

Juliana Akinaga

Fosforilação, dessensibilização e internalização de  
adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  ativados por noradrenalina e  
oximetazolina:  
Participação diferencial da PKC e da GRK2

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
de Botucatu – Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Biológicas, área  
de concentração Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Akinaga, Juliana.

Fosforilação, dessensibilização e internalização de adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  ativados por noradrenalina e oximetazolina : participação diferencial da PKC e da GRK2 / Juliana Akinaga. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Capes: 21005001

1. Fosforilação. 2. Creatina-quinase. 3. Inibidores químicos.

Palavras-chave: Adrenoceptores  $\alpha_{1A}$ ; GRK; Noradrenalina; Oximetazolina; PKC.

Aos meus pais, Jorge e Angélica,  
que sempre me incentivaram,  
eu dedico esse trabalho

## **Agradecimentos**

Ao professor André Sampaio Pupo, que me ensinou a ter gosto pela farmacologia, e que acima de tudo, teve paciência para me orientar todos esses anos.

A el Dr. J. Adolfo García-Sáinz y la Dr<sup>a</sup> Rocío Alcántara-Hernández: muchas gracias por mi estancia en México. Creo que sin ayuda de ustedes no podría estar con una tesis completa.

Aos meus irmãos Bruno e Rafael, e minhas cunhadas Aline e Rubia, por estarem sempre me apoiando, mesmo que à distância.

A todos os meus familiares que, de alguma maneira, me apoiaram e torceram para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Aos amigos de laboratório Vanessa, Fernanda, Bárbara, Enio, Ricardo e Carlos, por toda a ajuda nos experimentos e, mais do que isso, pelos momentos de descontração e pela amizade compartilhada no dia-a-dia.

A todos os amigos que fiz ao longo desses anos na pós-graduação, em especial ao Anthony “Moaz” e à Flávia “Kalose”, que me acompanham desde meus primeiros dias em Botucatu, e também à Patrícia, Michele e Renata, pela amizade dentro e fora do Departamento.

Aos amigos Cintia, Felipe e Márcio, que estiveram comigo durante anos e que foram a minha “família” em Botucatu.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, mestres que me acompanharam durante anos, passando seus conhecimentos e ajudando na minha formação.

À professora Maria de Fátima Lázari, que gentilmente cedeu os vetores com a forma dominante negativa da GRK2 e que me auxiliou no início do doutorado, me fornecendo ideias que foram importantes para a realização desse doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Cris, Paulo, Luis, Flávia e Janete por toda a ajuda que vocês dão a nós, todos os dias.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação por todo o apoio que nos oferecem enquanto somos alunos.

À CAPES (proc. 9150-11-0) e à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a realização dessa tese.

## Sumário

### RESUMO

### ABSTRACT

## INTRODUÇÃO .....2

RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR) OU RECEPTORES DE 7 DOMÍNIOS

TRANSMEMBRANA (7-TMR) .....2

ADRENOCEPTORES  $\alpha_1$  ( $\alpha_1$ -ARs).....3

PROTEÍNA QUINASE C (PKC).....5

QUINASE DE RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GRK) .....7

REGULAÇÃO DE  $\alpha_{1A}$ -ARs POR SERINA/TREONINA QUINASES..... 11

## OBJETIVO .....14

## MATERIAL E MÉTODOS .....14

ESTUDOS DE CONTRAÇÃO..... 14

CULTURA DE CÉLULAS E TRANSFEÇÃO..... 15

ENSAIOS DE FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR..... 15

QUANTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO ESPECÍFICA DO [<sup>3</sup>H]PRAZOSIN EM CÉLULAS INTACTAS ..... 17

MICROSCOPIA CONFOCAL..... 18

ENSAIOS DE ACÚMULO DE  $Ca^{2+}$  INTRACELULAR ..... 19

ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE  $IP_3$  UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA POLARIZADA.....21

ANÁLISE ESTATÍSTICA .....23

## RESULTADOS.....25

TAQUIFILAXIA INDUZIDA PELA OXIMETAZOLINA .....25

DESSENSIBILIZAÇÃO DE  $\alpha_{1A}$ -ARs HUMANOS RECOMBINANTES .....28

INTERNALIZAÇÃO DE DE $\alpha_{1A}$ -ARS HUMANOS RECOMBINANTES .....	32
FOSFORILAÇÃO DE $\alpha_{1A}$ -ARS.....	36
ENVOLVIMENTO DA PKC E DA GRK2 NA FOSFORILAÇÃO DE $\alpha_{1A}$ -ARS INDUZIDA PELA NORADRENALINA E PELA OXIMETAZOLINA .....	38
PAPEL DA GRK2 NA DESENSIBILIZAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE $\alpha_{1A}$ -ARS INDUZIDAS PELA OXIMETAZOLINA .....	41
PARTICIPAÇÃO DA PKC NA INTERNALIZAÇÃO TARDIA DE $\alpha_{1A}$ -ARS INDUZIDAS PELA NORADRENALINA.....	43
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

**Resumo**

As catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina controlam importantes funções fisiológicas através da ativação de  $\alpha_{1A}$ -ARs, que são receptores com 7 domínios transmembrana os quais ativam proteínas G. Muitos agonistas de  $\alpha_1$ -ARs são utilizados na terapêutica, principalmente por conta de seu efeito vasoconstritor, porém, a taquifilaxia observada com a oximetazolina, um agonista de  $\alpha_1$ -ARs da classe das imidazolininas, é um efeito adverso importante e pode ser observado principalmente com a utilização de descongestionantes nasais por períodos de tempo prolongado. No presente estudo, investigamos a participação de PKC e GRK2 nos processos de fosforilação, dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs induzidos pelos agonistas noradrenalina e oximetazolina. Segundo os resultados obtidos, a oximetazolina, mas não a fenilefrina, induziu taquifilaxia nas contrações de artéria caudal de rato. Além disso,  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina são fosforilados principalmente pela GRK2, seguida de rápida dessensibilização e internalização. Já  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina são fosforilados principalmente pela PKC, sem dessensibilização nem rápida internalização. Esses resultados em conjunto demonstram que a oximetazolina e a noradrenalina regulam os  $\alpha_{1A}$ -ARs através de diferentes mecanismos, envolvendo diferentes quinases.



**Abstract**

The endogenous catecholamines epinephrine and norepinephrine control important physiological functions through activation of  $\alpha_{1A}$ -ARs, which are 7-transmembrane receptors that activate G proteins. Several  $\alpha_1$ -ARs agonists are therapeutically useful in reason of its vasoconstrictor effects; however, tachyphylaxis in the vasoconstrictor effects of nasal decongestant containing oxymetazoline, an imidazoline  $\alpha_1$ -ARs agonist, is an important adverse effect observed after prolonged treatment. On the present study, we investigated the roles of PKC and GRK2 on the  $\alpha_{1A}$ -AR phosphorylation, desensitization and internalization process after receptor activation by norepinephrine and oxymetazoline. The results show that oxymetazoline, but not phenylephrine, induce tachyphylaxis in contractions of rat tail artery. Moreover,  $\alpha_{1A}$ -ARs activated by oxymetazoline are phosphorylated predominantly by GRK2, followed by rapid desensitization and internalization whereas  $\alpha_{1A}$ -ARs activated by norepinephrine are phosphorylated predominantly by PKC and not followed by desensitization or rapid internalization. These results show that norepinephrine and oxymetazoline regulate  $\alpha_{1A}$ -ARs through different mechanisms, involving different protein kinases.

## Introdução

### Receptores acoplados à proteína G (GPCR) ou Receptores de 7 domínios transmembrana (7-TMR)

Os GPCRs constituem uma superfamília de receptores que possuem sete domínios transmembrana e que são capazes de responder a diversos estímulos externos como luz, odor ou neurotransmissores. A ativação dos receptores em resposta a esses estímulos leva à regulação da formação de segundos mensageiros que alteram a fisiologia celular.

A estimulação ou inibição de formação dos segundos mensageiros é feita pela proteína G, uma proteína heterotrimérica composta por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que, quando em estado inativo, se liga a moléculas de difosfato de guanosina (GDP) e quando ativadas, trocam o GDP por trifosfato de guanosina (GTP), promovendo a dissociação do heterotrímero em duas partes: a subunidade  $\alpha$  ligada a GTP e o complexo  $\beta\gamma$ . Após a ativação da subunidade  $\alpha$ , o GTP é hidrolisado em GDP, fazendo com que a proteína G retorne à sua forma inativa (Morris *et al.*, 1999).

Recentemente, tem crescido a preferência pela utilização da nomenclatura de 7-TMRs no lugar de GPCRs devido à descoberta de que esses receptores, além da ativação de proteína G, podem iniciar sua sinalização intracelular através da interação com outras proteínas intracelulares (Brzostowski *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 2012).

### Adrenoceptores $\alpha_1$ ( $\alpha_1$ -ARs)

Os  $\alpha_1$ -ARs pertencem à superfamília de receptores 7-TMRs, possuindo como característica principal os sete domínios transmembrana com a porção amino-terminal (N-terminal) extracelular e a porção carboxi-terminal (C-terminal) intracelular de tamanhos variados. Quando ativados, os  $\alpha_1$ -ARs levam à formação de segundos mensageiros, responsáveis pela ativação de cascatas bioquímicas intracelulares que culminam em respostas fisiológicas.

Os  $\alpha_1$ -ARs são divididos em três subtipos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ , (Hieble *et al.*, 1995), que são codificados por três diferentes genes (em humanos localizados nos cromossomos 8, 5 e 20 respectivamente (Lomasney *et al.*, 1991; Schwinn *et al.*, 1990; Yang-Feng *et al.*, 1994)). Todos os subtipos de  $\alpha_1$ -ARs ativam preferencialmente a proteína  $G_{q/11}$  em resposta às catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina (Zhong *et al.*, 1999).

A ativação da proteína  $G_{q/11}$  leva à dissociação da unidade heterotrimérica da proteína G e a subunidade  $\alpha$  ativa a fosfolipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) que hidrolisa moléculas de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ), formando dois segundos mensageiros principais: o diacilglicerol (DAG), que permanece ancorado na membrana plasmática e o inositol 1,4,5-trisfosfato (IP $_3$ ), que se difunde no citoplasma e ativa receptores específicos presentes em organelas intracelulares que estocam  $Ca^{2+}$  promovendo a saída de  $Ca^{2+}$  do retículo para o citoplasma (Berridge, 1984). O  $Ca^{2+}$  liberado pelo IP $_3$ , juntamente com o DAG, ativa a proteína quinase C (*protein kinase C*, PKC) (Berridge, 1984), uma proteína que promove a fosforilação de suas proteínas-alvo.

Importantes funções fisiológicas da noradrenalina e da adrenalina são controladas pela ativação dos  $\alpha_1$ -ARs, tais como contração de musculatura lisa vascular e não-vascular, a excitabilidade neuronal e o crescimento e diferenciação celular (Docherty, 2010; Zhong *et al.*, 1999). Devido a essa importância fisiológica, diversos compostos que mimetizam (agonistas) ou diminuem (antagonistas) os efeitos das catecolaminas endógenas têm utilidade terapêutica. Por exemplo, os antagonistas de  $\alpha_1$ -ARs podem ser utilizados, para o tratamento de hiperplasia prostática benigna e da hipertensão (Chapple, 1996) enquanto que agonistas desses receptores são utilizados para reverter a hipotensão e choque (Stewart *et al.*, 2002), também como descongestionantes e midriáticos quando aplicados localmente às membranas mucosas nasais e do olho (Johannssen *et al.*, 1997).

De acordo com suas características químicas, os agonistas de  $\alpha_1$ -ARs são divididos em duas classes principais: as feniletilaminas (p.ex. noradrenalina, adrenalina, fenilefrina) que, em sua maioria são agonistas de alta eficácia e possuem afinidade maior pelo subtipo  $\alpha_{1D}$ , e as imidazolininas (p.ex. nafazolina, oximetazolina, A61603), que em sua maioria são agonistas de baixa eficácia e possuem seletividade maior pelo subtipo  $\alpha_{1A}$  (Kamikihara *et al.*, 2005; Minneman *et al.*, 1994).

Em geral, uma das limitações do uso de agonistas de 7-TMRs é a redução ou até mesmo o desaparecimento da resposta farmacológica após o uso contínuo ou repetido destas drogas. Segundo a *International Union of Pharmacology* (IUPHAR), a perda de resposta funcional é definida como taquifilaxia e quando essa perda de resposta é consequência direta da ativação de um receptor, pode ser denominada dessensibilização (Neubig *et al.*, 2003).

A taquifilaxia nos efeitos vasoconstritores de medicações contendo agonistas de  $\alpha_1$ -ARs da classe das imidazolininas limita sua utilização e a *rhinitis medicamentosa* e hiperemia rebote resultante do uso destas drogas têm sido associadas à dessensibilização de  $\alpha_1$ -ARs (Graf *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 1994; Vaidyanathan *et al.*, 2010)

A dessensibilização de 7-TMRs pode resultar do bloqueio da interação do receptor com a proteína G, impedindo a ativação dessa via de sinalização. Esse bloqueio pode ocorrer, por exemplo, quando resíduos de aminoácidos que interagem com a proteína G são fosforilados por quinases ou quando outras proteínas intracelulares interagem com o receptor nos mesmos sítios de interação da proteína G (Krupnick *et al.*, 1998; Wilden, 1995).

