptores radican principalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxílico, y aunque gran parte de los sitios consenso para fosforilación por PKC se conservan en ambos receptores, en algunas regiones de los receptores los residuos que rodean a dichos sitios consenso varían considerablemente (Ver figuras 10 y 28 para el comparativo).



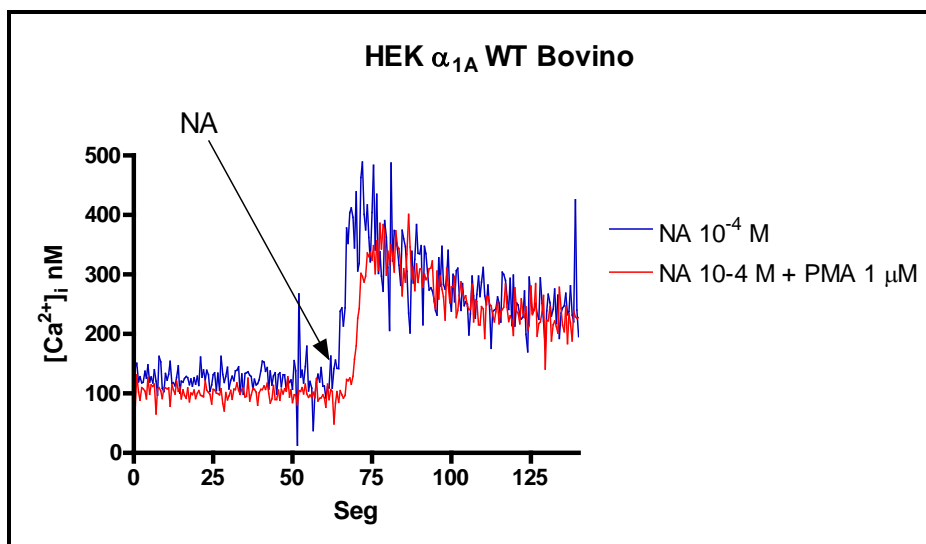
**Figura 27. Curvas dosis respuesta en células Rat-1  $\alpha_{1A}$  WT-GFP-COOH, con y sin PMA.**

La liberación promedio de calcio intracelular en las células control es de 2 veces el basal, mientras que en las células con PMA es de 0.4 veces el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad,  $n=4$  y 3. Datos  $\pm$  error estándar medio, cuando no se aprecian los errores es debido a que caen dentro del símbolo.

