

00562

2
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE LA DESENSIBILIZACION

B-ADRENERGICA EN HIGADO DE RATA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS

(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :

BIOL. OLGA MEDINA MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1992



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 está 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.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	61
OBJETIVO.....	66
MATERIAL Y METODOS.....	67
RESUMEN DE RESULTADOS.....	68
DISCUSION.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	83

RESUMEN

Uno de los principales modelos utilizados para la desensibilización ha sido el receptor β -adrenérgico, que se encuentra acoplado al sistema de la adenilato ciclasa. Muchas evidencias sugieren que el evento inicial en la desensibilización es un rápido desacoplamiento del receptor con los demás elementos del sistema, causado por una fosforilación de el receptor por la acción concertada de dos cinasas: la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y la cinasa específica del receptor β -adrenérgico (β -ARK). La fosforilación por la β -ARK en el dominio carboxilo terminal del receptor, induce que una proteína llamada β -arrestina se una a este dominio y compita con Gs. Los receptores desacoplados entonces son secuestrados de la superficie celular a un compartimiento de naturaleza desconocida.

Este modelo puede ser operativo principalmente en tejidos periféricos muy inervados, que responden a concentraciones circulantes de epinefrina, o en tejidos donde los receptores están expuestos a altas concentraciones de catecolaminas como son las sinapsis neurales, en donde la acción de las dos cinasas y la unión de la β -arrestina, parecen ser funcionalmente importantes.

Sin embargo, en hígado de rata, a pesar de ser un tejido periférico, ni la PKA ni el AMPc están involucrados en este proceso de desensibilización. Por otra parte, no se ha encontrado expresión ni de β -ARK ni de β -arrestina en este tejido; lo que podría indicar que ninguna de estas dos proteínas estaría involucrada en la desensibilización en el hígado. El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar el mecanismo que provoca la desensibilización en este tejido.

En un trabajo previo utilizando hepatocitos frescos de rata hipotiroidea, las cuales tienen una marcada respuesta β -adrenérgica, se demostró que la preincubación con isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, induce una desensibilización β -adrenérgica dependiente del tiempo y de la concentración del agonista. Esto fue demostrado en células aisladas, evaluando la acumulación de AMPc.

En este trabajo se demuestra que de igual forma, se observa una disminución de un 50% en la actividad de la enzima adenilato ciclasa en membranas aisladas, después de la incubación previa de las células con el agonista β -adrenérgico. Esta caída en la respuesta celular es cuantitativamente similar a la disminución en el número de receptores que se pierden de la membrana plasmática, evidenciada por una disminución en el pegado específico para el ligando ^{125}I cianopindolol ($^{125}\text{ICYP}$).

Con el propósito de determinar si ocurre una disminución en los niveles aparentes de las proteínas Gs presentes, se realizó la ADP-ribosilación de Gs catalizada por la toxina del cólera, en donde se observó que no hay una disminución en los niveles de Gs que correlacione con la pérdida en el número de receptores.

De la misma manera, utilizando algunos estudios de desplazamiento del ligando radiactivo $^{125}\text{ICYP}$ se muestra que el proceso de desensibilización no provoca un cambio en la afinidad de los receptores que permanecen en la membrana después de la preincubación con el isoproterenol, ni reduce la habilidad de los nucleótidos de guanina para modular el estado de afinidad de éstos.

Lo que significa que los receptores que permanecen en la membrana celular mantienen su integridad funcional.

Por otra parte, el tratamiento de membranas con fosfatasa alcalina, no provoca la recuperación de la actividad de la adenilato ciclasa en el proceso de desensibilización, lo que sugiere que la fosforilación del receptor no juega un papel importante en este proceso en el hígado de rata.

En resumen nuestros datos muestran que en hepatocitos de rata hipotiroidea, el secuestro de los receptores β -adrenérgicos, es el evento mas importante en la desensibilización de este tejido conteniendo un número muy pequeño de receptores. Este proceso involucra únicamente al receptor y aparentemente en este tejido poco innervado a diferencia de los tejidos periféricos con un gran número de receptores, la fosforilación no esta involucrada en la desensibilización del tejido hepático y posiblemente otros tejidos poco innervados como el bazo.

INTRODUCCION

Una gran variedad de moléculas biológicamente activas como hormonas, diversas drogas y factores de crecimiento, inician sus acciones mediante su unión a receptores específicos que se encuentran en las células blanco (1). Este concepto que en la actualidad parece obvio, tuvo su origen en el trabajo de Langley (2) quien estudiando los efectos de la nicotina y el curare sobre las uniones mioneurales, introdujo en 1906 el concepto de "sustancia receptora" como el sitio de acción que recibe al estímulo y lo transmite, causando la contracción.

La comprensión del papel, indudablemente esencial, de muchos tipos de receptores en los procesos biológicos, ha abierto una de las áreas más apasionantes de la ciencia y específicamente de la bioquímica. De hecho durante los últimos años ha habido un avance considerable en nuestra comprensión sobre los mecanismos de comunicación y control de la actividad celular. En la actualidad esta área del conocimiento se está ligando a otras áreas de la Biología que en un principio parecían estar muy separadas.

Entre los receptores más estudiados se encuentran los receptores adrenérgicos. Estos comprenden una familia formada por lo menos de 9 diferentes receptores, que se encargan de mediar los efectos de dos agonistas fisiológicos: la epinefrina y la norepinefrina, además de una amplia variedad de congéneres sintéticos (3).

Desde 1895 Schaefer mostró que los extractos de la glándula suprarrenal tienen un efecto vasopresor, y el principio activo de

este extracto fue nombrado por Abel en 1899 como epinefrina. Ya para 1906, Dale comenzó a utilizar el concepto de receptor para explicar el mecanismo de acción de la epinefrina sobre el sistema nervioso simpático (4).

Casi 90 años de investigación han mostrado que todos los eventos fisiológicos y metabólicos, que siguen a la estimulación del sistema nervioso simpático, son usualmente mediados por receptores adrenérgicos, estimulados por la epinefrina o la norepinefrina, actuando como neurotransmisores, o bien por la epinefrina, actuando como hormona, en tejidos periféricos. Estas dos aminas endógenas no muestran los mismos efectos, pero muchas de las diferencias en sus acciones solo son cuantitativas, por ello, los eventos mediados por ambas, son descritos generalmente a partir de la amina típica, la epinefrina.

Entre las acciones más importantes de la epinefrina se encuentran: la activación de algunos tipos de músculo liso de vasos sanguíneos que irrigan la piel, las mucosas, o bien de algunas glándulas como las salivales. Es responsable de incrementar la frecuencia cardiaca, de la fuerza de su contracción, del aumento en la velocidad de la glucogenólisis en el hígado y en los músculos, y también de la liberación de ácidos grasos libres en el tejido adiposo. Modula la secreción de insulina, renina y de las hormonas de la pituitaria, así como la liberación de algunos neurotransmisores como la misma norepinefrina o la acetilcolina, entre otros. Por otra parte la epinefrina tiene una gran variedad de efectos sobre el sistema nervioso central, entre los que

destacan la estimulación de frecuencia de la respiración, el incremento generalizado en la vigilia y la actividad psicomotora (5).

Para poder entender toda esta diversidad de efectos ocasionados por una única hormona o mensajero primario fue crucial el descubrimiento de la existencia de diversos receptores adrenérgicos. Ya desde 1948, Ahlquist (6) propuso que existía mas de un tipo de receptor adrenérgico, basándose en sus observaciones sobre la habilidad y la potencia relativa de la epinefrina, la norepinefrina y otros agonistas para regular una serie de procesos fisiológicos. En el músculo liso, estas drogas pueden causar relajación o excitación, dependiendo del sitio, la dosis y del agente elegido, por lo cual Ahlquist propuso la existencia de dos tipos de receptores, que reconocían diferencias discretas en la estereoquímica de los agentes y dio la designación de alfa (α) para los receptores que producen una respuesta contráctil y beta (β) para los que producen una relajación, en estas preparaciones. Esta clasificación inicial de los receptores adrenérgicos, fue corroborada por el encuentro de que ciertos antagonistas bloqueaban selectivamente algunos efectos sin alterar otros.

En 1967, Lands et al. (7) subdividieron a los receptores β , en los subtipos β_1 y β_2 , debido a que se observaban diferencias importantes en la potencia de la epinefrina y de la norepinefrina cuando actúan sobre los receptores de un tejido o los de otro. Los receptores localizados en tejidos como el corazón, en donde se observa que ambas hormonas son equipotentes, fueron denominados β_1 .

Mientras que los que se encuentran en músculo liso, en donde generalmente la epinefrina es por lo menos 10 veces más potente que la norepinefrina, fueron denominados β_2 . A finales de los años sesenta, se sintetizaron algunos agonistas y antagonistas que permitieron diferenciar a ambos tipos de receptores más claramente.

Recientemente se han encontrado ciertas evidencias de la existencia de un tercer subtipo de receptor β -adrenérgico. El gene que codifica para dicho receptor, designado β_3 , fue clonado por Emorine et al. en 1989 (8). Es posible que este receptor se encuentre mediando la respuesta a las catecolaminas en algunos sitios que presentan características farmacológicas atípicas como el tejido adiposo. De hecho en 1991, Fève et al. (9) propusieron la existencia de una población predominante de receptores β_3 -adrenérgicos en adipocitos 3T3-F442A. El receptor β_3 es casi 10 veces más sensible a la epinefrina que a la norepinefrina, es relativamente sensible al bloqueo por el antagonista clásico de los receptores β , el propranolol, y de manera sobresaliente, los antagonistas como el CGP 12177, el oxoprenolol y el pindolol muestran actividad de agonistas parciales para este subtipo de receptor.

De la misma manera que en los receptores β -adrenérgicos, se ha encontrado una enorme heterogeneidad entre los receptores α -adrenérgicos. A mitad de los setenta, los experimentos realizados por Dubocovich y Langer (10) sugirieron que los receptores α -adrenérgicos podrían ser subdivididos, tomando en cuenta la sensibilidad diferencial al agente alquilante fenoxibenzamina y por

su localización pre o postsináptica. Posteriormente Berthelsen y Pettinger (11), tomando en cuenta estas observaciones, examinaron la potencia relativa de varios agonistas adrenérgicos y propusieron que los receptores α podrían ser subclasificados. Los receptores presinápticos fueron designados como α_2 , mientras que los postsinápticos excitatorios fueron designados como α_1 adrenérgicos.

En la actualidad se sabe que los receptores α_1 adrenérgicos, se encuentran también en terminales nerviosas presinápticas y los receptores α_2 se encuentran igualmente en sitios postsinápticos y en una gran variedad de tejidos como el hígado, pulmón, corazón y los riñones. Por esta razón el concepto inicial para diferenciar estos dos tipos de receptores ha tenido que cambiar en favor de una clasificación farmacológica y funcional más real.

El espectacular avance de la biología molecular, el desarrollo de muchos compuestos que permiten diferenciar a estos subtipos y la utilización de estudios de asociación (binding) de ligandos radiactivos han mostrado una enorme heterogeneidad en los dos diferentes tipos de receptores α -adrenérgicos. En 1986, Morrow y Creese (12) demostraron en la corteza cerebral de la rata, la existencia de dos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos con diferente afinidad para el antagonista WB4101. El sitio de alta afinidad fue denominado α_{1a} y el de baja afinidad como α_{1b} .

Los estudios de clonación molecular no sólo han permitido la identificación de los genes correspondientes a cada uno de los subtipos de receptor α_1 -adrenérgico, que se habían postulado por sus características farmacológicas, sino además permitieron

encontrar un tercer subtipo de receptor α_1 adrenérgico denominado α_{1c} , que no se había identificado previamente (13-15). El monitoreo de la expresión de dicho receptor, realizado por estudios de Northern, ha mostrado que no se expresa en ningún tejido de la rata y sólo se ha detectado en hígado de conejo y en las células de la capa granular del dentate gyrus en el humano, lo que sugiere que la expresión del receptor α_{1c} es enormemente selectiva (14,16).

De igual forma, algunos estudios farmacológicos y funcionales sugirieron la existencia de heterogeneidad en los receptores α_2 -adrenérgicos (17). El uso de algunos agonistas y antagonistas, sirvieron para diferenciar inicialmente a dos diferentes sub-subtipos denominados α_{2a} y α_{2b} . En 1987 Murphy *et al.* (18), reportaron la existencia de un tercer subtipo de receptor α_2 en una línea celular derivada de riñón, al que se designó α_{2c} . Finalmente, se ha descrito un cuarto subtipo, encontrado en la glándula pineal de bovino y en las glándulas submaxilares de la rata, denominado α_{2d} (19).

Sin embargo, sólomente ha sido posible aislar tres genes distintos para el receptor α_2 , localizados en los cromosomas 10, 4 y 2 en el humano (20). Tomando en cuenta estos criterios moleculares y relacionándolos con los datos farmacológicos y la localización de los genes que codifican para estos receptores, Lomansney (21) propuso una nueva clasificación, basándose en la localización de los genes y las características farmacológicas de estos 3 receptores expresados en células COS-7.

La enorme diversidad de receptores adrenérgicos, nos lleva a

suponer que cada uno de ellos desempeña un papel específico en la regulación de efectos definidos de las catecolaminas sobre sus células blanco. Es muy posible que los diferentes efectos logrados por una única hormona sobre una célula, se deban en gran parte a la expresión diferencial de los diferentes subtipos de receptores en un tejido específico.

Por otra parte, cada uno de los subtipos de receptores adrenérgicos emplean diferentes mecanismos para internalizar la señal (sistemas de transducción) y existen algunas evidencias de que un único receptor puede acoplarse a más de uno de estos sistemas, lo que potencialmente los capacita para regular diversos efectos sobre una célula.

SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES

La función primaria de cualquier receptor localizado en la superficie de la membrana es la de diferenciar apropiadamente al mensajero al que se va a unir entre múltiples señales extracelulares. Sin embargo, los receptores por sí mismos no pueden internalizar la señal sino que deben incorporarse a un sistema que la procesa o transduce. Ante la incapacidad de la hormona o primer mensajero para atravesar la membrana celular, esta activa al receptor, quien a su vez estimula a un sistema efector, que se encarga de producir una señal intracelular, denominada segundo mensajero.

Desde hace algunos años, el término transducción se ha usado para describir la transferencia de información entre los receptores

para una enorme diversidad de hormonas y la enzima efectora, responsable de la producción del segundo mensajero. Todo este procesamiento de la información recibida por el receptor involucra a algunos componentes integrados en la membrana celular.

Muchos sistemas de transducción de señales conforman una unidad tripartita de naturaleza proteica constituida por: a) un receptor en la superficie de la célula, b) un efector como un canal iónico o una enzima y c) una unidad transductora (que une nucleótidos de guanina, por lo que es denominada proteína G), que se encarga de acoplar a los receptores con los efectores.

Las proteínas G involucradas en la transducción de señales son miembros de una enorme familia, que incluye proteínas del citoesqueleto como la tubulina, proteínas solubles que actúan como factores de iniciación y elongación en la síntesis de proteínas y algunas de bajo peso molecular como el proto-oncogen ras-p21 y otras proteínas relacionadas con ras como rho.

Todas las proteínas G que participan en la transducción de señales unen nucleótidos de guanina con alta afinidad y especificidad y poseen una actividad intrínseca de GTPasa, que funciona como un "switch" o interruptor molecular modulando sus interacciones con otras proteínas. Cada una de estas proteínas G tiene una KD para GTP y otra para GDP y una constante de velocidad particular para la hidrólisis del GTP, lo que les da propiedades cinéticas diferenciales.

Otra característica distintiva de estas proteínas es que son heterotrímeros formados por las subunidades α , β y γ , cada una

producto de un gen diferente. Las subunidades $\beta\gamma$ están fuertemente unidas, aunque no de manera covalente, a la subunidad α , que contiene el sitio de unión de GTP-GDP y que en algunos casos sirve como sustrato de ciertas toxinas bacterianas (22).

Por otra parte, casi todos los receptores acoplados a las proteínas G muestran un arreglo topológico similar, consistente de 7 dominios hidrofóbicos que se expanden a través de la membrana plasmática. Solamente el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II, un receptor con un único dominio, parece acoplarse directamente a proteínas G (23).

Aunque los diferentes receptores que se acoplan a las proteínas G reciben señales extracelulares tan diversas como la luz, los olores, las hormonas peptídicas y los neurotransmisores y se encuentran en organismos tan separados evolutivamente como la levadura y el hombre, sus mensajes se traducen a un repertorio aparentemente muy limitado de segundos mensajeros. Es decir, la manera de internalizar el mensaje a una célula parece ser marcadamente universal.

En la actualidad, se reconocen básicamente tres grandes sistemas de transducción de las señales acoplados a proteínas G. Uno que utiliza el adenosín 3,5 monofosfato cíclico (AMPC) como segundo mensajero, denominado sistema de la adenilato ciclasa; otro que emplea una combinación de segundos mensajeros que incluyen iones de calcio y dos sustancias: el inositol trisfosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) o el sistema de los fosfoinosítidos - calcio y el sistema de la fototransducción que involucra la

activación de una enzima fosfodiesterasa, que se encarga de hidrolizar guanosin monofosfato cíclico (GMPC) citosólico.

Hasta hace muy poco tiempo se consideraba que algunos receptores a factores de crecimiento llevaban a cabo tanto la transducción como la propagación del mensaje, aparentemente sin la formación de segundos mensajeros, como en el caso del receptor de insulina, el del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que estos factores pueden estimular la formación de segundos mensajeros en algunas líneas celulares. Por otra parte, algunos canales iónicos han sido reconocidos como parte de la familia de moléculas reguladas por proteínas G (24), por lo que no sería difícil que el número de sistemas acoplados a proteínas G conocidos aumentara en un período muy corto.

SISTEMA DE LOS FOSFOINOSITIDOS CALCIO

Algunas hormonas, como vasopresina, histamina, angiotensina II, serotonina, la epinefrina (a través de todos los subtipos de receptores α_1) y algunos factores de crecimiento, al interaccionar con su correspondiente receptor, inducen la hidrólisis de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), por la activación de la enzima fosfolipasa C a través de una proteína G fijadora de nucleótidos denominada G_p . Los productos de la hidrólisis del PIP_2 : el mio-inositol 1,4,5 trisfosfato (IP_3) y el 1,2 diacilglicerol (DAG) funcionan como mensajeros intracelulares. Una característica sobresaliente de este sistema es

que los dos productos generados por la hidrólisis del PIP_2 funcionan como segundos mensajeros, formando un sistema bifurcado para llevar la información dentro de la célula (25).

El IP_3 , cuya naturaleza hidrosoluble le permite difundirse al citoplasma celular e interactuar con receptores localizados en la superficie del retículo endoplásmico, produce la apertura de un canal que promueve la liberación de calcio de este orgánulo, provocando un aumento hasta de 10 veces en la concentración del calcio citosólico.

El calcio liberado, activa a un gran número de enzimas en forma directa y a proteínas cinasas dependientes de calcio o del complejo calcio-calmodulina. Este aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular disminuye rápidamente por la acción del mismo retículo y de las mitocondrias que capturan al catión, lo mismo que de una ATPasa de calcio que lo expulsa de la célula.

El otro producto de la hidrólisis del PIP_2 , el diacilglicerol, un compuesto hidrofóbico que permanece unido a la membrana, se encarga de activar directamente a una proteína cinasa denominada proteína cinasa C (PKC), encargada de fosforilar diversas proteínas. Esta proteína se encuentra en muchos tipos celulares, de los cuales se recupera en la fracción soluble en su forma inactiva y aparentemente se transloca hacia la membrana cuando las células son estimuladas.

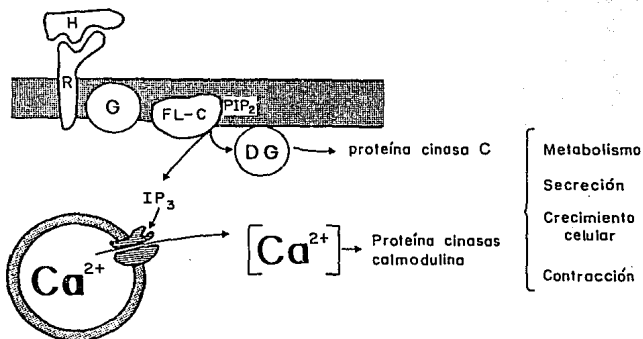
Bajo la acción de la proteína cinasa C y de las enzimas activadas por el calcio (quinasas y otras enzimas) se propaga la

acción de las hormonas que utilizan este sistema de transducción (ESQUEMA 1). Este versátil mecanismo de señales ha sido adaptado para controlar respuestas inmediatas como la contracción, la secreción o el metabolismo y aparentemente también podría desempeñar un papel muy importante en respuestas a largo término como son el desarrollo, la diferenciación e incluso en el almacenamiento de información en el sistema nervioso.

Sin embargo, cada vez va siendo más claro que este sistema es mucho más complejo de lo que originalmente se había supuesto. Hasta hace poco tiempo, únicamente se consideraba una vía estimulatoria de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, ahora existen algunas evidencias de que podría haber una vía encargada de la inhibición de la hidrólisis de estos lípidos.

En las neuronas de hipocampo, por ejemplo, se ha observado, que los aminoácidos ácidos inhiben la formación de fosfatos de inositol inducida por carbacol o histamina (26), mientras que en la pituitaria se ha observado que la dopamina a través de sus receptores D_2 , puede suprimir el efecto de angiotensina II sobre la secreción de prolactina y la formación de fosfatos de inositol (27).

De hecho, se han identificado por lo menos dos tipos de proteínas G se acoplan a la fosfolipasa C, una sensible a la actividad de ADPribosil-transferasa de la toxina pertussis que la inhibe (Gpi), y otra insensible a la toxina, y que participa en la estimulación de esta enzima (Gps) (28). Sin embargo, se requiere más información antes de concluir sobre la existencia de una vía



ESQUEMA 1. SISTEMA DE LOS FOSFOINOSITIDOS-CALCIO. Las abreviaturas empleadas son (H) hormona, (R) receptor, (G) proteína G regulatoria, (FLC) fosfolipasa C, (PIP₂) fosfatidilinositol bifosfato, (DG) diacilglicerol, (IP₃) inositol trifosfato.

inhibitoria en el sistema de los fosfoinosítidos-calcio.

Por otra parte, la hidrólisis de PIP_2 a IP_3 y DAG puede ser catalizada por algunas isozimas de la familia de la fosfolipasa C. Se han identificado por lo menos 5 formas inmunológicamente diferentes de esta enzima. De acuerdo con la nomenclatura propuesta por Rhee et al. (29), estas son PLC- α (62-68 kDa), PLC- β (100-150 kDa), PLC- γ 1 y 2 (145 kDa), PLC- δ (85-88 kDa) y la PLC- ϵ (85 kDa).

De la misma forma, se han identificado por lo menos ocho isoformas (30) de la proteína cinasa C, con diferencias no sólo en su patrón de distribución sino en sus propiedades cinéticas y posiblemente en su especificidad por diferentes sustratos.

Durante los últimos años se han acumulado un gran número de evidencias que indican que el recambio de fosfolípidos, dependiente de la activación de receptores, podría no sólo incluir a la hidrólisis de PIP_2 catalizada por la PLC, sino que posiblemente otros fosfolípidos de membrana son también degradados después de la activación celular mediada por un receptor.

Estas evidencias son particularmente fuertes para la fosfatidilcolina, la cual a diferencia del PIP_2 , es probablemente hidrolizada tanto por la fosfolipasa C como por la fosfolipasa D. De esta manera, la fosfolipasa D podría tener un papel funcional importante en la transducción de señales.

La fosfolipasa D normalmente hidroliza a la fosfatidilcolina produciendo colina libre y ácido fosfatídico. Sin embargo, en presencia de un alcohol primario, como el etanol, la enzima

cataliza una reacción de transfosfatidilación, que transfiere el grupo fosfatidil al alcohol formando fosfatidiletanolamina. De esta manera, puede proporcionar una fuente alternativa de diacilglicerol, aunque el DAG derivado de esta vía aparentemente no provoca la activación de la isoforma α -PKC en fibroblastos estimulados por trombina (31).

Aún no conocemos la razón de toda esta enorme diversidad entre las moléculas que participan en esta vía. Pero queda como una posibilidad el que las diferentes opciones moleculares pudieran ser elegidas selectivamente para actuar sobre sustratos específicos y lograr sólo la respuesta necesaria para una condición determinada.

SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

El AMPc, uno de los segundos mensajeros que se produce en respuesta a algunas hormonas en células de mamífero, ha sido reconocido en un gran número de organismos incluyendo procariontes y eucariontes unicelulares como la ameba *Dictyostelium discoideum* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Este segundo mensajero es producido por la activación del sistema de la adenilato ciclasa, el cual está formado por tres componentes básicos: receptores, tanto estimulatorios como inhibitorios, los cuales se acoplan a una proteína regulatoria denominada Gs o Gi respectivamente y finalmente la unidad catalítica o adenilato ciclasa. Estos componentes, incluyendo algunos receptores han sido purificados y muchos de ellos incluso clonados y secuenciados.

Los receptores estimulatorios (Rs), entre los que se incluyen

todos los subtipos de receptores β -adrenérgicos, los de glucagon y los de la prostaglandina E_1 , promueven incrementos de AMPc al estimular a la adenilato ciclasa, por el contrario, los receptores inhibitorios (R_i) provocan la disminución de los niveles del segundo mensajero por inhibir a la enzima efectora.

Por otra parte, ya desde los inicios de los años setenta, se tenían evidencias, a partir del trabajo de Rodbell et al. (146) de la existencia de un elemento que se encargaba de acoplar la señal entre el receptor y la molécula efectora. La observación inicial de que la activación hormonal requería de la presencia de GTP; la purificación de la proteína Gs, y la clonación de su gen por Gilman et al. (32), llevó al descubrimiento de la familia de proteínas acopladoras de la respuesta hormonal, las proteínas G.

La proteína Gs, como ya había mencionado, participa en la estimulación de la adenilato ciclasa y también en la apertura de canales de calcio. La subunidad α de esta proteína es sustrato de la toxina del cólera producida por la bacteria *Vibrio cholerae*, quien la ADP-ribosila en el residuo Arg-201, lo que provoca una activación persistente de la adenilato ciclasa.

El empleo de algunas técnicas de biología molecular han mostrado que por lo menos se generan cuatro tipos de RNAm a partir de un único gen para α -Gs (33) por uso alternativo de uno de los exones, aunque sólo se generan dos formas de α -Gs cuando son expresadas en células COS-m6 o en *E. coli*; una de 52 kDa y otra de 45 kDa. La proporción de estas 2 formas varía entre diferentes tejidos y células, pero las diferencias funcionales de estos dos

tipos de proteínas aún no se han determinado (34,35)

De la misma forma, los estudios de clonación molecular de Gi han revelado la existencia de 3 tipos distintos denominados α -Gi₁, α -Gi₂ y α -Gi₃. Su secuencia de aminoácidos muestra más del 85% de homología entre ellas, aunque cada una es codificada por su propio gen. Dos formas de esta proteína, una de 40 kDa y otra de 41 kDa, han sido purificadas de cerebro de porcino y actúan como sustratos para la ADP-ribosilación por la toxina pertussis (141). Las formas α -Gi₂ y α -Gi₃ son expresadas en casi todos los tejidos y tipos celulares, aunque su abundancia relativa varía entre los diferentes tejidos. Mientras que la expresión de α -Gi₁ parece ser más específica del tejido y del tipo celular, de hecho esta proteína se expresa predominantemente en cerebro.