Existem três classes de moléculas que promovem a dessensibilização de 7-TMRs: as proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros, as quinases de receptores acoplados à proteína G (*G protein-coupled receptor kinase*, GRK) e as arrestinas (Ferguson, 2001; Krupnick *et al.*, 1998).

### Proteína quinase C (PKC)

A PKC faz parte do grupo de quinases dependentes de segundos mensageiros, assim nomeados pois sua ativação se dá por segundos mensageiros formados em resposta a ativação de receptores. São proteínas fosforiladoras, que catalisam a transferência de um grupo  $\gamma$ -fosfato de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) para serinas ou treoninas localizadas na sequência consenso RKX(S/T)X(R/K)(Pearce *et al.*, 2010).

O grupo de quinases dependentes de segundos mensageiros pertence à família AGC, assim nomeada pois seus membros possuem homologia com a proteína quinase dependente de AMP cíclico (*protein kinase A*, PKA), com a proteína quinase dependente de GMP (*protein kinase G*, PKG) e com a proteína quinase dependente de cálcio (*protein kinase C*, PKC) (Pearce *et al.*, 2010). Todas possuem um domínio proteína quinase de serina/treonina conservado em sua porção C-terminal com propriedades catalíticas semelhantes, porém não idênticas (Jester *et al.*, 2012; Nishizuka, 2003; Pearce *et al.*, 2010).

A família da PKC compreende dez isoformas, classificadas de acordo com suas estruturas e características bioquímicas: as PKCs convencionais (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ), as PKCs novas (isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ) e as PKCs atípicas (isoformas  $\zeta$  e  $\lambda/\iota$ ) (Ohno *et al.*, 2002).

A estrutura esquemática das PKCs é mostrada na Figura 1. As PKCs convencionais e novas possuem em sua porção N-terminal um sítio C1, rico em cisteína, importante para sua interação com o segundo mensageiro DAG e com ésteres de forbol. Além disso, as PKCs convencionais possuem um sítio C2 importante para a interação com  $\text{Ca}^{2+}$  sendo que, nas PKCs novas, o sítio C2 possui diferenças em relação ao sítio C2 das PKCs convencionais que faz com que esse grupo de PKCs não necessite da interação com  $\text{Ca}^{2+}$  para sua ativação (Shirai *et al.*, 2002). Nas PKCs atípicas, o sítio C1 não possui alguns dos resíduos críticos que são essenciais para a interação com o DAG e ésteres de forbol, fazendo com que esse grupo de PKCs não necessite dessa interação para sua ativação (Figura 1) (Shirai *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Desenho esquemático da estrutura das PKCs convencionais (A), novas (B) e atípicas (C). O esquema destaca os domínios C1 (azul escuro) e C2 (azul claro) na porção N-terminal e o domínio quinase (roxo) localizado na porção C-terminal.

Após a sua ativação, a PKC pode fosforilar resíduos de serina e treonina presentes no receptor que promoveu sua ativação, promovendo dessensibilização homóloga, mas também pode fosforilar resíduos de outros receptores presentes na célula, uma vez que essa quinase não faz distinção entre receptores ativados ou inativados (Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990), podendo promover dessensibilização heteróloga.

#### Quinase de receptores acoplados à proteína G (GRK)

As GRKs foram inicialmente descritas como proteínas fosforiladoras de rodopsina, capazes de modular esse receptor após sua ativação pela luz. É uma família de proteínas composta por sete isoformas divididas em três subfamílias de

acordo com sua homologia estrutural (Figura 2) (Gurevich *et al.*, 2012; Penela *et al.*, 2003; Ribas *et al.*, 2007).

As GRKs são divididas em GRKs visuais (GRKs 1 e 7),  $\beta$ ARKs (GRK 2 e 3) e a família GRK4 (GRKs 4, 5 e 6). As GRKs 2, 3, 5 e 6 possuem uma distribuição ampla por diferentes tecidos enquanto que as GRKs 1, 4 e 7 possuem localização restrita a tecidos específicos: a GRK1 é encontrada somente em bastonetes, a GRK7 somente em cones e a GRK4 em testículo, cerebelo e rim (Sallese *et al.*, 2000; Virlon *et al.*, 1998).

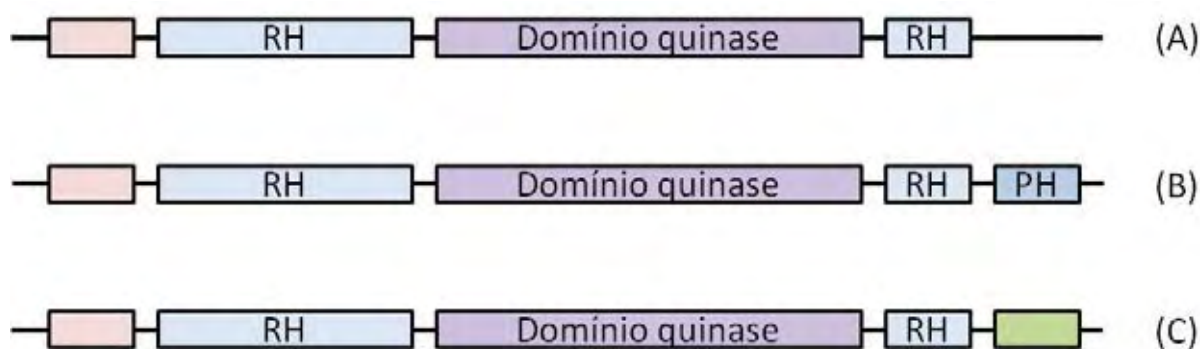
As GRKs 2, 3, 4, 5 e 6 também se diferenciam em relação à sua localização subcelular. As GRKs 4 e 6 possuem sítios de palmitoilação, que facilitam sua localização na membrana, além de possuírem sítios de interação com lipídeos. A GRK5 localiza-se ancorada à membrana plasmática por possuir sítios de interação com lipídeos em sua porção C-terminal. As GRKs 2 e 3 localizam-se no citoplasma e somente são recrutadas à membrana após a ativação do receptor, pois sua ancoragem à membrana depende da interação com o complexo  $\beta\gamma$  da proteína G (Pitcher *et al.*, 1992).

As GRKs 2 e 3 possuem também um sítio de interação com a subunidade  $\alpha_q$  da proteína G, localizado no domínio RH (*regulatory G protein signalling homology domain*) (Figura 2). Essa interação diminui a ativação de PLC pela subunidade  $\alpha$ , diminuindo a hidrólise dos fosfolipídeos e, conseqüentemente, diminuindo a produção dos segundos mensageiros DAG e  $IP_3$  (Gurevich *et al.*, 2012).

Assim como as PKCs, as GRKs também pertencem ao grupo AGC de proteínas quinases por possuírem o sítio catalítico com seqüência de aminoácidos



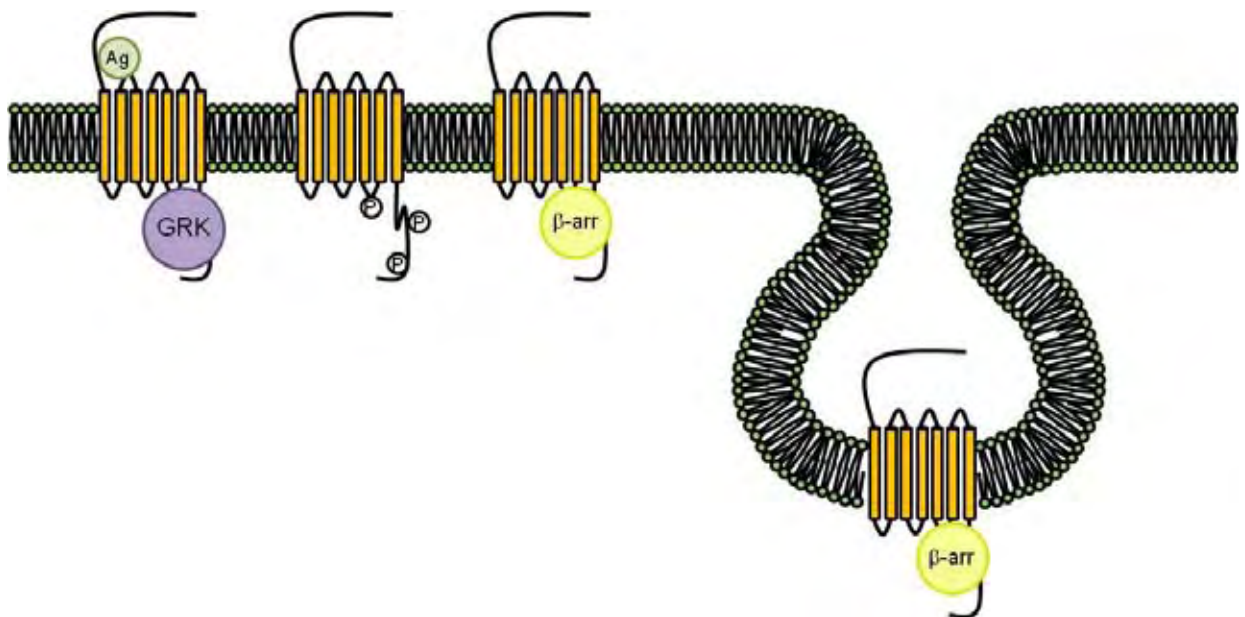
semelhante ao das quinases dependentes de segundos mensageiros (Pearce *et al.*, 2010). Porém, diferente das PKCs, o sítio consenso específico de fosforilação das GRKs não é conhecido; sendo assim, é difícil prever os locais exatos de fosforilação por essas quinases.



**Figura 2.** Desenho esquemático da estrutura das GRKs visuais (A),  $\beta$ ARKs (B) e da família GRK4 (C). Porção N-terminal (rosa) responsável pela interação com o receptor; domínio RH (*regulatory G protein signalling homology domain*) em azul claro dividido pelo domínio quinase (roxo); domínio PH (*pleckstrin homology domain*), responsável pela interação com a subunidade  $\beta\gamma$  da proteína G (azul escuro); porção de interação com lipídeos (verde).

Um fator diferencial na fosforilação induzida pela PKC e pela GRK é que as GRKs somente fosforilam receptores em sua forma ativada; sendo assim, apenas os receptores que foram responsáveis por sua ativação são fosforilados, promovendo dessensibilização homóloga. Além disso, outro fator importante é que a fosforilação induzida pela GRK aumenta o recrutamento de arrestina pelo receptor, intensificando a dessensibilização, uma vez que estas proteínas interagem com o receptor nos mesmos sítios que a proteína G. Além de intensificar a

dessensibilização, a arrestina também sinaliza para a formação de vesículas recobertas por clatrina, promovendo a internalização do receptor (Figura 3) (Penela *et al.*, 2003; Ribas *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Esquema ilustrando o processo de fosforilação e internalização de 7-TMRs por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRK) após a ativação por agonistas, seguido de internalização por vesículas recobertas por clatrina. Ag: agonista;  $\beta$ -Arr:  $\beta$ -arrestina



Além disso, o subtipo  $\alpha_{1A}$  também se mostra mais resistente à dessensibilização induzida por noradrenalina e por ésteres de forbol (Cabrera-Wrooman *et al.*, 2010) e à internalização induzida por fenilefrina e adrenalina (Chalothorn *et al.*, 2002; Stanasila *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007) que os outros dois subtipos.

Portanto, no que se refere à fosforilação, dessensibilização e internalização, é aceitável a visão de que os  $\alpha_{1A}$ -ARs são menos regulados do que os outros subtipos (revisado em (Cotecchia, 2010)). Neste contexto, a taquifilaxia nos efeitos vasconstritores de medicações contendo agonistas de  $\alpha_1$ -ARs da classe das imidazolininas é intrigante, uma vez que essas drogas são seletivas para  $\alpha_{1A}$ -ARs (Minneman *et al.*, 1994) e estes receptores são menos suscetíveis à fosforilação, dessensibilização e internalização do que os outros dois subtipos.

## **Objetivo**

O objetivo do presente trabalho foi investigar os processos de fosforilação, dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados por noradrenalina e oximetazolina bem como avaliar comparativamente a participação da PKC e da GRK2 nesses processos.

## **Objetivos Específicos**

- analisar o processo de taquifilaxia induzida pelos agonistas fenilefrina (feniletilamina) e oximetazolina (imidazolina) através da ativação de  $\alpha_{1A}$ -ARs nativos da artéria caudal de rato;
- investigar comparativamente os processos de fosforilação, dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes expressos em células HEK293, induzidos pelos agonistas noradrenalina e oximetazolina;
- verificar a participação diferencial da PKC e da GRK2 nos processos de fosforilação, dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs após estímulo com noradrenalina ou oximetazolina.