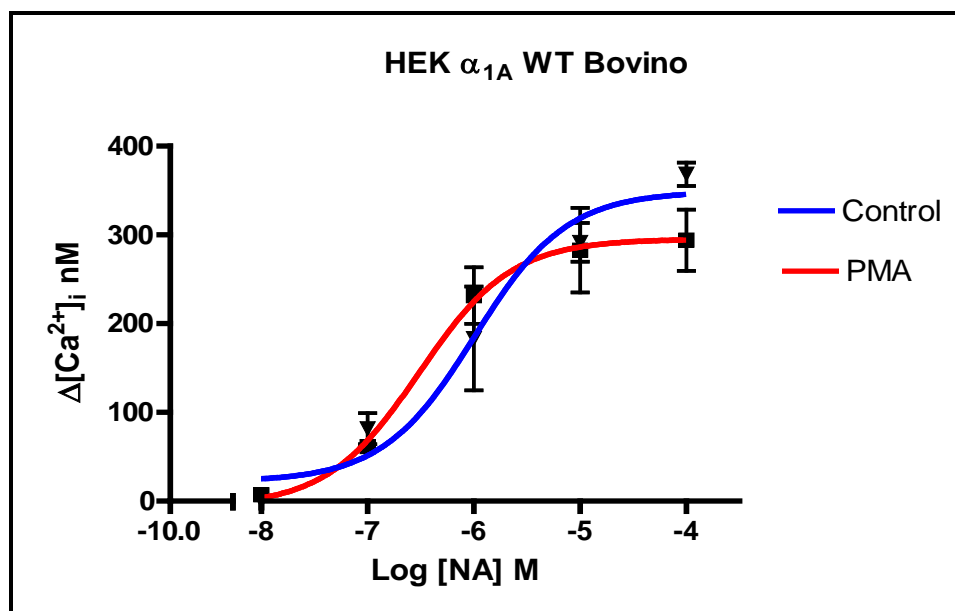


**Figura 28. Representación esquemática del receptor  $\alpha_{1A}$  AR WT de bovino**, el cual es tiene una homología de 92% con respecto al  $\alpha_{1A}$  AR WT de humano. Cada aminoácido está representado por una letra encerrada en un círculo, los círculos en rojo representan los sitios consenso de fosforilación por PKC, los números indican la posición de los aminoácidos.

Se puede observar que en la curva dosis respuesta para el receptor  $\alpha_{1A}$  WT de bovino, aún cuando las células HEK-293 fueron pre-incubadas con PMA, la respuesta es prácticamente la misma que en las células sin pre-incubación con PMA (Figura 30).



**Figura 29. Efecto del PMA sobre la liberación de calcio intracelular en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT Bovino.** La respuesta máxima del trazo control es de aproximadamente 5 veces el basal. Las células pre-incubadas con PMA no muestran un cambio significativo en la señal de calcio intracelular.



**Figura 30. Curvas dosis respuesta en células HEK  $\alpha_{1A}$  WT Bovino, con y sin PMA.** La liberación promedio de calcio intracelular en las células control es de 3.5 veces sobre el basal, en las células pre-incubadas con PMA el máximo de liberación de calcio intracelular es de 3 veces el basal. El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma GraphPad 4.0, en regresión no lineal y sigmoidea dosis respuesta, con un 95% de confiabilidad,  $n=4$  y 3. Datos  $\pm$  error estándar medio, cuando no se aprecian los errores es debido a que caen dentro del símbolo.

## 9. Discusión.

El receptor  $\alpha_{1A}$  adrenérgico es un importante mediador de la contracción del músculo liso, de la función del sistema nervioso simpático y de la función cardiovascular. A pesar de que se conoce bien su vía de señalización, se sabe muy poco al respecto de su regulación. La mayoría de los estudios previos sobre receptores adrenérgicos se centran en la familia de los  $\beta$  y en el  $\alpha_{1B}$  [Weinshank *et al.*, 1990; Zeng *et al.*, 1990; Bylund *et al.*, 1992; García-Sáinz *et al.*, 1999 (1 y 2); Vázquez-Prado *et al.*, 2000; Alcántara-Hernández *et al.*, 2000 y 2001; Molina-Muñoz *et al.*, 2008], siendo los  $\alpha_1$  objeto de estudio en los años más recientes.

En el presente estudio, nos propusimos encontrar algunos de los aspectos clave en la regulación del  $\alpha_{1A}$  AR humano. Entre las estructuras de regulación más importantes presentes en todos los GPCRs, se encuentran la tercera asa intracelular (3AI) y el extremo carboxílico. Dichos componentes presentan en sus estructuras, múltiples secuencias de aminoácidos específicas, que se encargan de direccionar a los receptores a diversas vías de regulación, que van desde la degradación del receptor hasta el reciclamiento rápido del mismo a través de vesículas endocíticas.

Algunas de las secuencias que se pueden encontrar con más frecuencia en la tercera asa intracelular y el extremo carboxílico, son sitios consenso para fosforilación por diversas cinasas, entre las que destacan la PKC, Akt/PKB, PKA, GRK, Src y receptores con actividad de tirosina cinasa; además de secuencias de interacción proteína-proteína, tales como los motivos de unión a caveolina o bien los motivos de unión a dominios PDZ.