La proteína α -Gi₁ parece ser la isoforma acoplada inhibitoriamente a la adenilato ciclasa, mientras que α -Gi₂ y α -Gi₃ aparentemente están acopladas a la fosfolipasa C y a canales de potasio respectivamente. Sin embargo, la especificidad de cada una de las isoformas no ha sido determinada del todo. Las 3 isoformas son sustrato para la actividad de ADP-ribosil- transferasa de la toxina pertussis (22)

A pesar de las múltiples formas de las subunidades α de las proteínas G, todas se asocian a un pequeño grupo de subunidades β y γ . Las subunidades β son una mezcla de proteínas de 35 y 36 kDa y únicamente dos cDNAs han sido aislados, el β 1 y el β 2 (36,37), correspondientes a las isoformas de 35 y 36 kDa respectivamente. La homología entre ambas proteínas es de casi un 90%. Por otra parte,

sólo se ha identificado el cDNA de la subunidad γ y de G_i y de cerebro (38-40).

De igual forma, se han descrito algunas isoformas de la enzima efectora de este sistema, la adenilato ciclasa [ATP pirofosfatasa-liase (ciclizante) EC 4.6.1.1]. En términos generales la labilidad de esta proteína limitó durante mucho tiempo su purificación y de hecho, aún ahora, no ha sido totalmente caracterizada.

Una de las primeras formas de la adenilato ciclasa en ser purificada fue la de la bacteria *Brevibacterium liquefaciens* (41) y posteriormente se comenzaron a purificar algunas isoformas de la adenilato ciclasa de mamífero. Una de ellas, aislada de cerebro de bovino, es una glicoproteína integral de membrana de 150 kDa y es sensible a la estimulación por calcio-calmodulina. La mayoría de las otras isoformas se activan por un diterpeno aislado de las raíces de la planta *Coleus forskohlii*, denominado forskolina (42,43).

La estimulación de la adenilato ciclasa es iniciada por la unión de una hormona o agonista a un receptor estimulador como los β -adrenérgicos, los de glucagon, etc. La unión de estos mensajeros primarios a sus receptores les provocan un cambio conformacional, lo que les permite interactuar con la proteína G_s . La unión del receptor ocupado por el agonista a G_s provoca la disociación de una molécula de GDP unida a esta proteína, al mismo tiempo que promueve la unión de una molécula de GTP. Este paso de recambio de nucleótidos conduce a la activación e induce la disociación de las subunidades que conforman la proteína G_s en α -

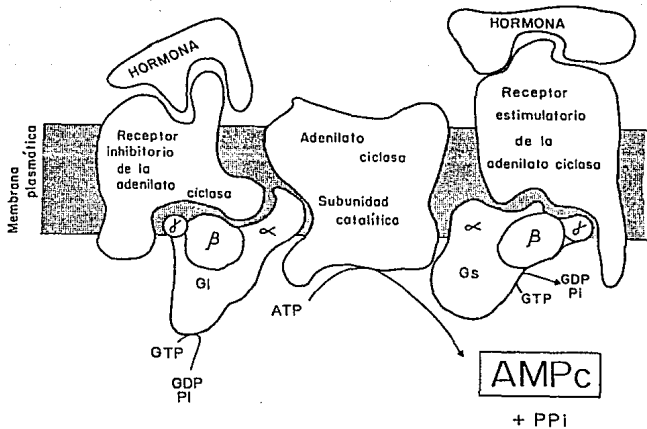
GTP y $\beta\gamma$. La subunidad α -GTP disociada se une a la adenilato ciclasa y la activa. Una vez que la subunidad α -GTP es convertida a α -GDP se disocia de la subunidad catalítica y se reasocia con $\beta\gamma$.

Aparentemente la proteína G_i actúa de una manera muy similar, sólo que el complejo α -GTP inhibe a la adenilato ciclasa al interactuar con esta (44). Aunque se ha propuesto que la liberación del complejo $\beta\gamma$ por la activación hormonal de G_i , puede asociarse con α_s y de esta manera prevenir su activación (45).

La adenilato ciclasa al ser activada hidroliza el ATP para formar una molécula de AMPc, que actúa como segundo mensajero, y pirofosfato. El AMPc formado se une a la proteína cinasa A y la activa (ESQUEMA 2).

En ausencia de AMPc, la proteína cinasa A es un tetrámero asimétrico inactivo, formado por dos subunidades regulatorias y dos catalíticas. La unión del AMPc a la subunidad regulatoria altera su afinidad por la subunidad catalítica hasta por cuatro órdenes de magnitud y es suficiente para promover la disociación de un dímero de subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas activas en forma de monómeros (46). La subunidad catalítica promueve la fosforilación covalente en residuos de serina y treonina de proteínas específicas encargadas de conducir la respuesta final a un estímulo. Como muchas cinasas, la proteína cinasa A se encuentra regulada y mantenida en su forma inactiva en ausencia de AMPc.

Aunque la acción hormonal provoca un rápido aumento en los niveles de AMPc, el efecto se contrarresta por la acción de la enzima fosfodiesterasa, que se encarga de su degradación.



ESQUEMA 2. SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

SISTEMA DE LA FOTOTRANSDUCCION

Una vía análoga al sistema de transducción de señales de la adenilato ciclasa ha sido encontrado para la transmisión de señales luminosas en la retina. Este proceso, que consiste en la conversión de señales luminosas a señales neuroquímicas mediadas por un fotorreceptor, es llamado fototransducción.

De la misma forma que el sistema de la adenilato ciclasa, el sistema de la fototransducción consiste de una unidad tripartita formada por un fotorreceptor o rodopsina, una proteína G específica denominada transducina (G_t) y la enzima efectora, en este caso la fosfodiesterasa del GMP cíclico.

Después de la captura de un único fotón, el cromóforo todo-cis-retinal unido covalentemente a la rodopsina se transforma al isómero todo-trans-retinal. Este cambio estructural causa que la molécula de la rodopsina se transforme progresivamente en una serie de intermedios conformacionales, uno de los cuales (la forma metarrodopsina II) se acopla a la transducina. La subunidad α de la transducina activa a la fosfodiesterasa del GMP cíclico, en este caso la enzima efectora. La disminución en los niveles de GMP cíclico intracelular ocasiona el cierre de un canal específico de cationes dependiente de GMP cíclico, lo que resulta en una hiperpolarización de la membrana plasmática que se propaga hasta las terminales sinápticas de la célula retinal (47).

Por otra parte la estimulación de la rodopsina también resulta en la activación de la fosfolipasa A_2 , sin embargo, este efecto parece ser mediado por el complejo $\beta\gamma$ disociado de la subunidad α

de la transducina, al ser activada por la rodopsina (48).

Una característica importante en la secuencia de aminoácidos de la rodopsina es la presencia de siete grupos de aminoácidos muy hidrofóbicos, los que podrían representar dominios que atraviesan la membrana plasmática. Usando el método de análisis de hidropatía de Kyte y Doolittle se ha mostrado que la rodopsina tiene una enorme similitud con la molécula de bacteriorrodopsina de *Halobacterium halobium* y con el receptor β -adrenérgico. Las comparaciones entre estas proteínas han sido de enorme importancia en el desarrollo de modelos, tanto estructurales como funcionales, de receptores acoplados a proteínas G.

Por otra parte, se han encontrado dos tipos de cDNAs correspondientes a las isoformas de la subunidad α de la transducina $G_{1\alpha}$ y $G_{2\alpha}$. La secuencia de aminoácidos de ambas isoformas muestran un 80% de identidad y los RNAs mensajeros son expresados en bastones y conos respectivamente (49). La organización exón-intrón del gen $G_{1\alpha}$ de rata es idéntica a la de los genes de $G_{i2\alpha}$, $G_{i3\alpha}$ y $G_{o\alpha}$. De igual forma, en las cuatro proteínas el cuarto aminoácido del extremo carboxilo terminal es una cisteína, que sirve como sustrato para la toxina pertussis. La proteína G_i tiene sólo una subunidad β de 36 kDa y una sola subunidad γ .

RECEPTORES β -ADRENERGICOS

Durante los últimos años, se ha encontrado que un gran número de receptores incluyendo la familia de los dopaminérgicos, la de

los muscarínicos, serotoninérgicos, etc., parecen ser homólogos a los receptores adrenérgicos y a la rodopsina, presentando un arreglo topológico similar de siete dominios transmembranales.

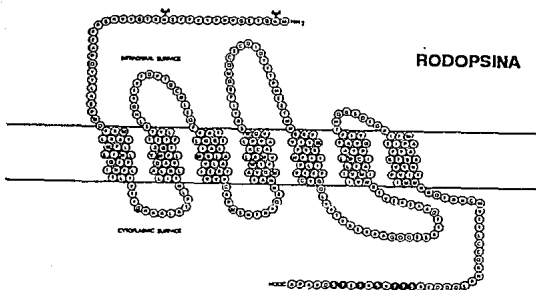
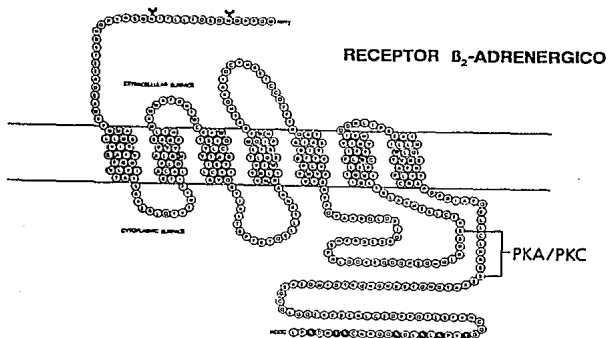
De todos los receptores hormonales con siete dominios transmembranales, el β_2 -adrenérgico es sin duda el modelo más empleado para estudiar la influencia de las señales extracelulares sobre los eventos celulares. A diferencia de lo que podría suponerse, el receptor β_2 -adrenérgico es expresado a muy bajos niveles en casi todos los tejidos de mamífero (10-500 fmol por mg de proteína de membrana plasmática), sin embargo, como ya se había mencionado, se encuentra acoplado al sistema de transducción más ubicuo y posiblemente mejor estudiado: el sistema de la adenilato ciclasa (50). Los receptores β -adrenérgicos se encuentran regulando procesos fisiológicos tan diversos como el metabolismo celular, la secreción, la diferenciación y el crecimiento, lo que posiblemente los hace un sistema útil para relacionar información estructural con funciones biológicas específicas (51). De esta manera, el bloqueo o estimulación de estos receptores por medios farmacológicos ocasiona diversos efectos, lo que representa implicaciones terapéuticas para un gran número de enfermedades humanas (53).

Una gran parte de los más recientes progresos en el estudio de los receptores β_2 -adrenérgicos es una consecuencia de su purificación. Los primeros intentos fueron llevados a cabo por el grupo de Lefkowitz (52) utilizando el eritrocito de rana, posteriormente, empleando técnicas de cromatografía líquida de alta

presión (HPLC), lograron purificar el primer receptor β_2 -adrenérgico de mamífero proveniente de pulmón de hamster (55). La purificación completa de este receptor mostró que es una glicoproteína integral de membrana, cuyo peso molecular es de 56,000 Da, con un único sitio de unión del ligando presente en cada molécula del receptor y con características farmacológicas específicas intrínsecas de esta proteína.

Los primeros pasos sobre la estructura molecular de este receptor se dieron con la determinación parcial de la secuencia primaria de la proteína y posteriormente con la clonación del gen y del cDNA que codifican para el receptor β_2 -adrenérgico de hamster (56). Estos estudios mostraron que el gen de este receptor consiste de un único exón y que el cDNA codifica para una proteína de 418 aminoácidos.

La clonación y la secuenciación del receptor β_2 -adrenérgico revelaron una estrecha relación estructural con la rodopsina, lo que sugiere que pudieran tener un origen común. Ambos receptores son glicoproteínas, con los sitios de glicosilación cercanos al extremo amino terminal (ESQUEMA 3). Cada uno contiene siete agrupamientos de aminoácidos hidrofóbicos, que parecen representar regiones que atraviesan la membrana plasmática. Este arreglo estructural provoca la formación de tres asas conectoras hacia el espacio extracelular y tres hacia el espacio intracelular. Cada uno tiene un extremo carboxilo terminal intracelular, rico en serina y treonina. Cuando las secuencias de ambos receptores se alinean existe hasta un 24% de homología entre estas proteínas, si



ESQUEMA 3. ESTRUCTURA PRIMARIA Y MODELO DE LA TOPOLOGIA DEL RECEPTOR β_2 -ADRENERGICO DE HAMSTER Y LA RODOPSINA DE BOVINO. Los sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa A en el receptor β_2 -adrenérgico se encuentran indicados. Los círculos llenos representan los residuos de serina y treonina en el extremo carboxilo terminal de cada receptor, los cuales sirven como sitios de fosforilación para la β -ARK y la rodopsina cinasa respectivamente.

se consideran únicamente las regiones que atraviesan la membrana. Sin embargo, las similitudes son mayores si se compara al receptor β_2 -adrenérgico con el receptor colinérgico-muscarínico o con cualquier otro miembro de la familia de los adrenérgicos (40-70%) (54).

Por otra parte, algunos estudios de mutagénesis dirigida y la construcción de quimeras elaboradas a partir de los genes de los receptores α_2 y β_2 -adrenérgicos han permitido la identificación de las regiones implicadas en la unión de los ligandos al receptor β -adrenérgico y de los sitios involucrados en la interacción con la proteína Gs.