## Material e Métodos

### Estudos de Contração

Ratos Wistar machos adultos (16 a 20 semanas de idade) foram decapitados em guilhotina e segmentos da porção distal da artéria caudal foram retirados e preparados para o registro digital de contrações isométricas como se segue: os segmentos foram limpos de tecidos aderentes e do endotélio e montados em câmaras musculares de 10 ml sob tensão ótima de 2.0 g em solução nutriente com a seguinte composição (mM): NaCl 119; KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, dextrose 11, preparada em água destilada e deionizada e mantida a 37°C, pH 7.4, continuamente borbulhada com mistura de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram feitos na presença de um coquetel de inibidores contendo cocaína (10 µM), corticosterona (10 µM), ioimbina (0.1 µM) e propranolol (0.1 µM) para bloquear a captação neuronal, extraneuronal, α<sub>2</sub>- e β-adrenoceptores, respectivamente.

Foram construídas curvas concentração-resposta pelo método cumulativo com a adição de concentrações crescentes do agonista. As curvas foram analisadas por regressão não-linear através do software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) para obtenção dos parâmetros  $pEC_{50}$  (que corresponde à concentração do agonista que promove 50% de seu efeito máximo) e efeito máximo ( $E_{máx}$ ).

*Cultura de Células e Transfecção*

Células derivadas do rim embrionário humano (HEK293) foram cultivadas em placas de cultura 100X20mm e mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) com 1 mM piruvato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 10 mg/l de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina a 37°C em atmosfera umidificada (5% CO<sub>2</sub>). Placas com aproximadamente 70% de confluência foram utilizadas para a transfecção com os vetores contendo as sequências de interesse utilizando o reagente lipídico catiônico Lipofectamina (Lipofectamine2000<sup>®</sup> - Invitrogen) como se segue: foram adicionados 20 µg de DNA juntamente com 60 µl de Lipofectamina em 3 ml de DMEM sem soro e sem antibióticos. A mistura foi deixada por 20 minutos à temperatura ambiente para a formação dos complexos DNA-reagente e, após o período de incubação, foi adicionada à placa contendo as células em 15 ml de DMEM sem soro e sem antibióticos, sendo deixada por um período de 4 horas à 37°C. Após esse período, o meio foi removido e trocado por DMEM suplementado com soro e com antibiótico como descrito acima. Células transientemente transfectadas foram utilizadas 48-72h após a aplicação deste protocolo e células transfectadas estavelmente foram selecionadas com G418 (Geneticin<sup>®</sup> - Gibco, como descrito em cada protocolo a seguir).

*Ensaio de fosforilação do receptor*

Os ensaios de fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina ou oximetazolina foram realizados no Instituto de Fisiologia Celular da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM) sob a supervisão do Prof. Dr. J.Adolfo

García-Sáinz e da Dr<sup>a</sup> Rocío Alcántara-Hernández seguindo protocolo descrito anteriormente (Alcantara-Hernandez *et al.*, 2005).

Células HEK293 estavelmente transfectadas com o vetor pcDNA1.1/Amp contendo a sequência codificadora do dominante negativo da GRK2 (K220M, GRK2DN, gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Lázari – UNIFESP) foram selecionadas com 400 µg/ml do antibiótico G418 (Geneticin<sup>®</sup> - Gibco).

As células HEK293 ou GRK2DN foram transfectadas de forma transiente com os vetores pEGFP-N3 contendo a sequência codificadora dos  $\alpha_{1A}$ -ARs fundidos à proteína fluorescente verde GFP na porção C-terminal (20 µg DNA/placa) e, 24 horas após a transfecção, foram transferidas para placas de 6 poços e deixados *overnight* para aderência. Poços confluentes foram mantidos em 1 ml de DMEM sem fosfato contendo [<sup>32</sup>P]Pi (100 µCi/ml) a 37°C por 3 horas. As células foram então estimuladas com os agonistas, lavadas 2 vezes com 1 ml de PBS (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 154 mM, pH 7.4) gelado e solubilizadas em tampão gelado contendo 1% Triton X-100, 0,05% dodecil sulfato de sódio, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM β-glicerofosfato, 10 mM pirofosfato de sódio, 1 mM p-serina, 1mM p-treonina, 1 mM p-tirosina e inibidores de protease (leupeptina 20 mg/ml, fenilmetilsulfonil fluorido 100 mg/ml, bacitracina 500 mg/ml e inibidor de tripsina 50 mg/ml). As placas foram mantidas no gelo por 1 hora e então os extratos celulares foram centrifugados a 12.700g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram imunoprecipitados com 10 µl de soro de coelho imunizado contra GFP. Foram feitos ao menos três experimentos independentes para cada tratamento. A fosforilação do receptor foi detectada através do leitor de varredura Typhoon9400 (GE Healthcare) e quantificado através do software ImageJ 1.38x (National Institutes of Health - NIH, Estados Unidos).



Quantificação da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin em células intactas

Os ensaios foram realizados de acordo com protocolo descrito anteriormente (Leeb-Lundberg *et al.*, 1987), padronizado previamente para as condições do presente estudo. Nestes experimentos, as células HEK293 ou GRK2DN foram transientemente transfectadas com o vetor pDT contendo a sequência codificadora dos  $\alpha_{1A}$ -ARs (20  $\mu$ g DNA/placa) e 24 horas após a transfecção, as células foram colocadas em uma placa de 24 poços pré-tratados com poli-d-lisina (120.000 células/poço) e deixadas *overnight* para aderência.

Nos ensaios de saturação da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin, as células foram pré-tratadas com noradrenalina ou oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos à 37°C, lavadas 2 vezes com 1ml de PBS gelado e incubadas com diferentes concentrações de [<sup>3</sup>H]Prazosin (20-2000pM) à 4°C por um período mínimo de 8 horas. A ligação não-específica foi determinada na presença de fentolamina 100  $\mu$ M. As curvas de saturação foram analisadas por regressão não-linear utilizando o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) para a determinação da capacidade máxima de ligação ( $B_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de dissociação no equilíbrio do radioligante ( $K_D$ ).

Para os ensaios do curso temporal da internalização, as células foram tratadas com noradrenalina ou oximetazolina 10  $\mu$ M à 37°C por diferentes períodos de tempo (5 a 60 minutos). Em seguida os poços foram lavados 2 vezes com 1 ml de tampão PBS gelado. Após a lavagem, os poços foram incubados com 1 nM de [<sup>3</sup>H]Prazosin (80 Ci/mole, Amershan Biosciences) à 4°C por pelo menos 8 horas. A ligação não-específica foi determinada com a adição de 100  $\mu$ M de fentolamina.

Passado o período de incubação, os poços foram lavados 2 vezes com 500  $\mu$ l de PBS gelado contendo 0.1% de BSA (albumina sérica bovina) para a retirada do radioligante não incorporado e então as células foram ressuspensas por agitação em 500  $\mu$ l de água ultrapura. Em cada amostra foram adicionadas 4 ml de líquido de cintilação e a leitura realizada em um contador de cintilação TriCarb1900 (Packard). Para análise, as leituras foram normalizadas pela leitura dos respectivos controles sem pré-tratamento com os agonistas

A quantidade de proteína de cada amostra foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976) e os valores foram utilizados, nas curvas de saturação, para estimar a quantidade de receptores presentes nas preparações (fmol/mg de proteína).

#### *Microscopia confocal*

Os experimentos de microscopia confocal foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (INFAR/UNIFESP).

As células HEK293 transientemente transfectadas e expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs conjugado com GFP foram cultivadas em lamínulas de quartzo tratadas com poli-D-lisina. As imagens foram capturadas em tempo real por microscópio confocal (LSM510, Carl Zeiss) a cada 5 minutos a partir da incubação dos agonistas noradrenalina (10  $\mu$ M) e oximetazolina (10  $\mu$ M) até o tempo total de 30 minutos. Nos experimentos com o antagonista prazosin, o antagonista foi incubado na concentração de 10 nM, 30 minutos antes da adição do agonista oximetazolina. Todas as imagens foram feitas em imersão em óleo utilizando objetivas (Plan-Neofluar) em aumento de 40X. A excitação foi feita por laser de argônio e filtro HFT

em comprimentos de onda de 488nm e a emissão captada por filtro LP em comprimento de onda de 505nm.

A mensuração da fluorescência foi feita com o auxílio do software ImageJ 1.38x (National Institutes of Health - NIH, Estados Unidos). A fluorescência foi determinada como média de intensidade em áreas circulares selecionadas em regiões adjacentes à membrana plasmática.

### *Ensaio de acúmulo de $Ca^{2+}$ intracelular*

Células HEK293 estavelmente transfectadas com o vetor pDT contendo a sequência codificadora dos  $\alpha_{1A}$ -ARs foram selecionadas com 800  $\mu$ g/ml do antibiótico G418 (Geneticin<sup>®</sup> - Gibco).

Aproximadamente 24 horas antes do experimento, as células foram transferidas para placas de 96 poços (ViewPlate96, PerkinElmer; 30.000 células/poço) pré-tratadas com poli-d-lisina para aderência. Antes da incubação com o marcador fluorescente, as células foram incubadas com noradrenalina (10  $\mu$ M) ou oximetazolina (10  $\mu$ M) por 5 minutos e então lavadas com 150  $\mu$ l de solução DPBS (NaCl 8g/l; KCl 0.2g/l;  $KH_2PO_4$  0.2g/l;  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  2.16g/l) sem  $Ca^{2+}$  e sem  $Mg^{2+}$  (Gibco). Após o tratamento com os agonistas (protocolo de dessensibilização), as células foram incubadas com 100  $\mu$ l do indicador fluorescente de  $Ca^{2+}$  FLUO-4 NW (Invitrogen - preparado de acordo com instruções do fabricante) e 2.5 mM probenecid por 60 minutos a 37°C. Células carregadas com este indicador fluorescente de  $Ca^{2+}$  não requerem lavagem para remoção de excesso de indicador não incorporado. As placas foram então inseridas no leitor de microplacas Synergy 4 (BioTek Instruments Inc., Estados Unidos) e estimuladas com noradrenalina para

mensuração de fluorescência (excitação a 485 nm - filtro 485/20 nm e emissão a 525 nm - filtro 516/20 nm). Os dados foram coletados online em microcomputador pelo software Gen5 (BioTek Instruments Inc., Estados Unidos) e expressados na forma da razão:

$$(F-F_0)/F_0$$

onde F é fluorescência máxima e  $F_0$  a fluorescência mínima detectada.

Para os ensaios utilizando o marcador FURA2-AM, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (aproximadamente  $10^6$  células/poço) e deixadas *overnight* para aderência. Após a aderência, o meio foi removido e trocado por solução de Krebs-Ringer (NaCl 120 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM;  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM; KCl 4.75 mM; glicose 10 mM; HEPES 20 mM); as células foram então incubadas com Fura-2 ( $5 \mu\text{M}$ ) por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , sendo que nos últimos 5 minutos de incubação, foram adicionados veículo ou oximetazolina  $10 \mu\text{M}$  nos poços. Após esse período, as células foram rapidamente ressuspensas com solução de Tripsina/EDTA 0.01% e lavadas 2 vezes com 4 ml de solução de Krebs-Ringer para a retirada do excesso do fluoróforo. As células então foram ressuspensas em 2 ml de solução de Krebs-Ringer (suplementada com  $\text{CaCl}_2$  1.2 mM) e a fluorescência foi lida em espectrômetro Aminco-Bowman Series 2 com monocromador de excitação a 340 e 380nm e monocromador de emissão a 510nm.

*Ensaio de formação de IP<sub>3</sub> utilizando fluorescência polarizada*

O acúmulo de IP<sub>3</sub> foi mensurado por fluorescência polarizada utilizando-se o kit HitHunter (DiscoverX). Foram construídas curvas-padrão de IP<sub>3</sub> fluorescente utilizando concentrações que variaram de 0.0677 a 1330 nM, obtidas através da diluição do estoque padrão fornecida pelo fabricante. As curvas-padrão foram utilizadas para quantificar a formação de IP<sub>3</sub> nas células estimuladas com agonistas.

Para a curva padrão, foram colocados em cada poço de uma placa de 96 poços (OptiPlate-96F, PerkinElmer) 20 µl do IP<sub>3</sub> fluorescente (IP<sub>3</sub> Tracer Green), 10 µl de água destilada e 10 µl de ácido perclórico 0.2 nM seguidos da agitação da microplaca por 5 minutos a uma velocidade de 600 rpm. A seguir foram adicionados a cada poço 20 µl do IP<sub>3</sub> fluorescente, seguida de nova agitação da microplaca por 5 minutos a 600 rpm. Por último, foram adicionados a cada poço 40 µl da proteína ligadora (Binding Protein), seguida de nova agitação por 5 minutos a 600 rpm. Foram considerados como “brancos” os poços onde foram incubados somente a água, o tampão utilizado na diluição do IP<sub>3</sub> padrão, o ácido perclórico e a proteína ligadora.

Para o protocolo de dessensibilização, as células foram pré-tratadas com noradrenalina (10 µM) ou oximetazolina (10 µM) nas próprias placas de cultivo (100X20mm) por 5 minutos. Após o pré-tratamento, as células foram destacadas com solução PBS+EDTA 2%, centrifugadas e ressuspensas em solução DPBS sem Ca<sup>2+</sup> e sem Mg<sup>2+</sup> (Gibco) para o ensaio.