Un análisis *in silico* de la estructura del receptor  $\alpha_{1A}$  AR humano (Tablas 2 y 3) mostró la presencia de múltiples sitios consenso para la fosforilación por PKC, GRK y Akt/PKB, tanto en la tercera asa intracelular -en donde se encontraron 7 sitios-, como en el extremo carboxílico -en donde se encontraron 16 sitios- (Ver figura 10).

Tomando el análisis *in silico* como referencia, se procedió a diseñar y generar receptores mutantes en sitios puntuales de la tercera asa y del extremo carboxílico, cambiando serinas por alaninas y treoninas por valinas. Dichas mutantes transfectadas en células HEK-293 mostraron una respuesta muy pobre en la liberación de calcio intracelular cuando fueron estimuladas con NA (datos no mostrados). Dadas las dificultades mostradas por los receptores con mutaciones puntuales para responder al estímulo con NA, y debido a que nuestro interés por estudiar las estructuras regulatorias del receptor estaba enfocado en ambas estructuras completas, decidimos generar construcciones del receptor con



modificaciones más drásticas: un receptor mutado en todos los sitios consenso de fosforilación presentes en la tercera asa intracelular ( $\alpha_{1A}$  3AI), y un segundo receptor con las mismas mutaciones que el  $\alpha_{1A}$  3AI y además truncado en el aminoácido 348 del extremo carboxílico ( $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C).

Los nuevos receptores mutantes nos permitieron evaluar que tan importante es la integridad del  $\alpha_{1A}$  AR en el proceso de desensibilización mediada por PMA, así como la relevancia de cada estructura regulatoria en particular. Se generaron líneas celulares HEK-293 transfectadas establemente con las tres diferentes versiones del receptor ( $\alpha_{1A}$  WT,  $\alpha_{1A}$  3AI y  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C), para realizar experimentos de desensibilización mediada por el activador directo de la PKC, el PMA. Sorprendentemente encontramos que el  $\alpha_{1A}$  WT humano es capaz de desensibilizar su respuesta a la NA bajo los efectos de una pre-incubación de 2 minutos con PMA 1  $\mu$ M. El dato es sorprendente debido a que reportes previos mostraron una resistencia casi total del  $\alpha_{1A}$  WT de bovino a la desensibilización por PMA (Vázquez-Prado *et al.*, 2000). La desensibilización que presentó el receptor  $\alpha_{1A}$  WT de humano fue prácticamente total (Figura 18), dicho resultado sugiere que al tratarse de un receptor intacto, conserva todos los componentes que le permiten regular su señalización celular, y que los sitios consenso de fosforilación por PKC que presenta tanto en la tercera asa intracelular como en el extremo carboxílico son funcionales en el proceso de desensibilización.

Para evaluar cuál de las estructuras del receptor es responsable mayoritaria de la desensibilización, probamos a las células HEK-293 transfectadas establemente con la mutante  $\alpha_{1A}$  3AI, en experimentos de desensibilización por PMA. El receptor mostró una resistencia parcial a la desensibilización, teniendo una respuesta de liberación de calcio intracelular de 2/3 con respecto a la liberación máxima alcanzada por el control sin PMA (Figura 20). Este resultado resulta interesante desde dos puntos de vista:

1. El receptor sin sitios de fosforilación en la tercera asa se vuelve resistente a la desensibilización por PMA, pero sólo parcialmente
2. Esto indica que existen otros componentes estructurales del receptor que le permiten continuar desensibilizándose, aunque de manera menos eficiente; en otras palabras, hay una cooperación de la tercera asa intracelular y otra estructura del receptor que lleva a la desensibilización total del receptor cuando las células son pre-incubadas con PMA

Estos resultados nos indicaron que la desensibilización residual observada en el receptor HEK-293  $\alpha_{1A}$  3AI es probablemente debida a la presencia de los sitios de fosforilación intactos en su extremo carboxílico. Se probaron las células HEK-293 transfectadas establemente con el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C, para observar su desensibilización cuando son pre-tratadas con PMA. Encontramos que el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C se torna casi completamente resistente a la desensibilización por PMA (Figura 22), aunque muestra una leve desensibilización, de aproximadamente 10% con respecto al control.