Estos estudios han revelado que las asas hidrofílicas que conectan los siete dominios hidrofóbicos no son requeridas para la unión de los ligandos, sino que más bien la segunda y la séptima hélice transmembranal son los dominios determinantes en la unión de los ligandos. Otra característica importante que se desprende de estos estudios es que el sitio de unión para los agonistas mapea en un sitio diferente al de los antagonistas. Por otra parte, los determinantes para la interacción del receptor con la proteína Gs caen en el dominio que comprende la quinta y la sexta hélice transmembranal y la tercera asa conectora citoplásmica (57).

O'Dowd et al. (58) realizaron delecciones sistemáticas del receptor β_2 -adrenérgico en residuos muy conservados dentro de la familia de receptores adrenérgicos y evaluaron sus efectos tanto en la unión del agonista como en la estimulación de la adenilato ciclasa. Los resultados de estos experimentos demostraron que los

dominios citoplásmicos de las hélices transmembranales V, VI y VII del receptor determinan no sólo el acoplamiento a la proteína Gs, sino también su especificidad.

Otra característica que comparte el receptor β -adrenérgico con la rodopsina es la presencia de algunos residuos de cisteína, que son modificados covalentemente por palmitoilación, lo que parece tener un papel importante en la expresión apropiada de ambos receptores en la superficie celular (59,60).

Las comparaciones entre la rodopsina y los receptores adrenérgicos, en especial el subtipo β_2 , han sido muy útiles en el diseño de modelos estructurales y funcionales de los receptores acoplados a las proteínas G. La similitud en la estructura molecular de estos receptores refleja analogías importantes, no sólo en su arreglo topológico, sino también en su función y en la regulación de sus actividades.

REGULACION DE LA FUNCION DE LOS RECEPTORES β -ADRENERGICOS

En términos generales todos los sistemas de transducción son sujetos de regulación. Específicamente se ha reconocido que muchos receptores por sí mismos se encuentran dinámicamente regulados, ya que después de la estimulación prolongada de un receptor por una hormona, se observa una disminución en la respuesta celular, a pesar de la presencia de un estímulo de intensidad constante. Este proceso adaptativo, llamado desensibilización o taquifilaxia, es un proceso biológico de enorme importancia porque limita significativamente el uso clínico y

terapéutico de muchas hormonas y drogas (61).

En los últimos años, se han realizado importantes progresos en la comprensión del mecanismo molecular de la desensibilización del receptor β -adrenérgico acoplado estimulatoriamente a la adenilato ciclasa. En principio, la desensibilización puede ser separada por el criterio de temporalidad en desensibilización a tiempos cortos y a tiempos largos. La desensibilización a tiempos largos se caracteriza por un decremento en el número total de receptores o "down regulation", después de algunas horas en presencia de un estímulo constante, y cuya recuperación requiere de la síntesis *de novo* de dichos receptores. En contraste, en la desensibilización a tiempos cortos ocurre una rápida disminución de la respuesta celular, a los pocos minutos de exposición al estímulo desensibilizante, la cual se recupera en algunos casos poco después de eliminar el estímulo aún sin la síntesis de proteínas (62).

1. DESENSIBILIZACION A TIEMPOS CORTOS

Los mecanismos de desensibilización del receptor β -adrenérgico a tiempos cortos, parecen ser múltiples; en algunos casos se observa una disminución en la respuesta celular únicamente al estímulo original o desensibilizante, mientras que en otros, la reducción en la respuesta celular no sólo afecta al estímulo desensibilizante, sino de igual forma a otros estímulos hormonales y a nucleótidos de guanina. El tipo de desensibilización específico para una hormona se denomina desensibilización homóloga, mientras que el que incluye una disminución en la respuesta celular a una

variedad de estímulos se denomina desensibilización heteróloga (63).

La utilización de un gran número de modelos celulares, entre los que podemos incluir sistemas *in vivo* como hepatocitos en cultivo (64) o frescos (65), o bien diversas líneas celulares transformadas como las del linfoma de ratón S-49 (91), las células C62-B de glioma humano (66) y recientemente las del carcinoma epidérmico humano A-431 (89), han permitido un enorme avance en la comprensión de los procesos de desensibilización.

Los estudios iniciales sobre los mecanismos de desensibilización de la enzima adenilato ciclasa en respuesta a catecolaminas se realizaron básicamente en dos modelos celulares: en el eritrocito de rana y en el eritrocito de pavo. Estos dos modelos celulares se emplearon porque se consideraba que el tipo de desensibilización era específico para un sistema particular. Sin embargo, hoy en día se reconoce que este fenómeno no sólo se observa en organismos tan diferentes como las bacterias y los mamíferos, sino que también los dos tipos de desensibilización pueden ocurrir simultáneamente en un mismo tipo celular.

a) DESENSIBILIZACION HOMOLOGA

La primera evidencia como una explicación al fenómeno de desensibilización del sistema β -adrenérgico viene de los estudios hechos *in vivo* por Mukherje et al. en 1975 (67). En ese trabajo se demostró que la administración crónica de catecolaminas a ranas provoca una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa

hasta de un 75%, que correlaciona con una disminución en el pegado del antagonista β -adrenérgico dihidroalprenolol [$^3\text{H-DHA}$].

Al año siguiente, Mickey et al. (68) observaron una disminución muy similar en la asociación del ligando, en ensayos de desensibilización *in vitro* utilizando el mismo modelo. Sin embargo, su estudio fue más detallado y demostró que esta disminución en el pegado de [$^3\text{H-DHA}$] es el resultado de una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos en la membrana plasmática y no un cambio en la afinidad del ligando por el receptor.

Por su parte, Su et al. (69,70) mostraron que el proceso de desensibilización β -adrenérgica ocurría en una serie de pasos. Observaron que en células del astrocitoma humano 1321N y del linfoma S-49 de ratón hay un desacoplamiento inicial del receptor β -adrenérgico del resto de los elementos del sistema de la adenilato ciclasa, lo que resulta en una pérdida en la capacidad del receptor para estimular a la adenilato ciclasa. Este proceso de desacoplamiento puede ser medido como un cambio en la habilidad de un ligando para unirse a un receptor, ya que los receptores desacoplados pierden la capacidad de formar el complejo ternario hormona-receptor-Gs. Como un resultado de este proceso, la unión del agonista ocurre solamente a altas concentraciones, es decir, el receptor muestra baja afinidad por su ligando y al mismo tiempo ocurre una pérdida en la sensibilidad a los nucleótidos de guanina. En este primer paso de la desensibilización, el número de receptores que aparecen en la membrana no ha sido alterado. Sólo después de este proceso ocurre una pérdida en el número de

receptores que se encuentran en la membrana plasmática.

En 1979 Chuang y Costa (71) recuperaron una pequeña parte de los receptores perdidos de la membrana plasmática en una fracción citósolica de la célula, a los que denominaron receptores solubles. En un trabajo posterior (72) observaron que los receptores que se habían internalizado no estaban propiamente solubles, sino más bien asociados a marcadores lisosomales, y atribuyeron que la pequeña recuperación de receptores, en relación al total de receptores perdidos en la membrana plasmática, se debía a que el resto de estos ya habían sido procesados dentro de la célula.

Usando el modelo de eritrocito de rana, Stadel et al. (95) recuperaron casi el 85% de los receptores perdidos de la membrana plasmática durante el proceso de desensibilización, en una serie de vesículas embebidas en esta membrana y orientadas hacia los otros elementos de la adenilato ciclasa. Sin embargo, en este trabajo, en controversia a lo propuesto por Su et al. (69,70), se observó que los receptores contenidos en estas vesículas no se encuentran alterados ni son procesados dentro de la célula.

Posteriormente Strulovici et al. en 1983 (75), por medio de un ingenioso experimento en donde fusionaron a las vesículas conteniendo a los receptores β -adrenérgicos con células de eritrocito de *Xenopus laevis* -que tienen todos los elementos del sistema de la adenilato ciclasa a excepción del receptor β -adrenérgico- mostraron que los receptores contenidos en estas vesículas son funcionalmente activos.

Mas tarde, Strasser et al. (76) observaron que en el pulmón de rata, en contraste con lo observado en los eritrocitos de rana, el proceso de desensibilización provoca un completo desacoplamiento del receptor con los demás elementos de la adenilato ciclasa. Sin embargo ya desde 1981, Doss et al. (77) estudiando la recuperación del estado desensibilizado, habían mostrado que los eventos relacionados con la desensibilización parecían depender del modelo con el que se trabajaba.

Strulovici et al. (78) encontraron que durante el proceso de desensibilización ha medida que los receptores β -adrenérgicos desaparecen de la membrana plasmática comienzan a aparecer en las vesículas. De manera opuesta, cuando el agente desensibilizante es eliminado del medio ambiente celular, los receptores reaparecen en las membranas, mientras que desaparecen de las vesículas membranales, incluso en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida). Es decir, los receptores parecen llevar a cabo un proceso de reciclamiento asociado al proceso desensibilización/resensibilización.

Posteriormente, Strulovici et al. (79) y Kassis et al. (80), utilizando el receptor β -adrenérgico purificado de células desensibilizadas en sistemas de reconstitución, demostraron el desacoplamiento funcional del receptor con los demás elementos, dando la primera evidencia de que el receptor parece ser modificado covalentemente durante el proceso de desensibilización.

La fosforilación parecía ser el candidato ideal para esta modificación. Ya que muchas actividades catalíticas son reguladas

por reacciones de fosforilación-desfosforilación, era posible que de igual forma se regulara la función de los receptores. De hecho, la fosforilación de la rodopsina por la rodopsina cinasa había sido demostrada por Kuhn y Dreyer desde 1972 (81).

En 1985 Sibley et al. (82), utilizando los eritrocitos de rana, mostraron la fosforilación del receptor β -adrenérgico inducida por el agonista. Dicha fosforilación era específica del agonista y con una relación estequiométrica de dos moles de fosfato por mol de receptor.

Benovic et al. (83) demostraron en 1985 la fosforilación del receptor β -adrenérgico por la proteína cinasa A *in vitro*, lo que provocaba una reducción en la habilidad del receptor ocupado por el agonista para estimular la actividad de GTPasa de Gs. Esto significaba que únicamente era necesario un aumento en los niveles de AMPc para que presumiblemente se llevara a cabo la fosforilación del receptor β -adrenérgico y la consecuente desensibilización del sistema de la adenilato ciclasa.

Sin embargo, en 1986 Strasser et al. (74) propusieron que esta fosforilación tendría que estar catalizada por una enzima diferente a la PKA, basándose en las dos siguientes observaciones: 1) La prostaglandina E_1 (PGE_1), una hormona que aumenta los niveles intracelulares de AMPc en eritrocitos de rana, no provoca la fosforilación del receptor β -adrenérgico. 2) Las líneas mutantes de las células del linfoma de ratón S-49, que son deficientes en la proteína Gs (mutante *cyc'*) o en la proteína cinasa A (mutante *kin'*), muestran el mismo nivel de fosforilación inducido por el agonista,

que las células silvestres. Estas observaciones y el hecho de que el curso temporal y el grado de fosforilación y desensibilización eran idénticos en las líneas mutantes y la silvestre de las células S-49 sugerían que una cinasa diferente a la PKA, de naturaleza aun no definida, estaba involucrada en la fosforilación del receptor β -adrenérgico durante el proceso de desensibilización.

Utilizando lisados de la mutante kin' de las células S-49 Cerione et al. (85) observaron una clara actividad de cinasa, usando como sustrato el receptor β -adrenérgico purificado y reconstituido en vesículas lipídicas. Únicamente en el citosol de estas células, se encontraba esta actividad y lo más interesante era que sólo podía fosforilar la forma del receptor ocupada por el agonista.

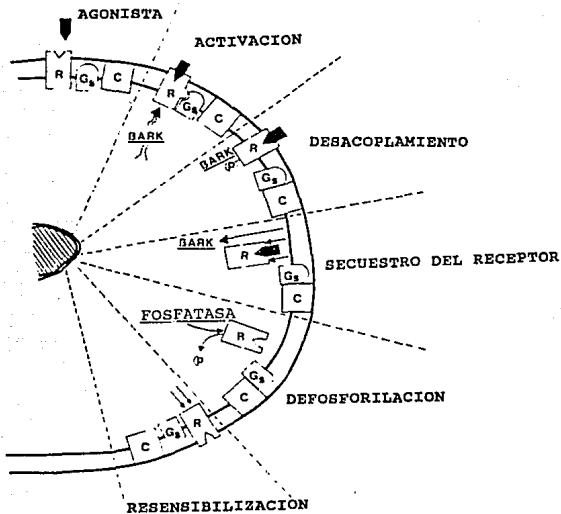
Posteriormente, Benovic et al. (86) identificaron una proteína cinasa independiente de AMPc que parecía estar involucrada en la fosforilación del receptor β -adrenérgico. Esta enzima, denominada la cinasa del receptor β -adrenérgico o β -ARK (por sus siglas en inglés), está presente en muchos tejidos de mamíferos y parece ser exclusivamente citosólica, aunque se ha demostrado que algunos agonistas inducen la translocación de esta enzima del citosol a la membrana (88). La actividad de esta cinasa es insensible a GMPC, a Ca^{2+} , al complejo Ca^{2+} /calmodulina, a fosfolípidos y a ésteres de forbol y no fosforila sustratos tan generales de las cinasas como la caseína y las histonas. Sin embargo, presenta una propiedad inusual en las cinasas, ya que fosforila únicamente la forma del receptor ocupada por el agonista, mientras que la forma del

receptor no ocupada o la ocupada por un antagonista no son sustrato para la β -ARK.

Para el año de 1987, Benovic et al. (87) obtuvieron una preparación purificada aproximadamente 20,000 veces de esta enzima y observaron que migra como una única banda de aproximadamente 80 kDa en geles de SDS-poliacrilamida.