Para a construção das curvas concentração-resposta foram colocados em cada poço 20 µl de células (40.000 células/poço). As células então foram estimuladas com noradrenalina (0.1 nM – 100 µM) por 10 segundos e a reação foi

terminada com a adição de 10 µl de ácido perclórico 0.2 nM, seguida da agitação da microplaca por 5 minutos a 600 rpm. A seguir foram adicionados a cada poço 20 µl do IP<sub>3</sub> fluorescente, seguida de nova agitação da microplaca por 5 minutos a 600 rpm. Por último, foram adicionados a cada poço 40 µl da proteína ligadora (Binding Protein), seguida de nova agitação por 5 minutos a 600 rpm.

Após a última agitação a placa foi inserida no leitor de microplacas Synergy 4 (BioTek Instruments Inc., Estados Unidos) para mensuração de fluorescência polarizada após excitação a 485 nm (filtro 485/20 nm) e emissão 530 nm (filtro 528/20 nm) com a utilização de um espelho dicróico. Os dados da curva padrão foram coletados online em microcomputador e analisados pelo software Gen5 (BioTek Instruments Inc., Estados Unidos) sendo expressos como:

$$mP = 1000 \times \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}(G)}{I_{\parallel} + I_{\perp}(G)}$$

onde:

- $I_{\parallel}$ : intensidade de fluorescência paralela
- $I_{\perp}$ : intensidade de fluorescência perpendicular
- $G$ : fator de correção específico para cada fluoróforo e equipamento utilizado.

Os dados da estimulação com noradrenalina são apresentados em concentração molar, obtidos após a interpolação dos dados em milipolarizações (mP) na curva padrão.

*Análise estatística*

Os dados foram analisados através de teste *t* de Student para comparações simples ou análise de variância (ANOVA) seguida de teste *a posteriori* de Dunnett para comparações múltiplas. Foram consideradas significantes diferenças com  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### *Taquifilaxia induzida pela oximetazolina*

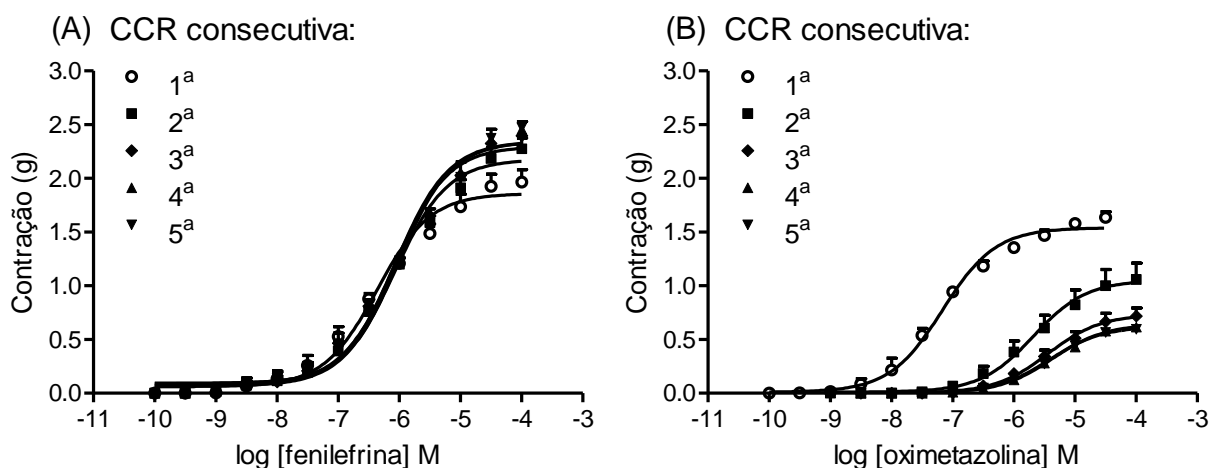
As Figuras 5 e 6 mostram curvas concentração-resposta de fenilefrina e oximetazolina construídas pelo método cumulativo em porções distais da artéria caudal de rato.

Na contração da artéria caudal de rato, a oximetazolina comportou-se como um agonista parcial em relação à fenilefrina (Figura 5 e Tabela 1). Houve intensa taquifilaxia nas contrações induzidas pela oximetazolina, como indicado pelas reduções de potência ( $pEC_{50}$ ) e de eficácia ( $E_{máx}$ ) nas curvas concentração-resposta consecutivas (Figura 5B, Tabela 1). No entanto, não houve taquifilaxia nas contrações induzidas pela fenilefrina na artéria caudal de ratos, uma vez que a potência e a eficácia deste agonista não diferiram entre as curvas concentração-resposta consecutivas (Figura 5A, Tabela 1).

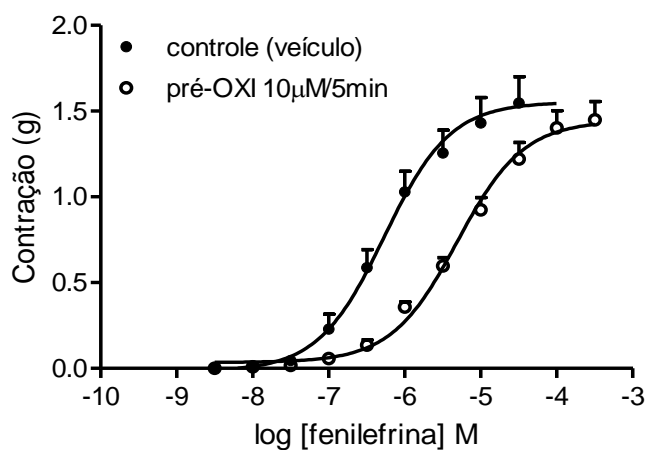
Para checar se a oximetazolina induz taquifilaxia nas contrações induzidas pela fenilefrina, um agonista mais eficaz, a artéria caudal foi tratada com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos, e então uma curva-concentração-resposta para a fenilefrina foi construída. A fenilefrina foi cerca de dez vezes menos potente na artéria caudal que foi previamente tratada com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos do que na respectiva artéria controle tratada apenas com veículo (Figura 6 e Tabela 2).

Estes resultados mostram que a oximetazolina, mas não a fenilefrina, induz taquifilaxia nas contrações da artéria caudal de ratos.





**Figura 5.** Curvas concentração-resposta consecutivas na porção distal da artéria caudal de rato para a fenilefrina (A) e oximetazolina (B). Cada símbolo representa a média e a barra vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 experimentos.



**Figura 6.** Curvas concentração-resposta de fenilefrina em artéria caudal de rato tratadas com veículo ( $\text{qH}_2\text{O}$ ) ou com oximetazolina  $10 \mu\text{M}$  por 5 minutos. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 6 experimentos.

**Tabela 1.** Valores de  $pEC_{50}$  e efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ , em gramas de tens\~ao) das curvas concentra\~ao-resposta consecutivas dos agonistas fenilefrina e oximetazolina constru\~idas em segmentos distais de art\~eria caudal de rato.

	Fenilefrina		Oximetazolina	
	$pEC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (g)	$pEC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (g)
1 <sup>a</sup> Curva	6.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	7.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1
2 <sup>a</sup> Curva	6.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	5.7 ± 0.1 <sup>**</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>*</sup>
3 <sup>a</sup> Curva	6.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 <sup>*</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>**</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>**</sup>
4 <sup>a</sup> Curva	6.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 <sup>*</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>**</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>**</sup>
5 <sup>a</sup> Curva	6.0 ± 0.1 <sup>*</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>*</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>**</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>**</sup>

\* $p < 0.05$  ou \*\* $p < 0.01$  do respectivo par\~ametro em rela\~ao \~a 1<sup>a</sup> curva; ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett

**Tabela 2.** Valores de  $pEC_{50}$  e efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ , em gramas de tens\~ao) das curvas concentra\~ao-resposta ao agonista fenilefrina controle e ap\~os o pr\~e-tratamento com oximetazolina (OXI) 10  $\mu$ M por 5 minutos.

	Fenilefrina (art\~eria caudal)	
	$pEC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (g)
Controle (ve\~iculo)	6.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Ap\~os oximetazolina 10 $\mu$ M/5 min	5.3 ± 0.1 <sup>**</sup>	1.4 ± 0.1

\*\* $p < 0.01$  do respectivo par\~ametro em rela\~ao \~a curva "controle"; teste "t" de Student

Dessensibilização de  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes

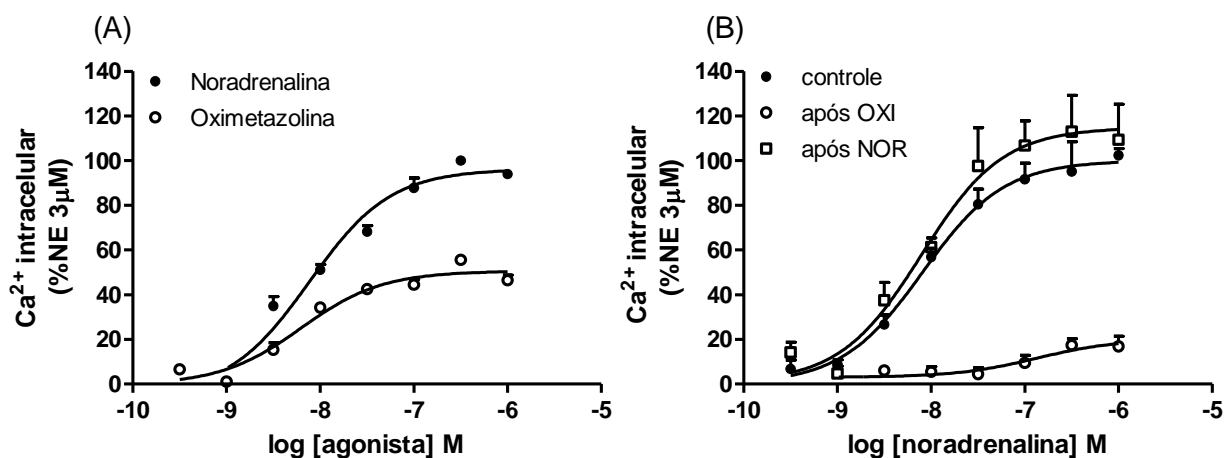
A Figura 7 mostra curvas concentração-resposta de mobilização de cálcio intracelular induzida pelos agonistas nas células HEK293 expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes. Nos experimentos de mobilização de cálcio intracelular a oximetazolina se comportou como um agonista potente, porém de baixa eficácia (aproximadamente 50% do efeito máximo induzido pela noradrenalina, Figura 7A, Tabela 3).

O pré-tratamento das células com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos reduziu a mobilização de cálcio intracelular induzida pela noradrenalina (Figura 7B, Tabela 4); em contrapartida, o pré-tratamento com noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos não alterou a potência ou eficácia da noradrenalina (Figura 7B, Tabela 4).

A Figura 8 mostra curvas concentração-resposta de acúmulo de IP<sub>3</sub> em células HEK293 expressando receptores  $\alpha_{1A}$  humanos recombinantes.

O pré-tratamento das células com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos reduziu o acúmulo de IP<sub>3</sub> induzido pela noradrenalina (Figura 8, Tabela 5), enquanto que o pré-tratamento com noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos aumentou a potência da noradrenalina (Figura 8, Tabela 5).

Estes resultados mostram que a oximetazolina, mas não a noradrenalina, induz taquifilaxia na mobilização de cálcio intracelular e no acúmulo de IP<sub>3</sub> em células HEK293 expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes.



**Figura 7.** (A) Curvas concentração-resposta de mobilização de cálcio intracelular induzida por noradrenalina e oximetazolina; (B) Curvas concentração-resposta de mobilização de cálcio intracelular induzida pela noradrenalina em células HEK293 tratadas com veículo (●, controle), noradrenalina 10 μM por 5 minutos (□) ou oximetazolina 10 μM por 5 minutos (○). Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que os símbolos, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos

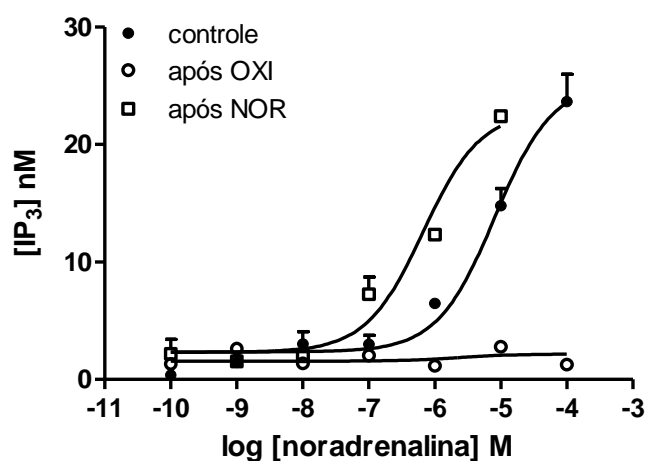
**Tabela 3.** Valores de  $pEC_{50}$  e efeito máximo ( $E_{máx}$ , em % da noradrenalina 3 μM) das curvas concentração-resposta de acúmulo de cálcio intracelular induzido pelos agonistas noradrenalina e oximetazolina.

	Noradrenalina	Oximetazolina
$pEC_{50}$	$8.1 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.1$
$E_{máx}$ (%)	$100.0 \pm 4.3$	$49.7 \pm 1.5$

**Tabela 4.** Valores de  $pEC_{50}$  e efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ , em % da noradrenalina 3  $\mu$ M utilizada como controle) das curvas concentração-resposta de mobilização de cálcio intracelular induzido pela noradrenalina em células HEK293 tratadas com veículo (controle), noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos ou oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos.