En resumen, encontramos que tanto la tercera asa intracelular, como el extremo carboxílico participan en la desensibilización del receptor  $\alpha_{1A}$  WT, y que es la tercera asa intracelular la mediadora de la mayor parte de la desensibilización observada, y que el extremo carboxílico del receptor participa de forma marginal en dicho proceso. Para corroborar completamente el papel de cada una de las estructuras del receptor, nos resta para investigaciones futuras generar un receptor que esté truncado en el extremo carboxílico con la tercera asa intracelular ( $\alpha_{1A}$   $\Delta$ C). Una construcción de dicho receptor ya ha sido estudiada en la investigación de Price *et al.*, (2002), en donde demostraron que la desensibilización del receptor no se ve afectada cuando se usa el receptor truncado en el aminoácido 348, es decir, el receptor truncado es capaz de desensibilizarse de manera similar al receptor silvestre.

Tomando la información obtenida en nuestras investigaciones y en los resultados de Price *et al.*, (2002), se sugiere que la resistencia a la desensibilización casi total que nosotros observamos en el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C es causada por la ausencia de ambas estructuras del receptor, y que cuando solamente se deleta el extremo carboxílico, la tercera asa toma el control total en la desensibilización del receptor, en un mecanismo compensatorio. Es posible que la fosforilación por PKC en la tercera asa, sea suficiente para impedir estéricamente la unión de la proteína G; o bien, en el caso de los sitios compartidos PKC/GRK (S327 y S329), que su fosforilación sea suficiente para reclutar a las arrestinas hacia el receptor, conduciéndolo a su internalización vía vesículas recubiertas de clatrina. Proponemos que cuando únicamente están presentes los sitios consenso fosforilados en el extremo carboxílico, éstos impidan, por efecto estérico y de forma muy tenue, la unión de la proteína G, siendo ésta una posible explicación de la desensibilización marginal observada en el receptor  $\alpha_{1A}$  3AI $\Delta$ C. En ausencia de ambas estructuras no habría ningún tipo de impedimento estérico que impida la interacción proteína-

proteína del receptor y la proteína G. En el caso de un receptor truncado y con la tercera asa intracelular intacta, siguiendo los razonamientos anteriores, el extremo carboxílico sería irrelevante, pues la tercera asa intracelular por sí sola es capaz de conducir al receptor a la desensibilización.

En esta investigación quisimos observar si la presencia de la GFP en el extremo amino del receptor es un factor que puede interferir en la señalización /regulación del receptor  $\alpha_{1A}$  WT humano. En el caso del  $\alpha_{1A}$  AR de bovino y del  $\alpha_{1B}$  AR de hámster, los cuales no están asociados a la GFP, se han observado respuestas de liberación de calcio intracelular robustas, alcanzando hasta 5 veces el valor del basal. Por su parte el  $\alpha_{1A}$  AR WT humano, aunque responde de forma reproducible, la intensidad de su respuesta a la NA no fue mayor a 2 veces el basal. Desconocemos si las respuestas pequeñas que obtuvimos en los experimentos con el  $\alpha_{1A}$  humano son debidas a la baja expresión del receptor, o bien a la naturaleza misma del receptor. Por este motivo decidimos generar nuevas líneas celulares, en las que la GFP estuviera en el extremo carboxílico en lugar del extremo amino, y hacer un comparativo entre las respuestas de ambas construcciones silvestres. Como se puede ver en la figura 25, las células HEK-293 transfectadas con el receptor  $\alpha_{1A}$  WT humano con la GFP en el extremo carboxílico, responden apenas un 1.1 veces el basal. Sin embargo, la desensibilización del receptor es similar de la construcción con la GFP en el extremo amino. Este resultado no excluye la posibilidad de que la posición de la GFP pueda influir negativamente en la intensidad de la respuesta, por lo tanto, no se descarta que la GFP esté mermando la respuesta del receptor. En futuras investigaciones generaremos construcciones del receptor que no estén unidas a la GFP, para observar si la intensidad de la respuesta puede verse incrementada.