Con la identificación de la β -ARK, Sibley et al. (84) presentaron un modelo correlacionando los eventos moleculares que podrían estar involucrados en la desensibilización homóloga del receptor β -adrenérgico. En dicho modelo se proponía que la estimulación de los receptores β -adrenérgicos por un agonista no sólo activa a la adenilato ciclasa, sino que también induce la translocación de la β -ARK del citosol a la membrana plasmática, en donde fosforila y desacopla funcionalmente a los receptores de los demás elementos del sistema de la adenilato ciclasa. Casi inmediatamente, los receptores son secuestrados o internalizados dentro de las células hacia partículas membranales de muy baja densidad o vesículas (aunque la naturaleza exacta de este compartimiento y el mecanismo de translocación del receptor, no se conocen), en donde los receptores son desfosforilados, por una posible fosfatasa asociada. Una vez que el agonista se elimina, los receptores son redistribuidos hacia la membrana plasmática, donde reasumen sus funciones normales (ESQUEMA 4).

Aunque todas las evidencias eran muy claras y apuntaban un papel muy importante para la β -ARK, no fue sino hasta 1989 cuando utilizando células permeabilizadas del carcinoma epidérmico A-431



ESQUEMA 4. MODELO SOBRE LOS EVENTOS MOLECULARES ASOCIADOS CON LA DESENSIBILIZACION HOMOLOGA DEL RECEPTOR β -ADRENERGICO. Propuesto por Sibley et al. 1987. (R) receptor β -adrenérgico, (Gs) proteína G estimuladora de la adenilato ciclasa, (C) adenilato ciclasa y (β -ARK) proteína cinasa específica del receptor β -adrenérgico.

se demostró que la desensibilización podía prevenirse utilizando algunos inhibidores de esta enzima, como la heparina y algunos péptidos sintéticos derivados de la región intracelular del receptor β -adrenérgico (89).

b) DESENSIBILIZACION HETEROLOGA

En contraste a la situación observada durante el proceso de desensibilización homóloga, en el sistema del eritrocito de pavo (90) y en algunas líneas celulares como el linfoma de ratón S-49 (91) se observaba un proceso de desensibilización totalmente diferente después de una previa exposición a los agonistas β -adrenérgicos.

En general, en los eritrocitos de ave se observaban cambios significativos en la actividad de la proteína Gs al ser estimulada por nucleótidos de guanina o NaF como un resultado de la desensibilización (90,92).

Posteriormente, Stadfel et al. (93) y Simpsons et al. (92) mostraron que esta disminución en la actividad de Gs en células desensibilizadas era imitada por análogos del AMPc como el 8-bromo-AMPc y el dibutiril-AMPc. Tanto la desensibilización inducida por el agonista como la promovida por nucleótidos cíclicos se deben a un desacoplamiento funcional del receptor β -adrenérgico, como lo probó su incapacidad para formar el complejo agonista-receptor-Gs de alta afinidad, sensible a nucleótidos de guanina.

Desde este punto de vista, dos moléculas podrían estar involucradas en el desacoplamiento, tanto el receptor como la

proteína Gs. Inicialmente Stadel et al. (94) consideraron el receptor y utilizando una prueba de marcaje por fotoafinidad demostraron que los receptores de células desensibilizadas muestran un patrón de migración diferente en geles de SDS-poliacrilamida, en comparación con los receptores de células control. De hecho, el curso temporal de la alteración en la movilidad del receptor correlaciona con el de la disminución en la actividad de la adenilato ciclasa. De la misma forma el análogo del AMPc produce este cambio en la movilidad del receptor, al mismo grado que el inducido por la preincubación con las catecolaminas (95). En 1983, Stadel et al. (96) observaron que este cambio en la movilidad del receptor β -adrenérgico se debe a la fosforilación del receptor.

Algunos estudios posteriores con este sistema (97) mostraron que existía una fuerte correlación entre el curso temporal, la concentración efectiva de la hormona que provoca la desensibilización y la fosforilación del receptor. Y de hecho Strulovici et al. (79) encontraron que el receptor β -adrenérgico desensibilizado pierde entre un 40-50% de su habilidad para acoplarse a un sistema de reconstitución heterólogo, comparable a su disminución funcional observado en su medio ambiente membranal original. Estos datos sugerían que la desensibilización heteróloga podría ocurrir a nivel del receptor, en un efecto regulatorio de feedback mediado por proteína cinasa A.

Por otra parte, Bouvier et al. (98) y Kelleher et al. (99) observaron que la proteína cinasa C es capaz de fosforilar el receptor β -adrenérgico. De hecho, los ésteres de forbol, compuestos

que activan a la proteína cinasa C, estimulan la fosforilación del receptor β -adrenérgico e inducen la desensibilización de la adenilato ciclasa en eritrocitos de aves.

Además de las alteraciones observadas en los receptores β -adrenérgicos, los cambios observados en la actividad de la proteína Gs, indicaban que una alteración en esta proteína podría estar involucrada en este proceso de desensibilización. De hecho Briggs et al. en 1983 (100) observaron alteraciones funcionales en la proteína Gs durante el proceso de desensibilización. Con el propósito de demostrar que esta alteración funcional puede ser atribuida a una modificación covalente de la proteína Gs, Ross et al. (101) utilizando la línea mutante *cyc* de las células del linfoma de ratón S-49, un tipo celular que genéticamente es deficiente en Gs, demostraron que la proteína Gs aislada de células desensibilizadas no reconstituye la actividad total en un sistema de reconstitución heterólogo, indicando que en la desensibilización heteróloga la proteína Gs parece estar modificada covalentemente. Sin embargo no demostraron qué tipo de modificación molecular podría causar esta alteración funcional. En relación con estos datos, Hernández-Sotomayor et al. (140) demostraron que el tratamiento con ésteres de forbol produce una disminución en el marcaje de Gs catalizado por la toxina del cólera.

Ya que el AMPc y sus análogos como el db-AMPc son capaces de inducir la desensibilización heteróloga, la fosforilación mediada por la cinasa dependiente de AMPc de alguna subunidad de Gs podría ser la responsable de esta pérdida en la funcionalidad de la

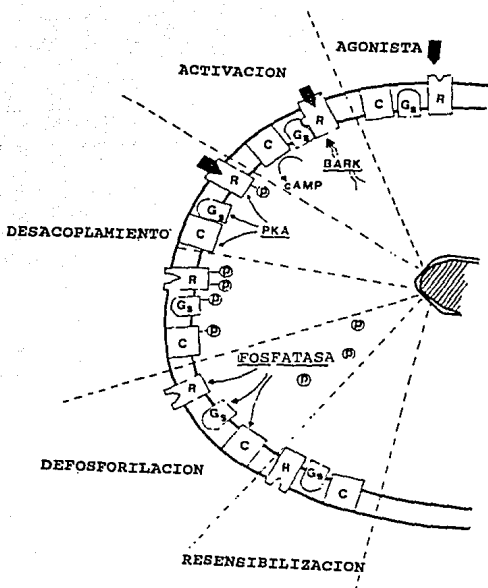
proteína. Algunos datos indican que de las subunidades de la proteína Gs, aparentemente la que es un sustrato para varias cinasas es la subunidad α . De hecho se ha demostrado que la transducina o G_t en el sistema visual, que presenta una enorme homología con Gs, parece ser sustrato de múltiples cinasas (102).

Por otra parte, G_i podría también intervenir en el proceso de desensibilización heteróloga. De hecho Rich et al. (103) reportaron que en células MDCK, durante el proceso de desensibilización heteróloga β -adrenérgica inducida por glucagon, no había ninguna alteración en Gs, sino más bien los niveles aparentes de G_i eran aumentados, por lo que alguna alteración en la relación Gs/G_i podría ser un mecanismo potencial por el cual se lograra la regulación de la respuesta β -adrenérgica. Otro mecanismo de regulación podría estar dado por la fosforilación de G_i. Katada et al. (104) demostraron que la proteína cinasa C fosforila a la proteína G_i purificada *in vitro*. Esta fosforilación ocurre en la subunidad α -G_i, y es favorecida si las subunidades β y se encuentran disociadas de la subunidad α . Sin embargo, aunque no existen evidencias de la fosforilación de G_i en células intactas como resultado de la prolongada estimulación β -adrenérgica, es importante hacer notar que Heyworth et al. (105) y Hernández Sotomayor et al. (106) han demostrado que la toxina pertussis puede bloquear el proceso de desensibilización heteróloga inducida por glucagon o por ésteres de forbol.

Como ya había mencionado, la desensibilización heteróloga involucra una disminución en la respuesta no sólo a un gran número

de hormonas, sino también a otra clase de activadores del sistema de la adenilato ciclasa como la forskolina, por lo que parecía razonable considerar a la adenilato ciclasa por sí misma como sujeto de regulación. De hecho, Yoshimasa *et al.* (107) encontraron que la proteína cinasa C podía fosforilar la adenilato ciclasa purificada, *in vitro*. Cuando las moléculas de adenilato ciclasa fosforiladas fueron reconstituidas en vesículas de fosfolípidos con Gs purificada, se observó un decremento hasta de un 40% en la actividad de la enzima en presencia de GTP o el análogo no hidrolizable Gpp(NH)p. Sin embargo, no existen evidencias de que esta fosforilación de la subunidad catalítica por PKA ocurra *in vivo*.

Todas estas evidencias llevaron a Strasser (108) a proponer un modelo que describía la variedad de posibles mecanismos involucrados en este fenómeno, en donde asumía que la fosforilación de los elementos del sistema, incluyendo a los receptores β -adrenérgicos, Gs e incluso la adenilato ciclasa, por la proteína cinasa dependiente de AMPc era la causa en la disminución de la respuesta celular durante el proceso de desensibilización heteróloga. Por otra parte, sugería que la cinasa del receptor β -adrenérgico o β -ARK podría tener algún papel importante durante la desensibilización heteróloga, ya que existían algunos datos que mostraban que la respuesta a la hormona desensibilizante es reducida más efectivamente que la respuesta al estimulador heterólogo (ESQUEMA 5).



ESQUEMA 5. MODELO SOBRE LOS EVENTOS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN LA DESENSIBILIZACION HETEROLOGA DEL RECEPTOR β -ADRENERGICO. Propuesto por Strasser 1989 (R) receptor β -adrenérgico, (Gs) proteína G estimuladora, (C) adenilato ciclasa, (PKA) proteína cinasa dependiente de AMPc, (B-ARK) cinasa del receptor β -adrenérgico.

c) DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR LA CONCENTRACION DEL AGONISTA.

Históricamente, la separación del fenómeno de desensibilización en los tipos homólogo y heterólogo ha permitido comprender que una combinación de procesos mediados por la proteína cinasa A, la β -ARK y el secuestro de los receptores β -adrenérgicos participan en el proceso de desensibilización. Sin embargo, era claro que el fenómeno de desensibilización era mucho más complejo, ya que en muchos tipos celulares se observaba sobrelapamiento de los procesos. Y sobre todo, ya desde 1984 Kassir et al. (109) habían propuesto que el tipo de desensibilización no era específico del tipo celular, sino que ambos procesos pueden ocurrir en una misma célula bajo diferentes condiciones.

Algunas evidencias iniciales sobre las propiedades de la desensibilización en células silvestres del linfoma de ratón S-49, llevaron a Clark et al. (91) a proponer que la desensibilización inducida por el agonista involucraba dos procesos separados. El primer proceso ocasionaba una desensibilización heteróloga dependiente de AMPc y de la actividad de la PKA y era únicamente activo cuando las células eran pretratadas con bajas concentraciones del agonista. El segundo proceso, el cual ocasionaba una desensibilización homóloga, independiente de AMPc y de la PKA, era mediado por la fosforilación del receptor β -adrenérgico por la β -ARK y requería niveles mucho mayores de la hormona. Dicha fosforilación del receptor posiblemente era la señal para que ocurriera la internalización de este receptor. Además, sugería que la fosforilación por la β -ARK tenía sitios de

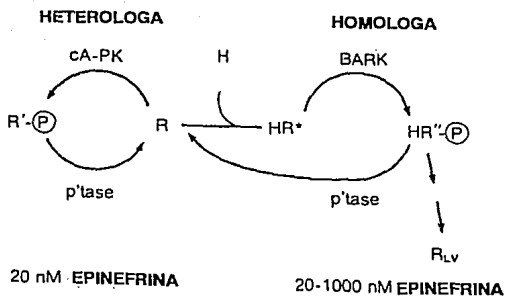
fosforilación diferentes a los de la proteína cinasa A, lo que provocaba que únicamente la fosforilación por la β -ARK llevara a la internalización del receptor (ESQUEMA 6).

Dolhman et al. (51) mostraron que en el receptor β -adrenérgico existen dos secuencias RRSS, la secuencia consenso para la fosforilación por PKA, una en la tercera asa citoplásmica y otra en la porción proximal del extremo carboxilo terminal del receptor, mientras que los sitios potenciales de fosforilación por la β -ARK se encuentran en una región rica en serinas y treoninas en la porción distal del extremo carboxilo (ESQUEMA 7).

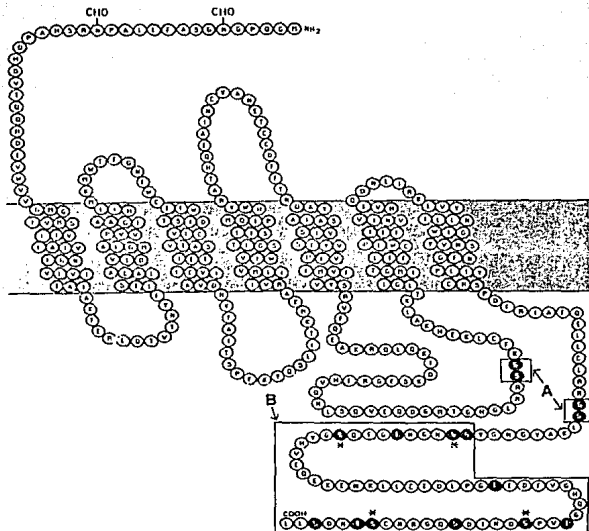
Liggett et al. (110) demostraron por estudios de mutagénesis dirigida que la tercera asa citoplásmica del receptor, así como la región proximal del extremo carboxilo terminal, están involucradas en el acoplamiento a Gs.