	Noradrenalina	
	$pEC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (%)
Controle (veículo)	$8.1 \pm 0.1$	$100.0 \pm 4.3$
Após noradrenalina 10 $\mu$ M/5 min	$8.1 \pm 0.1$	$114.8 \pm 6.9$
Após oximetazolina 10 $\mu$ M/5 min	$6.8 \pm 0.1^{**}$	$20.2 \pm 4.4^{**}$

$^{**}p < 0.01$  do respectivo parâmetro em relação à curva controle; ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett



**Figura 8.** Curvas concentração-resposta de formação de  $IP_3$  induzida pela noradrenalina controle (●) e após pré-tratamento com noradrenalina (NOR) 10  $\mu$ M por 5 minutos (□) ou oximetazolina (OXI) 10  $\mu$ M por 5 minutos (○). Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que os símbolos, o erro padrão da média de 2 a 4 experimentos

**Tabela 5.** Valores de  $pEC_{50}$  e efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ , nM) das curvas concentração-resposta de acúmulo de  $IP_3$  induzido pela noradrenalina em células HEK293 tratadas com veículo (controle), noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos ou oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos.

	Noradrenalina	
	$pEC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (nM)
Controle	$5.1 \pm 0.1$	$25.2 \pm 1.9$
Após NOR	$6.1 \pm 0.2^*$	$22.9 \pm 2.4$
Após OXI	n.d	n.d

\* $p < 0.05$  do respectivo parâmetro em relação à curva controle; teste "t" de Student

Internalização de de  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes

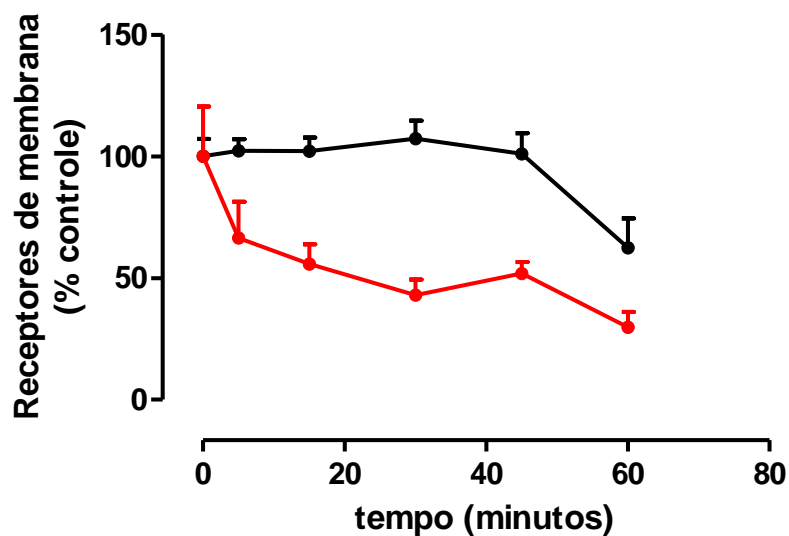
A ligação específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin em células HEK293 intactas expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes foi determinada a 4°C para quantificar receptores na superfície celular.

A Figura 9 mostra o curso temporal dos efeitos do tratamento das células HEK293 com noradrenalina ou oximetazolina na expressão de  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes na superfície celular. O tratamento das células HEK293 com noradrenalina 10  $\mu$ M reduziu a ligação específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin em aproximadamente 40% apenas após 60 minutos de estimulação; por outro lado, o tratamento das células com oximetazolina 10  $\mu$ M reduziu a ligação específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin em aproximadamente 40% já aos 5 minutos de estimulação chegando a 80% após 60 minutos (Figura 9).

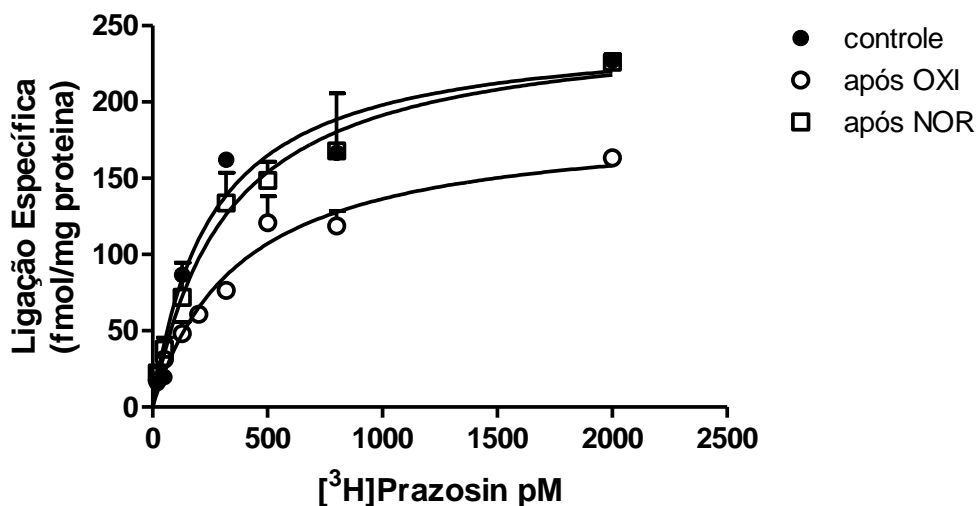
Para checar se a redução da ligação específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin à superfície das células HEK293 foi devida a lavagem incompleta dos agonistas, foram feitas curvas de saturação da ligação específica do radioligante [ $^3$ H]Prazosin em células tratadas com veículo, noradrenalina (10  $\mu$ M por 5 minutos) ou oximetazolina (10  $\mu$ M por 5 minutos). O pré-tratamento com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos diminuiu a capacidade máxima de ligação ( $B_{m\acute{a}x}$ ) do [ $^3$ H]Prazosin, sem alterar o valor de  $K_D$  (Figura 10, Tabela 6), enquanto que o pré-tratamento com noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos não alterou nem a ligação específica nem o valor de  $K_D$  (Figura 10, Tabela 6). Estes resultados indicam que a perda de ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin não é devida à “competição” resultante de lavagem incompleta da oximetazolina.

Os efeitos da noradrenalina e da oximetazolina e na localização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes foram adicionalmente investigados por microscopia confocal de células HEK293 expressando os receptores conjugados à proteína fluorescente verde (GFP) na porção carboxi-terminal. As imagens feitas em tempo real mostram a rápida internalização dos receptores ativados pela oximetazolina (10  $\mu$ M), mas não pela noradrenalina, e também mostram que o antagonista seletivo de  $\alpha_1$ -ARs prazosin (10 nM) inibe a internalização (Figuras 11 e 12).





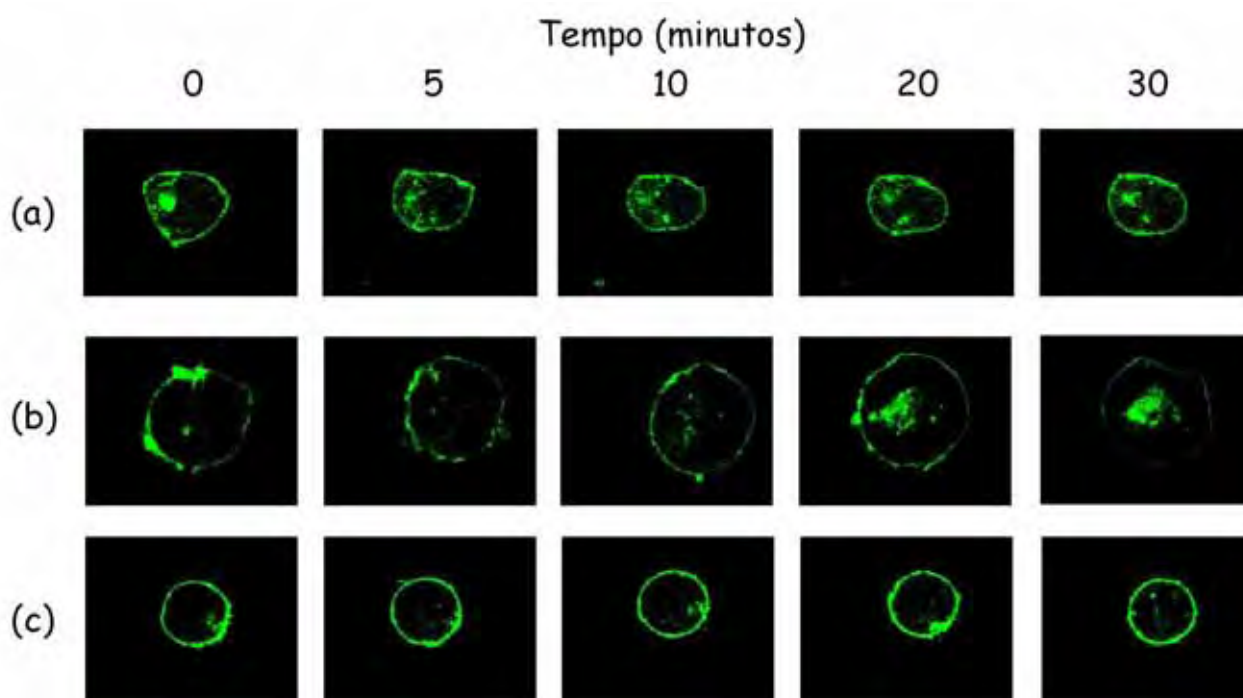
**Figura 9.** Curso temporal dos efeitos da noradrenalina 10  $\mu$ M (preto) e oximetazolina 10  $\mu$ M (vermelho) sobre os  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes na superfície de células HEK293 quantificados pela ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.



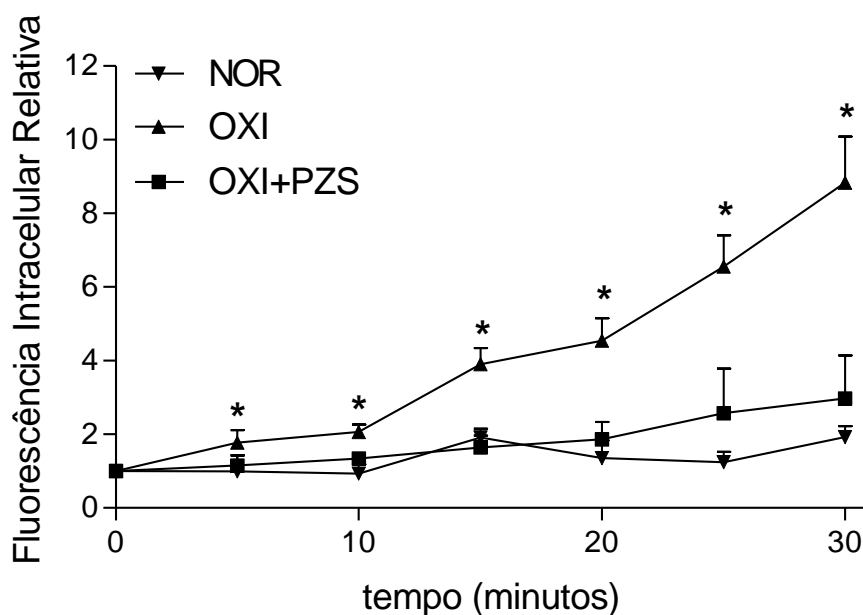
**Figura 10.** Curvas de saturação da ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin em células HEK293 tratadas com veículo (controle), noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos ou oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

**Tabela 5.** Valores de ligação máxima ( $B_{\text{máx}}$ ) e constante de dissociação ( $K_D$ ) do radioligante [ $^3\text{H}$ ]Prazosin calculadas a partir das curvas de saturação controle e após o pré-tratamento com noradrenalina ou oximetazolina  $10\ \mu\text{M}$  por 5 minutos

	$K_D$ (pM)	$B_{\text{máx}}$ (fmol/mg proteína)
Controle	$252.2 \pm 84.0$	$247.9 \pm 25.8$
Após NOR	$321.6 \pm 86.0$	$252.8 \pm 23.3$
Após OXI	$379.4 \pm 85.0$	$188.2 \pm 17.9$



**Figura 11.** Imagens em tempo-real de microscopia confocal ilustrando células expressando os  $\alpha_{1A}$ -ARs conjugados à proteína fluorescente verde GFP e incubadas com noradrenalina ( $10\ \mu\text{M}$ ) (a), oximetazolina ( $10\ \mu\text{M}$ ) (b) e oximetazolina ( $10\ \mu\text{M}$ ) após incubação prévia de prazosin ( $10\ \text{nM}$ ) (c).