Se evaluó el funcionamiento del receptor  $\alpha_{1A}$  humano transfectado en una línea celular diferente, con el fin de observar posibles diferencias en la respuesta debidas al contexto celular, ya que en una investigación de Tobin *et al.*, (2008), se analizan las diferencias en la respuesta y regulación de algunos GPCRs expresados en células de diferentes estirpes. La explicación es que las células que se diferencian en estirpes, expresan o reprimen genéticamente algunas proteínas, que resultan necesarias (ó innecesarias) para llevar a cabo las funciones especializadas de algún tejido particular. Para verificar si el receptor responde de forma similar en al menos otra línea celular, se utilizaron células Rat-1 transfectadas establemente con el  $\alpha_{1A}$

WT-GFP-COOH, las cuales provienen de una estirpe distinta a la de las células HEK-293. Dada la dificultad para transfectar fibroblastos de rata, no ha sido posible generar líneas celulares para cada construcción del receptor  $\alpha_{1A}$  AR de humano. Como se puede ver en la figura 27, el receptor transfectado en células Rat-1 responde de manera similar a los transfectados las células HEK, y también es desensibilizado por una pre-incubación con PMA. Estos resultados nos sugieren que, al menos para estas dos estirpes celulares, las respuestas del receptor  $\alpha_{1A}$  WT son reproducibles, y que no son dependientes de una sola línea celular.

En una investigación aún no publicada, Alejandro Cabrera Wrooman y Jesús Adolfo García Sáinz, han encontrado que el receptor  $\alpha_{1A}$  WT de bovino no es sensible al PMA, y que cuando se trunca en el aminoácido 348, el receptor es capaz de desensibilizarse, presumiblemente porque el extremo carboxílico del receptor impide de alguna manera la entrada de la PKC y GRK hasta la tercera asa, y cuando dicho extremo carboxílico es removido, se pierde la protección y la tercera asa puede ser fosforilada para desensibilizar al receptor.

Para comprobar si el receptor de bovino se comporta diferente al de humano, se realizó una curva dosis respuesta con el receptor  $\alpha_{1A}$  WT de bovino, el cual está asociado a la GFP. Como se puede ver en la figura 29, el receptor de bovino efectivamente tiene un comportamiento diferente al del humano, pues no sólo es resistente a la desensibilización por PMA, sino que tiene una intensidad mayor en la respuesta.

El origen de la diferencia entre la desensibilización del  $\alpha_{1A}$  AR de humano y el  $\alpha_{1A}$  AR de bovino no es claro, sin embargo, se puede especular que al tratarse de especies diferentes, la regulación en la actividad vascular, del sistema nervioso simpático y del miocardio haya evolucionado de forma diferente. Así, mientras que el receptor humano es desensibilizado por un pre-estímulo con PMA, lo cual implica la activación de la PKC, la fosforilación de los sitios consenso en la tercera asa intracelular y el extremo carboxílico, posiblemente, el reclutamiento de la maquinaria arrestinas/clatrina; el receptor de bovino puede ser regulado por algunos otros componentes de la maquinaria celular, posiblemente por desensibilización heteróloga mediante su fosforilación por PKA o por algunos factores de crecimiento con actividad de tirosina cinasa o bien por desensibilización homóloga mediante su reciclamiento/degradación vía proteínas con dominios PDZ.