Posteriormente Hausdorff et al. (111) construyeron una serie de mutantes, en las cuales todos los sitios potenciales de fosforilación del receptor β -adrenérgico fueron eliminados. En las mutantes tipo A los sitios de fosforilación para la PKA fueron removidos por mutagénesis dirigida, mientras que en las mutantes tipo B, se eliminaron los sitios de fosforilación por β -ARK. Las mutantes denominadas AB carecían de todos los sitios de fosforilación.

Los receptores mutados fueron transfectados a fibroblastos de hamster, donde se unían a su ligando y activaban a la adenilato ciclasa de manera similar a los receptores sin mutación. La desensibilización del sistema fue inducido a concentraciones altas



ESQUEMA 6. MODELO DEL PROCESO DE DESENSIBILIZACION PROPUESTO POR CLARK Y COLBS. 1988. Las abreviaturas utilizadas son (R) receptor, (H) hormona, (P) grupo fosfato, (p'tase) fosfatasa, (cA-PK) proteina cinasa dependiente de AMPc, (B-ARK) cinasa del receptor β -adrenérgico, (R_{Lv}) receptor internalizado en vesiculas.



ESQUEMA 7. LOCALIZACION DE LOS SITIOS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR β_2 -ADRENERGICO. La localización de los sitios potenciales de fosforilación por la PKA y la β -ARK son indicados por (A) y (B) respectivamente.

(del orden micromolar) y bajas (del orden nanomolar) del agonista, preincubando únicamente por 5 minutos. A altas concentraciones del agonista, las mutantes A y B muestran aproximadamente un 50% de reducción en la fosforilación estimulada por el agonista, que correlaciona con una disminución en la desensibilización del sistema en comparación con el control. Las mutantes AB muestran casi un 90% de reducción en la fosforilación y una disminución dramática en el proceso de desensibilización. Por el contrario, cuando se utilizan bajas concentraciones del agonista, únicamente las mutantes A y las mutantes AB, muestran una disminución tanto en la fosforilación del receptor como en la desensibilización, lo que no se observa en las mutantes B.

En 1989 Clark *et al.* (112), utilizando también técnicas de mutagénesis dirigida sobre los receptores β -adrenérgicos, mostraron que de las 2 secuencias consenso para la fosforilación mediada por PKA, una en los residuos 259-262 y otra en los residuos 343-348, sólo se requiere la primera, localizada en la tercera asa citoplásmica, para la desensibilización del receptor β -adrenérgico en respuesta a bajas concentraciones del agonista.

Por otra parte, como ya habíamos mencionado, Lohse *et al.* (89) había desarrollado un método de permeabilización de células del carcinoma epidérmico humano A-431, que no afectaba la generación de AMPc ni el proceso de desensibilización, lo que permitía la introducción de inhibidores relativamente específicos, tanto de la PKA como de la β -ARK. Utilizando este método, Lohse *et al.* (113) probaron la capacidad del PKI (un péptido sintético inhibidor de la

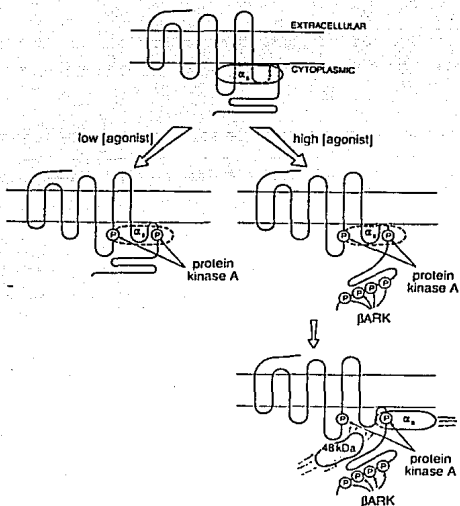
PKA) y concentraciones nanomolares de heparina (que inhibe específicamente a la β -ARK) para evitar la desensibilización en respuesta a bajas y altas concentraciones del agonista. En consistencia con el modelo propuesto por Clark et al. (112), los autores concluyeron que sólo la PKA regulaba los efectos desensibilizantes inducidos por niveles nanomolares del agonista. Mientras que a concentraciones mayores del agonista, del orden micromolar, tanto la PKA como la β -ARK, estaban involucradas en el proceso de desensibilización. Sin embargo, a diferencia de Clark (112), ellos proponían que el secuestro del receptor era un mecanismo independiente de la fosforilación, ya que la contribución de este proceso, sólo se hacía obvia cuando se evitaba totalmente la fosforilación, por lo que los autores proponían que el secuestro del receptor aparentemente no tenía un papel relevante en el proceso de la desensibilización.

Lefkowitz et al. (114) propusieron que la separación del fenómeno de desensibilización en sus tipos homólogo y heterólogo podría ser más bien artificial y sin ninguna implicación fisiológica. De esta manera, propusieron un modelo de desensibilización inducida por diferentes concentraciones del agonista, en donde la unión del agonista al receptor provoca la activación de Gs y la adenilato ciclasa, lo que resulta en la elevación de los niveles de AMPc. A bajas concentraciones del agonista, la proteína cinasa A es activada y se encarga de fosforilar en uno o los dos sitios del receptor involucrados en el acoplamiento a Gs, lo que introduce un grupo fosfato con carga

negativa en esta porción del receptor que impide el acoplamiento con α -Gs. Por el contrario, a concentraciones altas del agonista, cuando virtualmente todos los receptores se encuentran ocupados por el agonista, es necesaria la acción concertada de la PKA y de la β -ARK, lo que produce una profunda pérdida en la respuesta aparente de la célula en condiciones de desensibilización a tiempos cortos. Aunque aparentemente la fosforilación por ambas cinasas era suficiente para romper el acoplamiento del receptor β -adrenérgico con α -Gs, no se descartaba la posibilidad de que algún factor citosólico participara en el proceso de desensibilización (ESQUEMA 8).

Desde la purificación de la β -ARK, ya se había observado que cuando se utilizaban preparaciones crudas de esta enzima el receptor β -adrenérgico era fosforilado adecuadamente, de tal manera que perdía su capacidad de acoplarse a Gs. Sin embargo, el receptor fosforilado con preparaciones purificadas de la β -ARK se acoplaba de manera casi normal a Gs (87). Esto llevó a la conclusión de que un factor citosólico crucial, era perdido durante la purificación de la cinasa. La posibilidad de la existencia de tal cofactor, tomó más fuerza al considerar las analogías que se han observado entre el sistema visual y el del receptor β -adrenérgico acoplado a la adenilato ciclasa.

En el sistema visual, la fosforilación del receptor por una cinasa específica denominada rodopsina cinasa resulta en una ligera inactivación de la rodopsina, sólo que una vez fosforilada, se promueve la unión de una proteína de 48 kDa denominada arrestina,



ESQUEMA 8. MODELO DEL PROCESO DE DESENSIBILIZACION A TIEMPOS CORTOS INDUCIDO POR DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL AGONISTA. Propuesto por Lefkowitz et al. 1990. Las abreviaturas utilizadas son: (α_s) subunidad α de la proteína reguladora Gs, (PKA) proteína cinasa A, (β -ARK) proteína cinasa específica del receptor β -adrenérgico.

lo que verdaderamente provoca la inactivación o desacoplamiento total de la rodopsina con la transducina. Aparentemente, la arrestina inhibe competitivamente la interacción del receptor visual con la transducina, por lo que el factor que se pierde durante la purificación de la β -ARK, podría ser la arrestina o bien un factor muy similar. La arrestina retinal, por sí misma, no podía ser el factor que se pierde durante la purificación, porque se había observado que se requerían grandes cantidades de arrestina para provocar únicamente una modesta inhibición (87). Esta observación sugería que una proteína muy similar a la arrestina podía ser la que inactivara la forma fosforilada del receptor β -adrenérgico. Por otra parte Mirshahi et al. (115) habían observado inmunorreactividad positiva contra la arrestina en algunos tejidos diferentes a la retina.

Con estos antecedentes Lohse et al. (116), utilizando como sonda el cDNA que codifica para la arrestina, encontraron en una biblioteca genómica de cerebro de bovino, una proteína homóloga que podía tener la misma función que la arrestina en el sistema β -adrenérgico. El cDNA que hibridizó con la sonda de la arrestina fue aislado y secuenciado, encontrándose que codifica para una proteína que tiene casi el 60% de homología con la arrestina.

Para evaluar las propiedades funcionales de esta proteína, los cDNA tanto de la arrestina como el de la proteína homóloga fueron insertados en el sistema de expresión transitorio de las células COS. Posteriormente, se tomaron extractos citosólicos de estas células y se probaron en un sistema de reconstitución conteniendo

el receptor β -adrenérgico y Gs. Los extractos conteniendo la proteína homóloga fueron mucho más efectivos que los que contenían la arrestina en lograr el desacoplamiento entre el receptor β -adrenérgico y Gs. Las potencias relativas de ambos extractos citosólicos se invierten cuando se prueban en un sistema visual reconstituido, conteniendo la rodopsina fosforilada. Con lo que se demostró, la especificidad de esta nueva proteína, a la que se denominó β -arrestina por su analogía con el sistema visual.

La secuencia de aminoácidos de la β -arrestina reveló cinco regiones que muestran homología con diversas subunidades α de diferentes proteínas G. Estas homologías podrían permitirle a la β -arrestina imitar a las proteínas G y de esta manera unirse al receptor y competir con Gs. Por otra parte, la distribución de los RNA mensajeros de la β -arrestina es muy similar a la de los mensajeros de la β -ARK (116,117).

Por otra parte, algunos estudios desarrollados por Wagner et al. (118,119), monitoreando el proceso de inactivación de la transducina en células de la retina, han mostrado que una proteína del extracto soluble de estas células, acelera enormemente la inactivación por la arrestina de la señal proveniente de la rodopsina. Por lo que se propone que un factor soluble adicional actuando sinérgicamente con la arrestina podría ser requerido para la rápida inactivación de la rodopsina. Tomando en cuenta las homologías de la fototransducción y su proceso de inactivación con el receptor β -adrenérgico acoplado a la adenilato ciclasa, no sería extraño que un factor homólogo participara en la desensibilización

β -adrenérgica (120,121).

Estos últimos hallazgos parecen ser consistentes con el modelo descrito recientemente por Lefkowitz (114), en el cual la fosforilación del receptor β -adrenérgico por la acción concertada de la proteína cinasa A y la β -ARK se hace mucho más efectiva por la unión de la β -arrestina y quizá algún otro factor soluble al receptor, lo que bloquea el acoplamiento físico entre éste y Gs. Sin embargo, en este trabajo y en uno posterior de Hausdorff et al. (122) se sugiere que el secuestro del receptor β -adrenérgico no es un mecanismo importante, sino más bien un mecanismo auxiliar, en el proceso de desensibilización a tiempos cortos.

Algunas evidencias que sugieren que el secuestro o internalización del receptor β -adrenérgico podría no estar involucrado en el proceso de desensibilización derivan de algunos trabajos entre los que destacan el de Cornelia Hertel et al. (123), Box et al. (124) y el de Waldo et al. (125) en donde utilizando agentes farmacológicos que bloquean el secuestro de los receptores (óxido de fenilarseno, bromoacetil-alprenolol-metano y la concanavalina A, respectivamente) no se observa ningún efecto aparente sobre la desensibilización de la adenilato ciclasa.

Por otra parte, Waldo et al. (125) han observado que incluso se comienzan a notar los efectos de la desensibilización aún cuando no se ha iniciado el secuestro de los receptores β -adrenérgicos. Por último, algunas evidencias aportadas por Bouvier et al. (126) muestran que algunas mutantes del receptor β -adrenérgico, que no pueden desensibilizarse, siguen siendo secuestradas de manera

normal.

En controversia con estos datos Cheung et al. (127) han encontrado que en una serie de mutantes del receptor β -adrenérgico que carecen de todos los sitios potenciales de fosforilación, existe una enorme correlación entre el secuestro del receptor y la desensibilización de la adenilato ciclasa.

Por otra parte, en un trabajo muy reciente Zastrow y Kobilka (128), han demostrado la internalización de los receptores β -adrenérgicos, utilizando técnicas de microscopía confocal y anticuerpos dirigidos contra el dominio carboxilo terminal de los receptores β -adrenérgicos. Dicha internalización es regulada por la presencia del agonista y es un mecanismo independiente de la síntesis de proteínas.

De esta manera, es claro que el fenómeno de desensibilización β -adrenérgica aún no puede ser atribuido de manera precisa a un único fenómeno, sino más bien parece que existen mecanismos alternos que permiten dar diferentes respuestas, dependiendo no sólo de las condiciones extracelulares, sino incluso del tipo celular.

Lohse et al. (113) han sugerido que la existencia de las dos cinasas que regulan la fosforilación del receptor β -adrenérgico en respuesta a diferentes niveles de la hormona podrían reflejar respuestas específicas a diferentes condiciones fisiológicas. Es decir, el mecanismo de desensibilización que involucra a la proteína cinasa A podría ser operativo principalmente en tejidos periféricos que responden a concentraciones circulantes de la

hormona epinefrina. Este proceso requeriría algunos pasos, incluyendo la disociación de la proteína Gs, la activación de la adenilato ciclasa, la difusión del AMPc y su unión a la PKA, para separar las subunidades regulatorias de las catalíticas y finalmente la fosforilación del receptor, lo que posiblemente lo haría un proceso "lento" (minutos), pero adecuado para las condiciones que se dan en los tejidos periféricos.