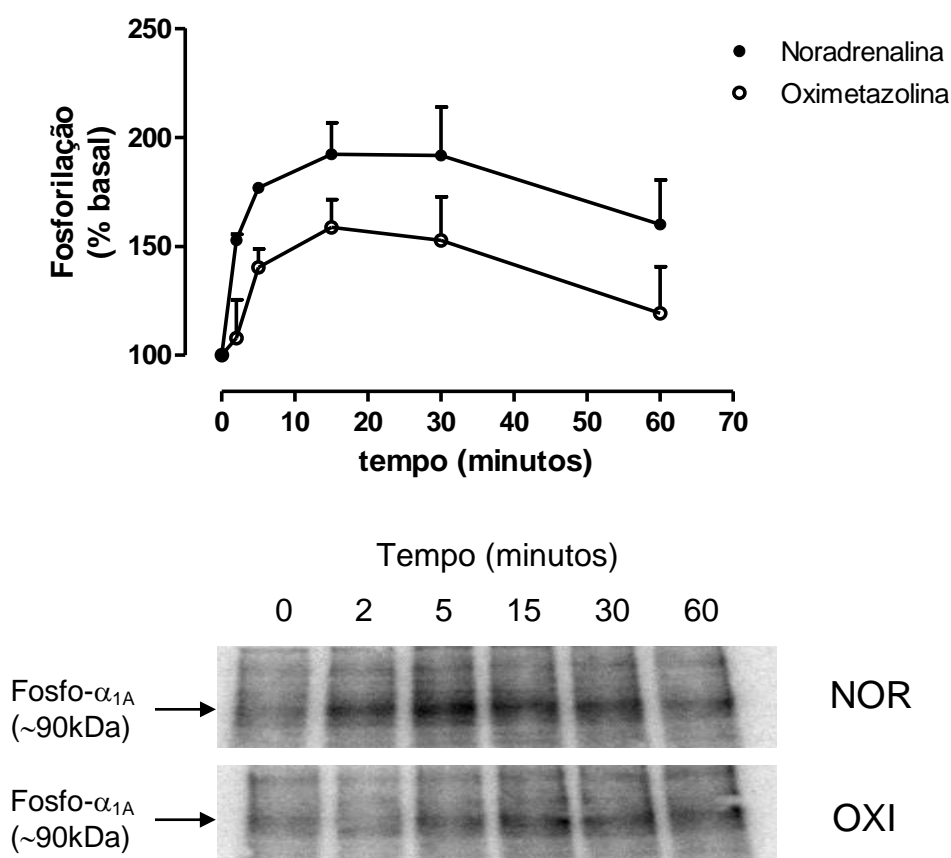
**Figura 12.** Fluorescência intracelular relativa mensurada em células após a incubação com noradrenalina 10  $\mu$ M ( $\blacktriangledown$ , n=4), oximetazolina 10  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ , n=4) e oximetazolina 10  $\mu$ M após a incubação prévia com prazosin 10 nM ( $\blacksquare$ , n=3). \*  $p < 0.05$ , teste “t” pareado em relação à fluorescência mensurada no tempo zero.

### Fosforilação de $\alpha_{1A}$ -ARs

A Figura 13 mostra autoradiografias dos  $\alpha_{1A}$ -ARs fosforilados e imunoprecipitados de células HEK293 pré-marcadas com [ $^{32}$ P] e tratadas com os agonistas pelos diferentes períodos de tempo, como indicado.

Ambos os agonistas noradrenalina e oximetazolina foram capazes de induzir fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs conjugados com GFP (Figura 13). O aumento da fosforilação induzida pela noradrenalina (10  $\mu$ M) foi máximo com 15 minutos de estimulação, dobrando o sinal de fosforilação em relação ao sinal basal (Figura 13). No entanto, apesar do aumento da fosforilação dos receptores ativados pela

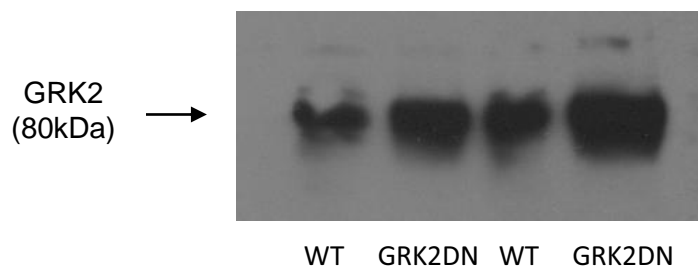
oximetazolina (10  $\mu$ M) também ter atingido seu máximo com 15 minutos de estimulação, a fosforilação aumentou aproximadamente 60% em relação ao sinal basal (Figura 13).



**Figura 13.** *Acima:* Fosforilação induzida pelos agonistas noradrenalina (NOR, ●) e oximetazolina (OXI, ○) 10  $\mu$ M. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 3 experimentos. *Abaixo:* autorradiografias ilustrativas do  $\alpha_{1A}$ -AR fosforilado, imunoprecipitado das células pré-marcadas com [ $^{32}$ P] e estimuladas com os agonistas nos períodos de tempo indicados.

Envolvimento da PKC e da GRK2 na fosforilação de  $\alpha_{1A}$ -ARs induzida pela Noradrenalina e pela Oximetazolina

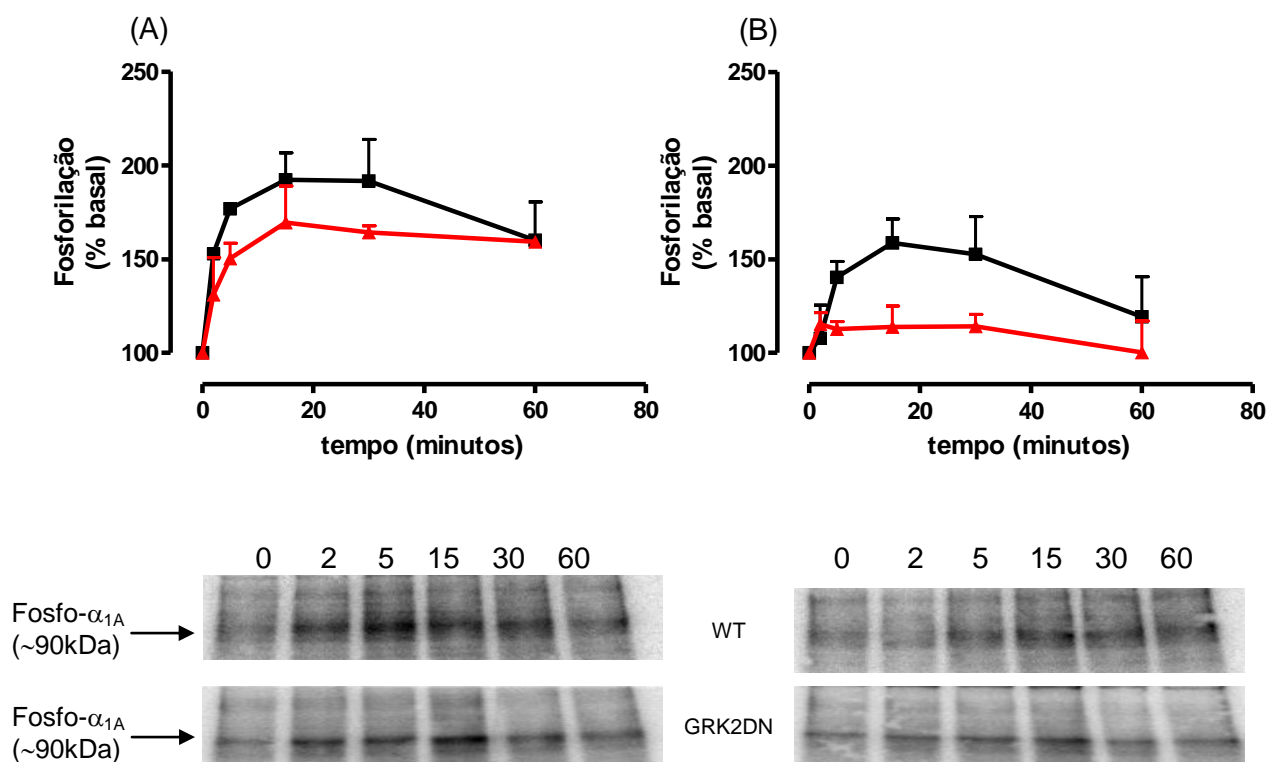
A Figura 14 mostra um gel representativo de um Western Blot feito com anticorpo anti-GRK2 em extratos de células HEK293WT e em células expressando a forma dominante negativa da GRK2 (K220M, GRK2DN). As bandas imunoreativas encontradas em extratos de células transfectadas com o GRK2DN foram mais intensas que aquelas encontradas em extratos de células não transfectadas (HEK293WT).



**Figura 14.** Western Blot de extratos de células HEK293WT (WT) ou expressando a forma dominante negativa da GRK2 (GRK2DN).

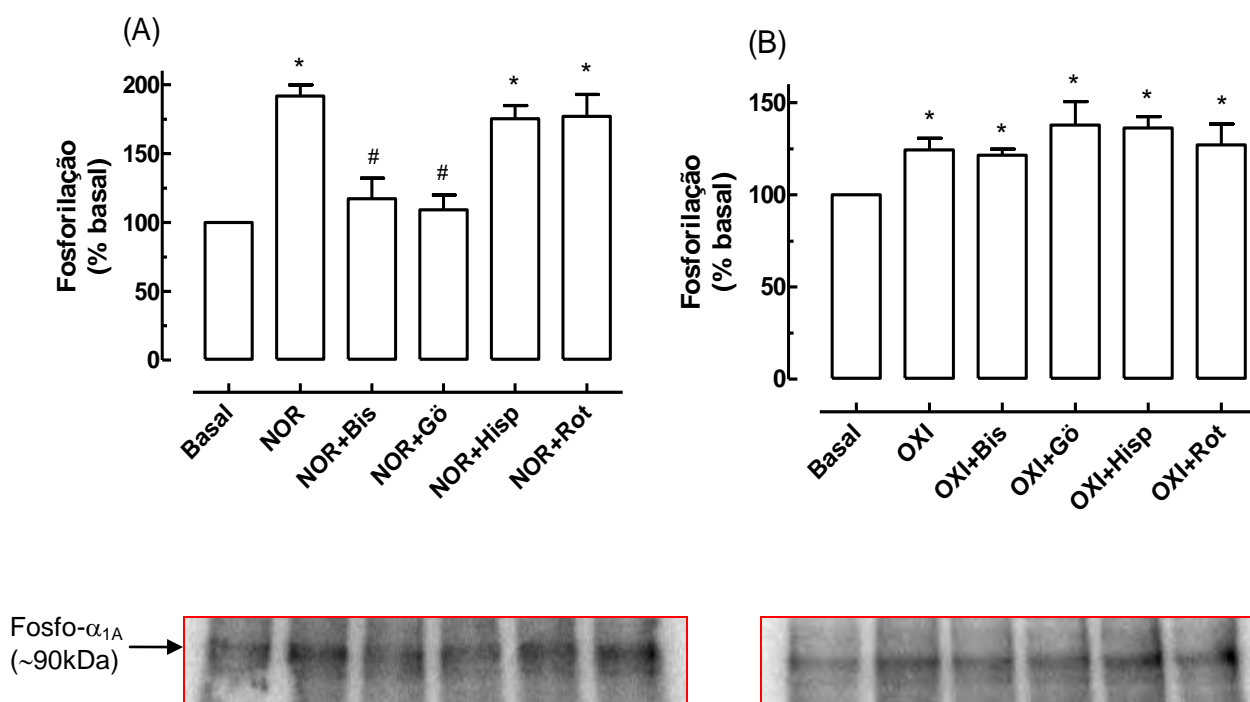
A Figura 15 mostra a quantificação da fosforilação induzida pela noradrenalina ou pela oximetazolina (10  $\mu$ M) após diferentes períodos de estimulação de células HEK293WT ou GRK2DN expressando o  $\alpha_{1A}$ -ARs.

Em células expressando a GRK2DN, a fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina (10  $\mu$ M) foi pouco diferente daquela encontrada em células HEK293WT (Figura 15A). Em contraste, os  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina (10  $\mu$ M) foram pouco fosforilados em células expressando a GRK2DN (Figura 15B).



**Figura 15.** *Acima:* Curso temporal da fosforilação de  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina (A) e oximetazolina (B) 10  $\mu$ M em células HEK293WT (WT) ou expressando a dominante negativa da GRK2 (GRK2DN). Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores que o símbolo, o erro padrão da média de 3 experimentos. *Abaixo:* autoradiografias representativas do  $\alpha_{1A}$ -AR fosforilado, imunoprecipitado de células WT ou GRK2DN.

A Figura 16 apresenta a quantificação da fosforilação induzida pela noradrenalina ou pela oximetazolina (10  $\mu\text{M}$ ) na ausência ou presença de diferentes inibidores de PKC. Os  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina (10  $\mu\text{M}$ ) foram menos fosforilados quando as células foram previamente incubadas com os inibidores de PKC bisindolilmaleimida I (1  $\mu\text{M}$ , inibidor de isoformas convencionais de PKC) e Gö6976 (0.1  $\mu\text{M}$ , inibidor de PKC $\alpha$  e  $\beta$ ) (Figura 16). No entanto, os inibidores hispidina (1  $\mu\text{M}$ , inibidor de PKC $\beta$ ) e rottlerina (1  $\mu\text{M}$ , inibidor de PKC $\delta$ ) não alteraram a fosforilação induzida pela noradrenalina (Figura 16). Já a pequena fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina não foi afetada por nenhum dos inibidores de PKC investigados.