## **10. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el  $\alpha_{1A}$  AR WT humano, a diferencia del  $\alpha_{1A}$  AR de bovino, es capaz de desensibilizarse cuando es pre-estimulado con PMA, sugiriendo la participación de isoformas clásicas y novel de la PKC. Se encontró que la tercera asa intracelular está implicada mayoritariamente en dicho proceso y que, aunque de manera marginal, el extremo carboxílico también está implicado en la regulación del receptor. La GFP en el extremo amino o carboxílico del  $\alpha_{1A}$  AR WT humano no interfiere en su capacidad para desensibilizarse, y la desensibilización del receptor mostró ser reproducible en al menos dos estirpes celulares diferentes, sugiriendo que la funcionalidad de la vía de desensibilización puede estar presente en una amplia variedad de estirpes celulares.

## 11. Perspectivas

En esta investigación nos dimos a la tarea de identificar a *grosso modo* los componentes estructurales que median la desensibilización del  $\alpha_{1A}$  AR WT humano, así como algunas de las proteínas que participan en dicho proceso. En futuras investigaciones nuestro grupo pretende encontrar los residuos específicos que median el proceso de desensibilización del receptor, haciendo mutagénesis puntual y sistemática de los diversos sitios consenso de fosforilación presentes en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxílico. Además, nos proponemos identificar a las isoformas de PKC y GRK que participan en la fosforilación del receptor, mediante técnicas de coimmunoprecipitación y western blot, el uso de RNAi y la expresión de dominantes negativas de dichas cinasas.

Un análisis *in silico* de la secuencia del  $\alpha_{1A}$  AR WT humano mostró la presencia de un motivo de unión a dominios PDZ (motivo PDZ) en los últimos cuatro residuos del extremo carboxílico del receptor. La presencia del motivo de unión a dominios PDZ nos sugiere que el receptor puede tener una vía alternativa de desensibilización independiente de fosforilación, y que esta vía puede dirigir el reciclamiento rápido del receptor. Con el fin de evaluar la funcionalidad del motivo PDZ, pretendemos generar un receptor truncante en el residuo 362, para así eliminar al motivo PDZ y visualizar por microscopía confocal el tráfico celular del receptor. Para identificar a las posibles proteínas que interactúan con el receptor a través del motivo PDZ, se realizarán coimmunoprecipitaciones y western blots del receptor.

## 12. Bibliografía

**Abel JJ** . Over the blood pressure-exciting component welfare of the suprarenal body, the Epinephrin. Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie. 1899. 28; 318-362.

**Ahlquist R P** . A study of the adrenotropic receptors. American Journal of Physiology. 1948. 153; 586.

**Alcántara-Hernández R** , Vázquez-Prado J , y García-Sáinz JA. Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid. British Journal of Pharmacology. 2000. 129; 724-730.

**Alcántara-Hernández R**, Leyva-Illades D y García-Sáinz JA. Protein kinase C- $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. European Journal of Pharmacology. 2001. 419; 9-13.

**Alcántara-Hernández R**, García-Sáinz A. Okadaic acid increases the phosphorylation state of  $\alpha_{1A}$ -adrenoreceptors and induces receptor desensitization. European Journal of Pharmacology. 2005. 525; 18-23.

**Alcántara-Hernández R** , Casas-González P y García-Sáinz JA. Roles of c-Src in  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor phosphorylation and desensitization. Autonomic & Autacoid Pharmacology. 2008. 28; 29-39.

**Bakewell S**. The autonomic nervous system. Practical procedures. 1995. 5; 1-2.

**Baltensperger K M**, Karoor V, Paul H. The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. Journal of Biological Chemistry. 1996. 271; 1061-1064.

**Berger G** and Dale HH. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. The Journal of Physiology. 1910. 41; 19-59.

**Berne R M** y Levy MN. Principles of Physiology. 5a edición. MOSBY. New York. 2005.

**Billington CK and Penn RB**. Signalling and regulation of G Protein-coupled Receptors in airway smooth muscle. Respiratory research. 2003. 4; 1-23.

**Björklund A**, Hokfelt T, Owman C. The peripheral nervous system. Elsevier. 1988. 117-142.

**Bracfort H** and Talbot J F. Oliver and Schafer's discovery of the cardiovascular action of suprarenal extract. Postgraduate Medical Journal. 1968. 507; 6-8.