En contraste, la fosforilación del receptor mediada por la acción de la cinasa A y la β -ARK sería funcionalmente importante en regiones donde los receptores adrenérgicos estuvieran expuestos a niveles muy altos de catecolaminas como en las sinapsis neurales, en donde la liberación rápida de altas concentraciones del neurotransmisor requeriría un proceso de regulación de la respuesta mucho más rápido que el que se necesitaría en tejidos no inervados. Entre las evidencias que apoyan esta proposición, se encuentran los trabajos de Lohse et al. (116) y Benovic et al. (117) que observaron altos niveles de transcripción de la β -ARK y la β -arrestina en tejidos muy inervados como el cerebro, corazón y los pulmones en contraste con los tejidos muy poco inervados como el hígado, bazo, etc.

Por otra parte, Zastrow y Kobilka (128) han considerado la posibilidad de que la regulación de los receptores pudiera ser diferente para cada tipo celular. De hecho, previamente se había sugerido que la desensibilización mediada por el secuestro o internalización del receptor podría ser importante en tejidos en donde el número de receptores es muy bajo. De esta manera, la

regulación específica del tipo celular podría ser una posibilidad muy interesante para ser considerada, aunque no parece ser la solución a la enorme heterogeneidad de observaciones realizadas sobre la desensibilización, ya que en muchos casos se han obtenido conclusiones totalmente opuestas utilizando una misma línea celular.

2. DESENSIBILIZACION A TIEMPOS LARGOS

Mientras que el proceso de desensibilización rápida termina al cabo de unos cuantos minutos y es fácilmente reversible si el estímulo desensibilizante es eliminado, la exposición al agonista por un período mayor (horas) resulta en la pérdida total de los receptores β -adrenérgicos o "down regulation". Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan esta pérdida en el número de receptores no están aún bien caracterizados, aunque existen algunas evidencias que indican los procesos, algunos de los cuales son dependientes de AMPc, que contribuyen a esta pérdida total de los receptores.

En términos generales, la degradación proteolítica del receptor β -adrenérgico parece contribuir de manera significativa en este proceso. Esta conclusión se basa en el hecho de que la recuperación de los receptores es un proceso muy lento, que requiere de la síntesis *de novo* de los receptores (129).

La caracterización de los mecanismos involucrados en la degradación ha avanzado de manera importante por el uso de

variantes del receptor β -adrenérgico que tienen mutados sitios importantes para el acoplamiento con Gs o sitios de fosforilación por la PKA. En donde se ha observado que la unión del agonista y el correcto acoplamiento a Gs podrían exponer ciertos residuos críticos del receptor, que los transforma en sustratos adecuados para que algún componente, aún no identificado, lleve a cabo la degradación (130).

Por otra parte, algunos experimentos sugieren que la fosforilación del receptor por la PKA puede acelerar, aunque modestamente, la velocidad de degradación del receptor β -adrenérgico. Sin embargo no parece ser el mecanismo inicial en la degradación del receptor (131).

Quizá el impacto más importante del AMPc sobre la "down regulation" sea la reducción en los niveles del RNA mensajero del receptor β -adrenérgico, ya que cuando la expresión del gen de este receptor es evaluada durante la "down regulation", se observa un decremento importante en los niveles del RNA mensajero, que correlaciona con la pérdida en el número de receptores. Esta disminución en los niveles del mensajero, presumiblemente contribuye a la reducción global en el número de receptores y a la caída en la respuesta celular. Aparentemente esta condición se mantiene hasta que la recuperación de la "down regulation" comienza (132).

Existe una correlación importante entre la activación de la PKA y la reducción en los niveles del mensajero del receptor. Una posibilidad interesante es el hecho de que la PKA podría estar

participando en la fosforilación de algunos factores involucrados en la represión de la transcripción del gen del receptor o bien de algunos factores involucrados en la degradación selectiva del mensajero. Bouvier *et al.* (131) han propuesto que la desestabilización del mensajero es el mecanismo que esta involucrado en su disminución, aunque es demasiado aventurado proponer esta opción como un mecanismo general para la regulación del receptor β -adrenérgico.

Por otra parte, existen una serie de evidencias que indican que la expresión del receptor β -adrenérgico puede ser autorregulada, ya que la preincubación con agonistas β -adrenérgicos a tiempos cortos provoca un aumento transitorio en los niveles del mensajero. Este aumento aparentemente se debe a un incremento en la velocidad de transcripción del gen del receptor β -adrenérgico. Este evento parece ser dependiente de AMPc, ya que puede ser imitado por forskolina o bien por análogos permeables del AMPc (133).

El AMPc puede regular la transcripción de una gran variedad de genes a través de unas secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a AMPc (CRE) presentes en su región promotora. Este elemento es reconocido por una proteína que se le une, denominada CREB, un factor de transcripción de 43 kDa cuya habilidad para estimular la transcripción de sus genes blancos es regulada por fosforilación. De la misma forma una región 5' del gen del receptor β -adrenérgico puede conferir respuesta al AMPc a un gen reportero y esta actividad está localizada en el sitio CRE del promotor del gen de este receptor (134).

De esta manera, nos podemos dar cuenta que existen múltiples formas para evitar la sobre-estimulación del sistema del receptor β -adrenérgico, tanto a través de la desensibilización rápida como de la "down regulation", sin embargo, creo importante mencionar que aún falta mucho por aprender de este sistema de regulación. Quizá la limitante de los modelos que hasta hoy se han desarrollado radica en que nos hemos quedado cortos y en realidad una serie de mecanismos mucho más elaborados, en donde múltiples sistemas de señales intracelulares participan integrando la variedad de señales que se reciben a través de sus receptores, son los que finalmente logran este finísimo proceso de regulación.

Por último, me gustaría mencionar la posibilidad de la regulación específica de los receptores dependiendo del subtipo propuesta por Hausdorff et al. (122). Como ya se ha descrito existen tres subtipos de receptores β -adrenérgicos denominados β_1 , β_2 y β_3 . Aunque los tres subtipos muestran diferentes perfiles farmacológicos, los tres parecen acoplarse a la misma proteína Gs, y exhiben un alto nivel de homología en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, cada subtipo contiene un número distinto de sitios potenciales de fosforilación por la PKA (2,1 y 0 respectivamente) y además difieren en el tamaño de sus extremos carboxilo terminal. Mientras que los receptores β_1 y β_2 tienen 8-12 residuos de serina y treonina, el β_3 tiene únicamente 3 sitios potenciales de fosforilación por la β -ARK. Estas diferencias importantes en los sitios de fosforilación, sugieren que cada receptor es regulado en diferente grado y pueden responder, de

manera diferente bajo condiciones fisiológicas diversas.

De hecho, Zhou y Fishman (135) han mostrado que la preincubación de las células neurotumoraes SK-N-MC humanas que expresan únicamente el subtipo de receptor β_1 -adrenérgico, con agonistas β -adrenérgicos, no provoca una reducción en la respuesta máxima, sino más bien un desplazamiento hasta de 3 veces en su curva dosis-respuesta, en un proceso mediado por la PKA sin la participación de la β -ARK y proponen que estas diferencias en el proceso de desensibilización podrían deberse a las diferencias en la estructura del receptor.

De la misma forma Fevè (9) ha propuesto que el receptor β_2 -adrenérgico, el cual contiene muy pocos sitios potenciales de fosforilación por la β -ARK, y ninguno para la PKA, podría encargarse de mantener una mínima sensibilidad a catecolaminas después de la desensibilización de los otros dos subtipos, inducida por una prolongada exposición a altas dosis de catecolaminas.

Aunque no es del todo claro en qué forma la fosforilación participa en el proceso de desensibilización, la comparación de los procesos de desensibilización entre los tres subtipos de receptores, indudablemente nos permitirá aprender no solo sobre este proceso, sino quizá comprender por qué la naturaleza se ha encargado de proveer a los sistemas celulares de toda una gama de opciones moleculares.

ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado en la introducción, los recientes avances en la comprensión del fenómeno de la desensibilización parecen indicar que existen mecanismos alternos que permiten que una célula pueda dar diferentes respuestas, dependiendo no solo de las condiciones extracelulares sino incluso del tipo celular.

Con referencia al tejido hepático hay una limitada cantidad de información sobre los mecanismos involucrados en los procesos de desensibilización. De hecho, existe controversia en cuanto a la existencia de el proceso de desensibilización β -adrenérgica en este tejido. Por una parte algunos trabajos realizados en cultivos primarios de hepatocitos y en la línea celular RLPR-C de hepatocitos han descrito un proceso de desensibilización β -adrenérgico de tipo homólogo. En controversia con estos datos, en un estudio en donde se utilizó hígado perfundido, se encontró que la respuesta celular se mantiene aun después de sucesivas estimulaciones β -adrenérgicas.

Enseguida se muestra un resumen de los primeros trabajos realizados sobre el fenómeno de desensibilización β -adrenérgica en tejido hepático o células relacionadas:

1976. Lam y Bar (136)

Observaron que la preincubación de rebanadas de hígado con adrenalina por un período de 30 minutos desensibilizaba marcadamente la actividad de la adenilato ciclasa

estimulada por glucagon.

1980. Gurr y Ruh (137)

Utilizando cultivo primario de hepatocitos de rata, encontraron que la preincubación con agonistas β -adrenérgicos induce una desensibilización de tipo homólogo. Durante la primera hora de preincubación, el proceso tiene una cinética rápida seguido por una progresión más lenta estabilizándose al cabo de 3 horas de exposición al agonista. Además observaron que este fenómeno en términos generales era irreversible.

1982. Reilly y Blecher (138)

Utilizando la línea celular clonada de hepatocitos RL-PR-C, describieron que en esta línea celular, en la misma forma que el cultivo primario de hepatocitos, se observaba un proceso inicial de desensibilización sobre la actividad de la adenilato ciclasa a una hora de exposición a los agonistas β -adrenérgicos.

1982. Morgan, Shuman, Exton y Blackmore (139)

Utilizando hígado perfundido de ratas jóvenes, no observaron la desensibilización de la respuesta glucogenolítica estimulada por un agonista β -adrenérgico, incluso después de estimulaciones β -adrenérgicas sucesivas.

1987. Refsnes M., Sandnes D. y Christoffersen T. (64)

Realizaron un estudio sobre la regulación de la respuesta β -adrenérgica en hepatocitos en cultivo primario, en donde observaron que la cantidad de receptores son los principales determinantes para la regulación selectiva de la respuesta β -adrenérgica en este modelo celular. Y sugieren la posibilidad de que ningún mecanismo a nivel post-receptor podría estar involucrado en esta regulación.

Estos resultados, aparentemente en controversia, podrían explicarse por la utilización de diferentes modelos. Aunque, el hígado perfundido podría considerarse como un modelo adecuado, que se acerca mucho al sistema fisiológico, no podemos dejar de tomar en cuenta las dos consideraciones siguientes. Por una parte, la liberación de algunas hormonas y factores endógenos puede ser favorecido en el proceso mismo de la estimulación constante. Por otra parte, las células no parenquimatosas, como las células de Kupffer, podrían influenciar el proceso.

Los hepatocitos frescos pueden ser considerados como un modelo adecuado, porque son tanto morfológica como funcionalmente idénticos a los del tejido hepático íntegro, en contraste a los hepatocitos en cultivo que tienden a alterar su morfología.

Los hepatocitos de ratas normales (el animal que se utiliza comúnmente en el laboratorio) tiene una respuesta β -adrenérgica muy pobre, ya que en este animal, la respuesta hepática es regulada

preferencialmente a través de sus receptores α -adrenérgicos. Sin embargo, existen muchas condiciones, normales o patológicas, en las cuales la respuesta β -adrenérgica juega un papel muy importante en la modulación de las acciones de las catecolaminas en estas células; entre las que podemos incluir estados juveniles, hiperplasia, hepatectomía parcial, adrenalectomía, colestasis e hipotiroidismo.

Utilizando hepatocitos de ratas hipotiroideas como modelo experimental, en nuestro laboratorio se realizaron los tres siguientes trabajos:

1987. García-Saíñz y Michel (65)

Utilizando hepatocitos frescos de ratas hipotiroideas, se demostró que la preincubación con isoproterenol induce una desensibilización dependiente del tiempo y la concentración del agonista, sin ningún efecto sobre la respuesta estimulada por glucagon. En este sistema, el tratamiento con toxina pertussis no altera el patrón de desensibilización inducida por isoproterenol.

1988. Hernández-Sotomayor, Macías, Plebañsky y García-Saíñz (106)

1991. Hernández-Sotomayor, Macías, Malbon y García-Saíñz J.A. (140)

Utilizando hepatocitos de rata hipotiroidea demostraron que los éster de forbol como el PMA, los cuales activan a la proteína cinasa C, inducen una desensibilización heteróloga del sistema de la adenilato ciclasa a través de la proteína

Gs, como se muestra en experimentos de reconstitución en membranas de células de linfoma de ratón S-49 mutante cyc, en donde se muestra que hay una disminución en la actividad de Gs cuando las células son pretratadas con PMA. En este trabajo además se demuestra que la desensibilización homóloga y la heteróloga de la respuesta β -adrenérgica involucran mecanismos diferentes; mientras que la desensibilización homóloga parece ocurrir a nivel del receptor β -adrenérgico, en la heteróloga se afecta la proteína regulatoria Gs.

Aunque estos datos dan evidencia de que la desensibilización homóloga parece involucrar al receptor, no se conoce el mecanismo molecular involucrado en el proceso de desensibilización de los hepatocitos de rata.

Por otra parte, aunque se han planteado algunos modelos para explicar los eventos moleculares asociados con el fenómeno de desensibilización, estos parecen ser operativos en tejidos periféricos muy innervados que responden a concentraciones circulantes de epinefrina o bien en tejidos que están expuestos a niveles muy altos de catecolaminas, como las sinapsis neurales.