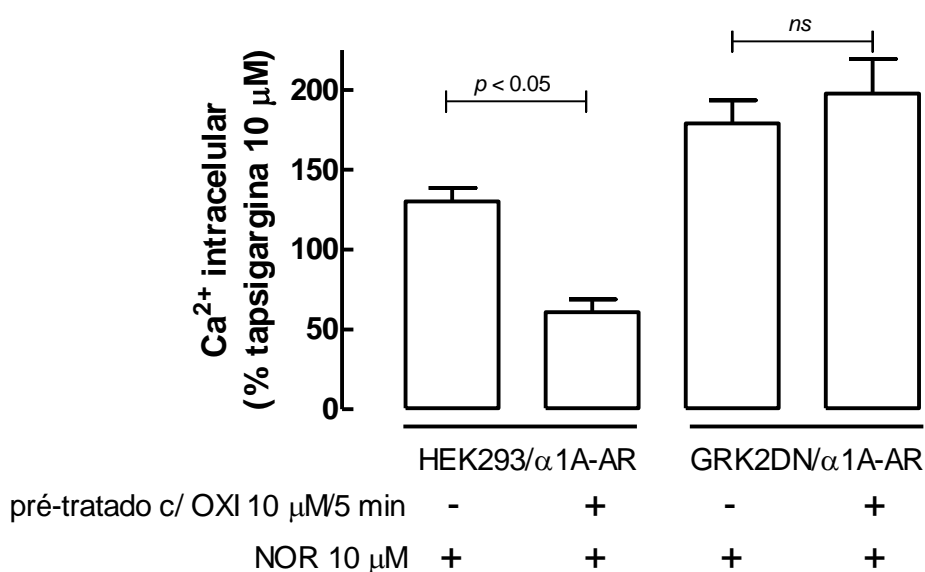


**Figura 16.** Fosforilação induzida pela noradrenalina (A) ou oximetazolina (B) 10  $\mu\text{M}$  por 15 minutos na ausência ou presença dos inibidores de PKC bisindolilmaleimida (Bis, 1  $\mu\text{M}$ ), Gö6976 (Go, 0.1  $\mu\text{M}$ ), hispidina (Hisp, 1  $\mu\text{M}$ ) e rottlerina (Rot, 1  $\mu\text{M}$ ). As colunas representam a média e as barras, quando maiores do que a coluna, o erro padrão da média de 3 a 4 experimentos. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett: \* $p < 0.05$  em relação ao sinal basal e # $p < 0.05$  em relação ao sinal mensurado após o estímulo do respectivo agonista na ausência dos inibidores.

Papel da GRK2 na dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs induzidas pela oximetazolina

A Figura 17 mostra a mobilização de cálcio intracelular induzida pela noradrenalina (10  $\mu$ M) em células HEK293WT e GRK2DN, pré-tratadas ou não com oximetazolina (10  $\mu$ M/5 minutos).

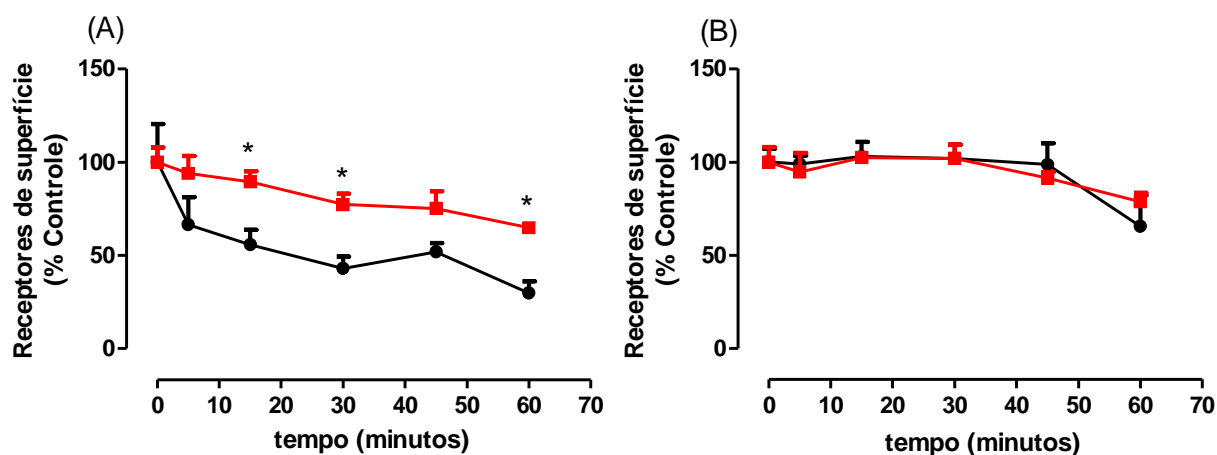
Houve redução da mobilização de cálcio intracelular induzida pela noradrenalina (10  $\mu$ M) em células HEK293WT pré-tratadas com oximetazolina; no entanto, o pré-tratamento de células expressando a GRK2DN com oximetazolina não alterou a mobilização de cálcio intracelular induzida pela noradrenalina (10  $\mu$ M).



**Figura 17.** Aumento de cálcio intracelular induzido por noradrenalina 10  $\mu$ M em células HEK293WT ou expressando a GRK2DN, controle ou após pré-tratamento com oximetazolina (OXI) 10  $\mu$ M por 5 minutos. As colunas representam a média e as barras, quando maiores do que a coluna, o erro padrão da média de 3 experimentos.  $p < 0.05$ , teste “t” de Student em relação ao respectivo controle sem o pré-tratamento com oximetazolina.



A Figura 18 mostra a internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina ou oximetazolina em células expressando a GRK2DN; para comparação, também é mostrada a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs em células HEK293WT. Em células expressando a GRK2DN, a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina foi intensamente reduzida, enquanto que a internalização dos receptores ativados pela noradrenalina foi pouco afetada.

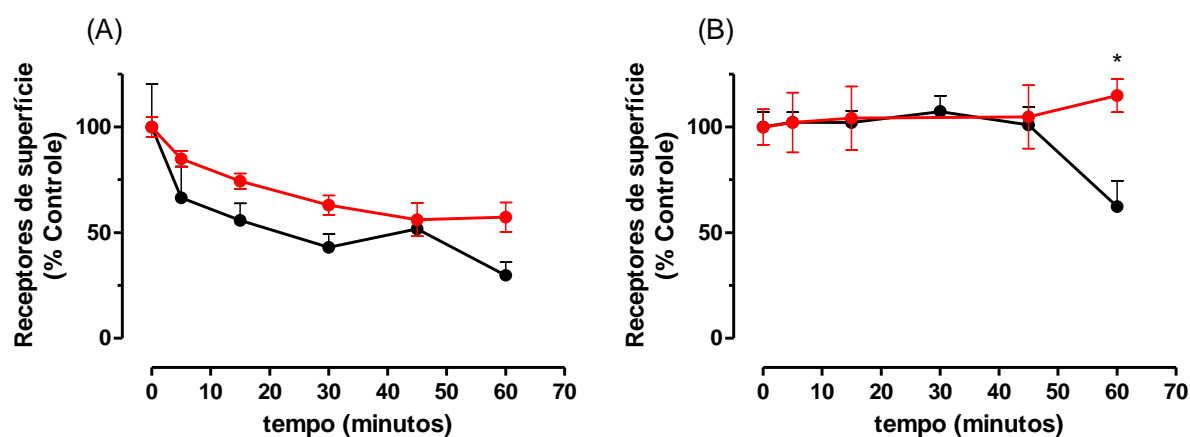


**Figura 18.** Curso temporal dos efeitos da noradrenalina 10  $\mu$ M (A) e oximetazolina 10  $\mu$ M (B) sobre os  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes na superfície de células HEK293WT (preto) e GRK2DN (vermelho) quantificados pela ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

Participação da PKC na internalização tardia de  $\alpha_{1A}$ -ARs induzidas pela noradrenalina

A Figura 19 mostra o curso temporal dos efeitos da noradrenalina ou oximetazolina na expressão de  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes na superfície de células HEK293 na presença do inibidor de PKC staurosporina; para comparação, também é mostrada a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs em células HEK293WT.

A internalização tardia dos  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes ativados pela noradrenalina foi inibida pela staurosporina (Figura 19B), enquanto que este inibidor de PKC não afetou a internalização de receptores ativados pela oximetazolina (Figura 19A).



**Figura 19.** Curso temporal dos efeitos da noradrenalina 10  $\mu$ M (A) e oximetazolina 10  $\mu$ M (B) sobre os  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes na superfície de células HEK293WT na ausência (preto) e presença (vermelho) de staurosporina (100 nM) quantificados pela ligação específica do [ $^3$ H]Prazosin. Os símbolos representam a média e as barras, quando maiores do que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

## Discussão

A presente tese investigou os processos de fosforilação, dessensibilização e internalização de  $\alpha_{1A}$ -ARs. ativados pela noradrenalina e oximetazolina.

É sabido que a oximetazolina induz taquifilaxia nas contrações do ducto deferente de rato em resposta à ativação de  $\alpha_{1A}$ -ARs (Akinaga, 2008; Rice *et al.*, 1991; Ruffolo *et al.*, 1977). No presente estudo foi observado que a oximetazolina também induz taquifilaxia nas contrações da artéria caudal de rato, outro tecido cujas contrações em resposta a agonistas adrenérgicos resultam da ativação de  $\alpha_{1A}$ -ARs (Kamikihara *et al.*, 2005; Lachnit *et al.*, 1997).

Neste trabalho, os mecanismos moleculares envolvidos na taquifilaxia induzida pela oximetazolina foram investigados em  $\alpha_{1A}$ -ARs humanos recombinantes expressos em células HEK293. A necessidade da utilização desse sistema recombinante vem da falta de ferramentas experimentais tais como anticorpos e drogas suficientemente específicas que permitam o estudo destes mecanismos em receptores nativos de tecidos ou células animais.

Nesse sistema recombinante, o pré-tratamento das células HEK293 com oximetazolina 10  $\mu$ M por 5 minutos dessensibilizou os  $\alpha_{1A}$ -ARs, como indicado pela redução da potência e eficácia da noradrenalina em mobilizar cálcio intracelular e promover o acúmulo de IP<sub>3</sub>. Em contrapartida, o pré-tratamento das células com noradrenalina 10  $\mu$ M por 5 minutos não resultou em reduções da potência ou eficácia da noradrenalina na mobilização de cálcio intracelular e no acúmulo de IP<sub>3</sub>. Há poucos estudos descrevendo a dessensibilização de  $\alpha_{1A}$ -ARs, o que pode ser explicado pela maior resistência destes receptores a estes mecanismos de

regulação aguda de sua expressão, quando comparados aos  $\alpha_{1B}$ - e  $\alpha_{1D}$ -ARs. No entanto, é sabido que altas concentrações de noradrenalina induzem apenas modesta dessensibilização de  $\alpha_{1A}$ -ARs, mesmo após 30 minutos de pré-tratamento (Price *et al.*, 2002). Assim, a taquifilaxia/dessensibilização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina observada na presente tese mostra que este mecanismo de regulação aguda depende do tipo de agonista que interage com os  $\alpha_{1A}$ -ARs.

A microscopia confocal e os experimentos da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin em células intactas mostraram que a oximetazolina causou rápida internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs, observada já aos 5 minutos de estimulação, enquanto que a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina foi menor e observada apenas após 45 a 60 minutos de estimulação. Estes dados são semelhantes aos encontrados na literatura empregando técnicas variadas de localização de receptores que relatam internalização pequena e tardia dos  $\alpha_{1A}$ -ARs; no entanto, todos estes estudos empregaram agonistas da classe das feniletilaminas para ativar o receptor. Por exemplo, a microscopia confocal de células HEK293 expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs marcados com GFP na porção C-terminal mostrou que os receptores ativados pela fenilefrina internalizam apenas após 50 minutos de estimulação (Chalothorn *et al.*, 2002). De forma semelhante, em células HEK293 expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs marcados com epítipo da hemaglutinina (HA), a adrenalina induziu modesta internalização após 90 minutos de estimulação, enquanto que a precipitação de  $\alpha_{1A}$ -ARs de superfície celular marcados com biotina não revelou internalização significativa (Stanasila *et al.*, 2008). Ensaios da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Prazosin em fibroblastos rat-1 intactos expressando  $\alpha_{1A}$ -ARs marcados com epítipo da hemaglutinina (HA) (Price *et al.*, 2002) e citometria de fluxo para

localização dos receptores (Morris *et al.*, 2004) também confirmam que os  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina internalizam após cerca de 30 a 50 minutos de estimulação. Portanto, os resultados da presente tese com a oximetazolina mostram que a velocidade e a intensidade da internalização dependem da natureza do agonista que ativa o  $\alpha_{1A}$ -AR.