**Bradford, H.** Fundamentos de neuroquímica. Editorial Labor S.A. Barcelona España. 1988.

**Bylund DB,** Blaxall HS, Iversen LJ, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lomasney JW. Pharmacological characteristics of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning. *Molecular Pharmacology*. 1992. 42; 1-5.

**Casas-González P,** Ruiz-Martínez A y García-Sáinz JA. Lysophosphatidic acid induces  $\alpha_1$ -adrenergic receptor phosphorylation through  $G_{\beta\gamma}$ , phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003. 1663; 75-83.

**Cavalli A,** Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel M, Ming Y, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F, Cotecchia S. Decreased blood pressure response in mice deficient for the  $\alpha_{1B}$  adrenergic receptor. *Proceedings of National Academy of Science*. 1997. 94; 11589-11594.

**Chen K K** and Schmidt CF. The action and clinical use of ephedrine, an alkaloid isolated from the Chinese drug ma huang. *Annals of allergy*. 1930. 9; 1-117.

**Cotecchia S,** Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Kobilka BK. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991. 85; 7159-7163.

**Cotecchia S,** Rossier O, Fanelli F, Leonardi A, De Benedetti PG. The  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  adrenergic receptor subtypes: molecular mechanisms of receptor activation and of drug action. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 2000. 74; 173-179.

**David H P,** St reeten M B. General organization of the autonomic nervous system. National Dysautonomia Research Foundation. 2000.

**DeGasparo M,** Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH. 2000. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* 52; 415-472.

**Dixon RA,** Sigal IS, Rands E Register RB, Candelore MR, Blake AD, Strader CD. Ligand binding to the beta adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. 1987. *Nature* 326; 73-77.

**Emorine LJ,** Marullo S, Briend-Sutren G. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 1989. 245; 1118-1121.

**Emson PC.** Chemical neuroanatomy. Raven Press. New York. 1984. 229-255.



**García-Sáinz JA**, Gottfried-Blackmore A, Vázquez-Prado J y Romero-Avila MT. Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*. 1999 (1). 385; 263-271.

**García-Sáinz JA**, Mendoza-Mendoza A y Vázquez-Prado J. In: Intracellular Calcium and  $\alpha_{1B}$ -Adrenoceptor Phosphorylation. *Archives of Medical Research*. 1999 (2). 30; 353-357.

**García-Sáinz JA**, Romero-Ávila MT, Molina-Muñoz T y Medina LC. Insulin induces  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. *Life Science*. 2004. 16; 1937-1947.

**Guyton AC**. Sistema nervioso autónomo-médula suprarrenal. Tratado de fisiología médica. 8ª ed. Madrid. Interamericana - McGraw-Hill. 1993; 699-711.

**Graham RM**, Pérez DM, Hwa J, Piascik MT.  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes, molecular structure, function and signalling. *Circulation Research*. 1996. 78; 737-749.

**Hadcock JR** y Malbon CC. Down-regulation of beta adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1996. 85; 5021-5025

**Hausdorff WP**, Caron MG and Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta adrenergic receptor function. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 1990. 4; 2881-2889.

**Hoffman BB** and Lefkowitz RJ. Catecholamines sympathetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Gilman AG and Limbird L. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill. New York. 1995. 105-140.

**Kallal L**, Gagnon AW, Penn RB and Benovic JL. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. 273; 322-328.

**Kohout TA** and Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Molecular Pharmacology*. 2003. 63; 9-18.

**Krupnick JG** y Benovic JL. The role of receptor kinases and receptors in G-protein-coupled receptor regulation. *Annual Reviews of Pharmacology & Toxicology*. 1998. 38; 289-319.

**Landsberg L** y Young J. Fisiología y farmacología del sistema nervioso autónomo. Principios de medicina interna 13ª edición. Interamericana-Mc Graw-Hill. España. 1994. 1; 481-497.