A imunoprecipitação dos  $\alpha_{1A}$ -AR fosforilados mostrou que os receptores ativados pela noradrenalina foram mais fosforilados do que aqueles ativados pela oximetazolina. Entretanto, a quinase envolvida na fosforilação do  $\alpha_{1A}$ -AR dependeu do agonista que ativou o receptor. A dessensibilização e fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR expostos à oximetazolina em células expressando um mutante dominante negativo da GRK2 foram drasticamente reduzidas, enquanto que a fosforilação dos receptores ativados pela noradrenalina foi pouco afetada. De forma recíproca, a inibição da PKC virtualmente aboliu a fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina, mas não teve efeitos claros na pequena fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina. O envolvimento da PKC na fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR já é bem conhecido (Price *et al.*, 2002; Vazquez-Prado *et al.*, 1996; Vazquez-Prado *et al.*, 2000). No presente estudo, a fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR ativados pela noradrenalina foi inibida por bisindolilmaleimida I e Gö6976, mas não por hispidina e rottlerina, sugerindo que a PKC $\alpha$  é a principal isoforma envolvida. Entretanto, é importante mencionar que a seletividade da maioria dos inibidores de proteínas quinases tem sido questionada (Bain *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2000) e que é necessária cautela na definição do papel de uma quinase particular empregando tais inibidores. Há evidências indiretas do envolvimento da GRK2 na fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR em fibroblastos rat-1, uma vez que a superexpressão de GRK2, mas não de GRK6,

reduziu o acúmulo de inositol fosfato em resposta à noradrenalina (Price *et al.*, 2002). Porém, a superexpressão de GRK2 em células HEK293 não afetou a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela adrenalina (Stanasila *et al.*, 2008).

É interessante notar que a internalização modesta e tardia dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela noradrenalina foi inibida pela staurosporina, um inibidor de PKC, enquanto que a internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs ativados pela oximetazolina em células expressando o mutante dominante negativo da GRK2 foi menor e mais lenta do que nas células que não expressavam o dominante negativo. Estes resultados sugerem que, dependendo do agonista que ativa o  $\alpha_{1A}$ -AR, uma quinase específica é recrutada, o que poderia gerar padrões diferentes de fosforilação do receptor causando, por sua vez, interações com proteínas intracelulares específicas que poderiam levar a dessensibilização/internalização dos  $\alpha_{1A}$ -ARs.

Há alguns exemplos na literatura que dão suporte a esta fosforilação diferencial dirigida pelo tipo de agonista, tal como a observada na presente tese. É sabido que a morfina e o DAMGO, dois agonistas de receptores opióides, são capazes de induzir tolerância *in vivo* através da dessensibilização de receptores  $\mu$ -opióides. Porém, estes compostos induzem tolerância através de vias diferentes: enquanto que a morfina é um agonista parcial e induz dessensibilização dos receptores através de fosforilação via PKC sem subsequente internalização do receptor, o DAMGO é um agonista total e induz dessensibilização dos receptores através de fosforilação via GRK com posterior internalização dos receptores (Bailey *et al.*, 2009; Hull *et al.*, 2010). Um estudo recente mostrou que agonistas diferentes promovem fosforilação de aminoácidos distintos do receptor  $\mu$ -opióide, e que quinases diferentes estão envolvidas nesta fosforilação (Doll *et al.*, 2012).

Ainda são desconhecidos sítios específicos de fosforilação de cada uma dessas quinases no  $\alpha_{1A}$ -AR, porém há sequências consensuais RXX(S/T)X(R/K) de fosforilação para PKC (Pearce *et al.*, 2010) tanto na terceira alça intracelular como na porção C-terminal do receptor. A cauda C-terminal intracelular do  $\alpha_{1A}$ -AR parece ser importante para a fosforilação por PKC, visto que um mutante truncado do receptor tem a sua fosforilação reduzida à metade em relação a um receptor íntegro. Em contrapartida, a superexpressão de GRK2 em células HEK293 reduziu de forma semelhante o acúmulo máximo de fosfatos de inositol induzidos pela noradrenalina após a ativação de receptores íntegros e de mutantes truncados na porção C-terminal indicando que, possivelmente, o sítio de fosforilação para GRK2 não esteja localizada na porção C-terminal (Price *et al.*, 2002).

É possível que a oximetazolina e a noradrenalina promovam diferentes mudanças conformacionais no  $\alpha_{1A}$ -AR, induzindo assim, diferentes respostas intracelulares ainda que ativando o mesmo receptor. Dados na literatura suportam essa hipótese, uma vez que a ativação de receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub> pelos ligantes endógenos ATP ou UTP faz com que o receptor mude o recrutamento de arrestinas: após ativação com ATP há o recrutamento igual de  $\beta$ -arrestina1 e 2 e após ativação com UTP há o recrutamento preferencial de  $\beta$ -arrestina2 (Hoffmann *et al.*, 2008).

Recentemente, foi descrito que ligantes com diferentes eficácias induzem mudanças conformacionais em diferentes segmentos transmembranares do receptor (Deupi *et al.*, 2012). Essa observação também reforça a teoria de que oximetazolina e noradrenalina possam induzir diferentes conformações do receptor, uma vez que são ligantes de diferentes classes químicas, com diferentes eficácias e diferentes sítios de interação com o receptor.

Camundongos transgênicos que expressam um mutante constitutivamente ativo do  $\alpha_{1A}$ -AR, mas não do  $\alpha_{1B}$ -AR, tem expectativa de vida aumentada em cerca de 10%, como resultado de neuro- e cardioproteção (Perez *et al.*, 2011), ampliando as potenciais aplicações terapêuticas de drogas que interferem com a sinalização resultante da ativação destes dois receptores. Tal potencial terapêutico só poderá ser atingido com o conhecimento dos perfis de sinalização disparados por diferentes agonistas ao ativarem  $\alpha_{1A}$ -ARs.



## Conclusões

- a oximetazolina induz taquifilaxia nas contrações da artéria caudal de rato induzidas pela fenilefrina e pela própria oximetazolina;
- a noradrenalina induz fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR de maneira PKC-dependente sem induzir dessensibilização e induzindo uma internalização somente após tempos prolongados de tratamento;
- a oximetazolina, diferentemente da noradrenalina, induz fosforilação dos  $\alpha_{1A}$ -AR de maneira GRK2-dependente, induzindo também dessensibilização e internalização significativas com apenas 5 minutos de tratamento;
- a diferença entre as quinases recrutadas por cada um dos agonistas após a ativação dos  $\alpha_{1A}$ -AR parece ser um ponto importante nos processos de taquifilaxia, dessensibilização e internalização.

## **Referências Bibliográficas**

Akinaga J Investigação da dessensibilização e internalização de adrenoceptores alfa1A nativos e recombinantes. Mestrado, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 2008.

Alcantara-Hernandez R, Garcia-Sainz JA (2005). Okadaic acid increases the phosphorylation state of alpha1A-adrenoceptors and induces receptor desensitization. *Eur J Pharmacol* **525**(1-3): 18-23.

Bailey CP, Oldfield S, Llorente J, Caunt CJ, Teschemacher AG, Roberts L, *et al.* (2009). Involvement of PKC alpha and G-protein-coupled receptor kinase 2 in agonist-selective desensitization of mu-opioid receptors in mature brain neurons. *Br J Pharmacol* **158**(1): 157-164.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, *et al.* (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**(3): 297-315.

Berridge MJ (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**(2): 345-360.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brzostowski JA, Kimmel AR (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* **26**(5): 291-297.

Cabrera-Wrooman A, Romero-Avila MT, Garcia-Sainz JA (2010). Roles of the alpha1A-adrenergic receptor carboxyl tail in protein kinase C-induced phosphorylation and desensitization. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **382**(5-6): 499-510.

Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Garcia-Cazarin ML, Tsujimoto G, Piascik MT (2002). Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* **61**(5): 1008-1016.

Chapple CR (1996). Selective alpha 1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia: rationale and clinical experience. *Eur Urol* **29**(2): 129-144.

Cotecchia S (2010). The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res* **30**(6): 410-419.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**(Pt 1): 95-105.

Deupi X, Li XD, Schertler GF (2012). Ligands Stabilize Specific GPCR Conformations: But How? *Structure* **20**(8): 1289-1290.

Docherty JR (2010). Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci* **67**(3): 405-417.

Doll C, Poll F, Peuker K, Loktev A, Gluck L, Schulz S (2012). Deciphering micro-Opioid Receptor Phosphorylation and Dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol*.

Ferguson SS (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**(1): 1-24.

Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, del Carmen Medina L (2000). Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* **389**(1): 1-12.

Graf P, Hallen H, Juto JE (1995). Four-week use of oxymetazoline nasal spray (Nezeril) once daily at night induces rebound swelling and nasal hyperreactivity. *Acta Otolaryngol* **115**(1): 71-75.

Graf P, Juto JE (1994). Decongestion effect and rebound swelling of the nasal mucosa during 4-week use of oxymetazoline. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **56**(3): 157-160.

Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV (2012). G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* **133**(1): 40-69.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**(21): 12657-12665.

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, *et al.* (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* **47**(2): 267-270.

Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C, Lohse MJ (2008). Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* **283**(45): 30933-30941.

Hull LC, Llorente J, Gabra BH, Smith FL, Kelly E, Bailey C, *et al.* (2010). The effect of protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by mu-opioid agonists of different efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* **332**(3): 1127-1135.

Jester BW, Gaj A, Shomin CD, Cox KJ, Ghosh I (2012). Testing the promiscuity of commercial kinase inhibitors against the AGC kinase group using a split-luciferase screen. *J Med Chem* **55**(4): 1526-1537.

Johannssen V, Maune S, Werner JA, Rudert H, Ziegler A (1997). Alpha 1-receptors at pre-capillary resistance vessels of the human nasal mucosa. *Rhinology* **35**(4): 161-165.

Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Silva AR, da Costa IB, Buratini J, Jr., *et al.* (2005). Differential distribution of functional  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2): 753-761.

Krupnick JG, Benovic JL (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.

Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP (1997). Pharmacological characterization of an alpha 1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br J Pharmacol* **120**(5): 819-826.

Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, DeBlasi A, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1-adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* **262**(7): 3098-3105.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**(6): 3202-3211.

Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA, Yang-Feng TL, *et al.* (1991). Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic

receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem* **266**(10): 6365-6369.

Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, Esbenshade TA (1994). Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **46**(5): 929-936.

Morris AJ, Malbon CC (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* **79**(4): 1373-1430.

Morris DP, Price RR, Smith MP, Lei B, Schwinn DA (2004). Cellular trafficking of human alpha1a-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol Pharmacol* **66**(4): 843-854.

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**(4): 597-606.

Nishizuka Y (2003). Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. *J Biochem* **133**(2): 155-158.

Ohno S, Nishizuka Y (2002). Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem* **132**(4): 509-511.

Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(1): 9-22.

Penela P, Ribas C, Mayor F, Jr. (2003). Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**(11): 973-981.

Perez DM, Doze VA (2011). Cardiac and neuroprotection regulated by alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* **31**(2): 98-110.

Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, *et al.* (1992). Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**(5074): 1264-1267.

Price RR, Morris DP, Biswas G, Smith MP, Schwinn DA (2002). Acute agonist-mediated desensitization of the human alpha 1a-adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: implications for regulation of alpha 1aAR splice variants. *J Biol Chem* **277**(11): 9570-9579.

Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ (2012). Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**: 179-197.

Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, *et al.* (2007). The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 913-922.



Rice PJ, Hardin JC, Hamdi A, Abraham ST (1991). Imidazoline desensitization of epinephrine responses in rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* **259**(3): 1182-1187.

Ruffolo RR, Turowski BS, Patil PN (1977). Lack of cross-desensitization between structurally dissimilar alpha-adrenoceptor agonists. *J Pharm Pharmacol* **29**(6): 378-380.

Sallese M, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, *et al.* (2000). The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J* **14**(15): 2569-2580.

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Jr., Yang-Feng TL, *et al.* (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* **265**(14): 8183-8189.

Shirai Y, Saito N (2002). Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem* **132**(5): 663-668.

Stanasila L, Abuin L, Dey J, Cotecchia S (2008). Different internalization properties of the alpha1a- and alpha1b-adrenergic receptor subtypes: the potential role of receptor interaction with beta-arrestins and AP50. *Mol Pharmacol* **74**(3): 562-573.

Stewart JM, Munoz J, Weldon A (2002). Clinical and physiological effects of an acute alpha-1 adrenergic agonist and a beta-1 adrenergic antagonist in chronic orthostatic intolerance. *Circulation* **106**(23): 2946-2954.

Vaidyanathan S, Williamson P, Clearie K, Khan F, Lipworth B (2010). Fluticasone reverses oxymetazoline-induced tachyphylaxis of response and rebound congestion. *Am J Respir Crit Care Med* **182**(1): 19-24.

Vazquez-Prado J, Garcia-Sainz JA (1996). Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* **50**(1): 17-22.

Vazquez-Prado J, Medina LC, Romero-Avila MT, Gonzalez-Espinosa C, Garcia-Sainz JA (2000). Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem* **275**(9): 6553-6559.

Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, *et al.* (1998). Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* **139**(6): 2784-2795.

Wang SY, Song Y, Xu M, He QH, Han QD, Zhang YY (2007). Internalization and distribution of three alpha1-adrenoceptor subtypes in HEK293A cells before and after agonist stimulation. *Acta Pharmacol Sin* **28**(3): 359-366.

Wilden U (1995). Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry* **34**(4): 1446-1454.

Yang-Feng TL, Han H, Lomasney JW, Caron MG (1994). Localization of the cDNA for an alpha 1-adrenergic receptor subtype (ADRA1D) to chromosome band 20p13. *Cytogenet Cell Genet* **66**(3): 170-171.

Zhong H, Minneman KP (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **375**(1-3): 261-276.