**Malbon CC** and Hsien-yu Wang. Adrenergic Receptors. Encyclopedia of life sciences, Nature publishing group. 2001. 1-8.

**Marchese A**, Chen C, Kim YM, Benovic JL. The ins and outs of G-protein-coupled receptor trafficking. Trends in Biochemical Sciences. 2003. 28; 369-376.

**Mcgeer, P**, Eccles, JC and McGeer, EG. Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain. Plenum Press. New York and London. 1978.

**Michel MC**, Kenny B, Schwinn DA. Classification of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1995. 352; 1-10.

**Molina-Muñoz T**, Romero-Ávila MT, Avendaño-Vázquez SE y García-Sáinz JA. Phosphorylation, desensitization and internalization of human  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I. European Journal of Pharmacology. 2008. 578, 1-10.

**Nelson DL**, Cox MM. Lehninger, principles of biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York. 2005.

**Oliver G** and Schaefer E A. On the physiological action of extract of the suprarenal capsules. Journal Physiology (London). 1895. 18; 230.

**Pérez DM**. The Adrenergic Receptors in the 21<sup>st</sup> Century. Humana Press Editors. Totowa, New Jersey. 2006. pp 138-139.

**Price RR**, Morris DP, Biswas G, Smith MP, Schwinn DA. A G-protein-mediated Desensitization of the Human  $\alpha_{1A}$ -Adrenergic Receptor Is Primarily Independent of Carboxyl Terminus Regulation. The Journal of Biological Chemistry. 2002. 277; 9570-9579.

**Shumay E**, Gavi S, Wang HY and Malbon CC. Trafficking of  $\beta$ 2-adrenergic receptors: insulin and beta-agonists regulate internalization by distinct cytoskeletal pathways. Journal of Cell Science. 2004. 117; 593-600.

**Takamine J**. Adrenalin the active principle of the suprarenal glands and its mode of preparation. The American Journal of Pharmacy. 1901. 73; 523-531.

**Tao J**, Wang HY and Malbon CC. Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the beta2-adrenergic receptor. European Molecular Biology Organization Journal. 2003. 22; 6419-6429.

**Tobin AB**, Butcher AJ, Kong KC. Location, location, location. . . sitespecific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signaling. Cell Press. 2008. TIPS-651; 1-8.

**Tran TM**, Friedman J, Qunaibi E. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. Molecular Pharmacology. 2004. 65; 196-206.

**Vázquez-Prado J**, Medina LC y García-Sáinz JA. Activation of Endothelin ET<sub>A</sub> Receptors Induces Phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -Adrenoreceptors in Rat-1 Fibroblasts. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272; 27330-27337

**Vázquez-Prado J**, Medina LC, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C, García-Sáinz JA. Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of  $\alpha_{1A}$ -adrenergic receptors. Functional aspects. Journal of Biology Chemistry. 2000. 275; 6553-6559.

**VonFürth O**. To the knowledge of the pyrocatechol-similar substance in the suprarenal bodies. Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie. 1900. 29; 105-12.

**Weinshank RL**, Zombick JM, Macchi M. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a human  $\alpha_{2B}$  adrenergic receptor. Molecular Pharmacology. 1990. 35; 681-688.

**Wess J**. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. Federation of American Societies of Experimental Biology Journal. 1997. 5; 346-354.

**Yarden Y**, Rodriguez H, Wong SK, Brandt DR, May DC, Burnier J, Harkins RN, Chen EY, Ramachandran J, Ullrich A. The avian beta adrenergic receptor: primary structure and membrane topology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1986. 89; 6795-6799.

**Yu X**, Jian R, Xinjiao G, Changjiang J, Longping W, and Xuebiao Y. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy Molecular Cell Proteomics. 2008. 7; 1598-1608.

**Zeng D**, Harrison JK, D'Angelo DD. Molecular characterization of a rat  $\alpha_{2B}$  adrenergic receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1990. 87; 3102-3106.