Sin embargo, el proceso de desensibilización que nosotros observamos en los hepatocitos parece no estar contemplado en los modelos planteados. Por una parte, en los trabajos realizados en nuestro laboratorio se han encontrado algunas evidencias que sugieren que ni la PKA ni el AMPc están involucrados en el proceso

de desensibilización en este tejido. Por otra parte, los análisis de expresión del RNA mensajero de la β -ARK y la β -arrestina, han mostrado que casi no existe expresión de estas proteínas en el hígado, por lo que es posible que ninguna de estas dos proteínas estén involucradas en el proceso de desensibilización en este tejido.

Por esta razón, es posible que los mecanismos de desensibilización en tejidos periféricos poco inervados como el hígado, en donde es claro que los fenómenos de desensibilización ocurren, sean muy diferente a los que se observan en tejidos periféricos, ricos en terminaciones nerviosas.

OBJETIVO.

Estudiar los posibles mecanismos involucrados en la desensibilización β_2 -adrenérgica, utilizando hepatocitos frescos de rata hipotiroidea.

MATERIALES Y METODOS

La parte correspondiente a materiales y métodos se muestra en el trabajo adjunto.

**"HEPATOCTE β_2 -ADRENERGIC DESENSITIZATION IS
ASSOCIATED TO RECEPTOR INTERNALIZATION"**

Olga Medina-Martínez

and

J. Adolfo García-Sáinz

**Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de
México; Apartado Postal 70-248; 04510 México D. F.**

Correspondence should be sent to:

J. Adolfo García-Sáinz

Inst. Fisiol. Celular, UNAM

Ap. Postal 70-248

04510 México D. F.

Tel (525) 550 5894/5895

FAX (525) 548 0387

ABSTRACT

Preincubation of rat hepatocytes with isoproterenol induces homologous β -adrenergic desensitization evidenced both in whole cells (cyclic AMP accumulation) and membranes (adenyl cyclase activity). This desensitization is associated and quantitatively similar to a loss of β_2 -adrenoceptors from the plasma membrane. Desensitization did not alter the affinities of isoproterenol for the [125 I]iodocyanopindolol binding sites or reduced the ability of guanine nucleotides to modulate agonist affinity, i. e., the receptors that remain in the surface of plasma membrane after desensitization ($\approx 50\%$) retain their functional integrity. When membranes from isoproterenol-desensitized hepatocytes were treated with alkaline phosphatase, no attenuation of the desensitization was observed. Cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation was not decreased but rather slightly increased in membranes from desensitized cells as compared to the controls.

Our data indicate that in hepatocytes, internalization of β_2 -adrenoceptors is closely associated to the homologous desensitization induced by isoproterenol.

Key words:

β_2 -adrenoceptors, hepatocytes

Desensitization, receptor internalization.

1. INTRODUCTION

Desensitization is a regulatory process in which the biological response wanes over time despite the continuous presence of stimulus. The β -adrenoceptor, which is coupled to adenylate cyclase through Gs, is one of the model systems more used to study this phenomenon. Current ideas indicate that the initial event in the β_2 -adrenergic desensitization is a rapid uncoupling of the receptor from Gs, mainly due to receptor phosphorylation, by the concerted action of two kinases: the cyclic AMP-dependent protein kinase (Clark et al., 1988) and the specific β -adrenergic receptor kinase (Lefkowitz et al., 1990). Receptor phosphorylation at the C-terminus by the β -adrenergic receptor kinase induces the binding of β -arrestin, which competes with Gs (Lefkowitz et al., 1990). Uncoupled receptors are sequestered away from the cell surface into a lighter membrane fraction (Lohse et al., 1990a), a process that, in some cells, can be blocked by prior treatment with concanavalin A (Lohse et al., 1990a). Interestingly, when receptor phosphorylation by both protein kinase A and the β -adrenergic receptor kinase is completely prevented, some desensitization still occurs, which can be blocked by concanavalin A (Lohse et al., 1990a). The data indicate that both receptor phosphorylation and internalization participate in the desensitization process; the precise link between these two events is not yet completely understood.

Using hepatocytes from hypothyroid rats, which have a marked

β -adrenergic responsiveness, we showed that preincubation with isoproterenol induces a time- and concentration -dependent homologous β_2 -adrenergic desensitization (García-Sáinz and Michel, 1987). Such desensitization is not mimicked by other agents, such as glucagon, which also increases cyclic AMP accumulation, indicating that it is not mediated via protein kinase A (García-Sáinz and Michel, 1987). Here we show that rapid receptor internalization is a major mechanism for attenuation of the response.

2. MATERIAL AND METHODS

6-N-Propyl-2-thiouracil, theophylline, (-)isoproterenol, (\pm)propranolol, cholera toxin, ATP, GTP, guanylyl-imido-diphosphate (Gpp(NH)p), cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP, phenylarsen oxide, concanavalin A, phosphocreatine and creatine kinase were obtained from Sigma. Collagenase was from Worthington. [α - 32 P]ATP (30 Ci/mmol), [α - 32 P]NAD (800 Ci/mmol), [2,8- 3 H]adenosine 3'-5'-cyclic phosphate (32 Ci/mmol) and [125 I]iodocyanopindolol (125 ICYP) (2200 Ci/mmol) were from New England Nuclear.

Female Wistar rats (aprox 200-250 g) fed *ad libitum* were used. Hypothyroidism was induced by giving the animal water containing 0.03% 6-n-propyl-2-thiouracil for 40-50 days and it was assessed by dryness of the fur, decreased weight gain and decreased levels of triiodothyronine. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (1969). To induce desensitization, cells (40 mg/ml) were preincubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O₂/ 5%CO₂ (pH 7.4), at 37°C in a water-bath shaker, with or

without isoproterenol for 15 min, time at which near maximal desensitization has already taken place (García-Sáinz and Michel, 1987). In some cases, the cells were incubated before the desensitization step with 0.25 mg/ml Concanavalin A in Krebs Ringer bicarbonate buffer for 20 min at 37°C.

Cyclic AMP accumulation, determined by the method of Brown et. al. (1971), was quantified in cells stimulated with the agents for 2 min and incubated during this period with 0.1 mM theophylline to inhibit phosphodiesterase activity.

Membranes were isolated from hepatocytes by a modification (Hernández-Sotomayor et al, 1991) of the method of Loten and Redshaw-Loten (1986). Adenylyl cyclase activity was determined according to Salomon et. al. (1974). The reaction was initiated by the addition of 150 µg of membrane protein to an incubation mixture containing 25 mM Tris, 5 mM MgCl₂ (ph 7.5), 0.4 mM ATP (containing 10⁶ cpm [α -³²P] ATP), 10 mM theophylline, 7.4 mg/ml phosphocreatine and 1 mg/ml creatine kinase. Where indicated, the membranes were treated with alkaline phosphatase as follows: membranes were resuspended in 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.5, and were incubated with or without alkaline phosphatase (250 mU/ml) for 30 min at 30°C. After this treatment, membranes were washed twice with the incubation buffer (4° C) and assayed for adenylyl cyclase activity.

The number and affinity of β -adrenoceptors were assessed using ¹²⁵ICYP. Membranes (150 µg of protein) were incubated with different concentrations (5-150 pM) of ¹²⁵ICYP at 30°C for 90 min in 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂ (pH 7.4) in a total volume of 0.5 ml. Non-specific binding was defined using 3 µM propranolol. Binding displacement

curves were performed under the same conditions using 100 pM $^{125}\text{ICYP}$ in the presence or absence of 100 μM Gpp(NH)p and varying concentration of (-) isoproterenol. The binding of $^{125}\text{ICYP}$ was rapid, reversible and saturable and the sites labeled had the pharmacological characteristics of β_2 -adrenoceptors (data not shown). Binding saturation and competition data were analyzed using the EBDA and LIGAND programs (Biosoft-Elsevier) (Munson and Rodbard, 1980); two-state fits were utilized only when this more complex model significantly improved the goodness of fit. Hill coefficients or slope factors for isoproterenol competing for the $^{125}\text{ICYP}$ sites were calculated from the slope of a plot of $\log [\% B / (100 - \% B)]$ versus $\log [\text{isoproterenol}]$ where B is the percentage of radioligand binding displaced by isoproterenol.

Cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation was assayed as described (García-Sáinz et al., 1989). In brief, membranes were incubated for 1 h at 30°C in buffer containing 250 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 10 mM arginine, 10 mM thymidine, 1 mM ATP, 0.1 mM GTP and 10 μM NAD (containing 10 μCi of [α - ^{32}P]NAD per tube). Cholera toxin was preactivated with 20 mM dithiothreitol for 10 min at 37°C. After the labeling reaction, membranes were washed, solubilized and subjected to electrophoresis. The gels were fixed, dried and exposed to X-ray film for 48 hs. Protein was quantified by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

3. RESULTS

Hepatocytes were pre-incubated in the absence of any agent or with 10 μ M isoproterenol; as shown in Fig 1 the β -adrenergic agonist (panel A), glucagon (panel B) and forskolin (panel C) stimulated the accumulation of cyclic AMP in a dose-dependent manner. Pretreatment with (-)isoproterenol for 15 min clearly diminished (\approx 50%) the ability of this agonist to stimulate again the formation of cyclic AMP; the effect was on the maximal cyclic AMP accumulation with no change in the EC_{50} for the agonist. In contrast, the accumulations of cyclic AMP induced by glucagon or forskolin were identical in control and desensitized cells.

To determine if the desensitization could also be detected in membranes, we measured adenylyl cyclase activity in membranes isolated from cells preincubated in the absence or presence of isoproterenol. The data presented in Fig 2 show that the preincubation with isoproterenol markedly decreased the ability of this β -adrenergic agonist to stimulate adenylyl cyclase activity (panel A); we observed at all the concentrations tested a diminished effect of the agonist which resulted in a flat dose-response curve to isoproterenol, as compared to that of the controls. Preincubation with isoproterenol did not affect either the magnitudes or the EC_{50} s of the dose-response curves for glucagon (panel B) or forskolin (panel C). Treatments with glucagon, forskolin or dibutyryl cyclic AMP did not reproduce the desensitization induced by isoproterenol (data not shown).

Binding of 125 I-CYP to hepatocyte membranes was saturable and Scatchard analysis of the data gave a straight line indicating a

single class of binding sites (K_d 6.9 ± 1.6 pM; B_{max} 36.6 ± 5.1 fmol/ mg protein; data are the means \pm S.E.M. of 6 experiments using different membrane preparations) (Fig. 3). In membranes pretreated with isoproterenol, 125 ICYP binding was markedly reduced with approximately 50% loss in the number of β -adrenergic receptors (B_{max} 18.9 ± 3.1 fmol/ mg protein; mean \pm S.E.M., $n=6$), no change in the affinity for the radioactive antagonist was observed (K_d 8.4 ± 3.2 pM; mean \pm S.E.M., $n=6$) (Fig. 3).

In membranes from control cells the competition of 125 ICYP binding by isoproterenol gave a shallow curve with an EC_{50} of approx. 150 nM and a Hill coefficient of 0.43, which indicates the presence of binding sites with heterogeneous affinity for the agonist (Fig. 4 panels A and B and Table I). In the presence of the hydrolysis-resistant GTP analogue, Gpp(NH)p, the competition curves were shifted to the right (EC_{50} approx 1 μ M) and became steeper (Hill coefficient of approx 0.80) (Fig. 4 panels C and D and Table I), indicating that the hydrolysis-resistant analogue of GTP induces a shift in the receptors, from heterogeneous binding sites to a homogeneous low affinity binding state for agonist. Pretreatment with isoproterenol did not change the affinity states of the β -adrenergic receptor for the agonist or its modulation by Gpp(NH)p (Fig 4 and Table I). Similar results were obtained using the computer-assisted analysis of the data, i. e., in the absence of Gpp(NH)p, the goodness of the fit indicated the presence of two types of sites with high (in the nM range) and low (in the sub μ M range) affinity for the agonist; Gpp(NH)p shifted all the receptors to the low affinity conformation (Table I). No major change in the

affinities for the agonist, the proportion of high and low affinity sites or the effect of Gpp(NH)p was observed in the membranes from desensitized cells as compared to the controls (Table I).

It has been observed that pretreatment with concanavalin A or phenylarsene oxide block the agonist-induced sequestration of β -adrenergic receptors. We observed that in hepatocytes, concanavalin A has no effect on the pattern of desensitization. Phenylarsene oxide was extremely toxic to hepatocytes, preincubation with this agent, for as little as 5 min, results in a drastic inhibition of agonist- or forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation even after extensive washing of the cells (data not shown).

Some experiments in which the membranes were treated with different concentrations of alkaline phosphatase were performed, with the idea of ameliorating desensitization. Such treatments decreased basal and agonist-stimulated adenylyl cyclase activity but did not alter the desensitization induced by isoproterenol (data not shown).

We examined the possibility that a decrease in Gs, could participate in the desensitization by studying cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. Figure 5 is a representative autoradiogram of the ADP-ribosylation studies; the toxin mainly labeled three peptides: a doublet of $M_r \approx 46-48$ kDa and a peptide of $M_r \approx 42$ kDa. In membranes obtained from hepatocytes previously treated with isoproterenol, not only a diminution in Gs was not observed but even a small increase in the labeling of these bands was observed.

4. DISCUSSION

The data on cyclic AMP accumulation in whole liver cells essentially confirmed our previous findings (García-Sáinz and Michel, 1987) and indicate that the desensitization induced by isoproterenol is specific for the β -adrenoceptor and not due to a general damage on the cell or the adenylyl cyclase complex (i. e., an homologous type of desensitization is induced). The desensitization was also observed in membrane preparations indicating that the pretreatment with isoproterenol does not alter the functions of the catalytic subunit, of Gs or of other receptors, but rather specifically that of the β -adrenoceptors. This desensitization was not reproduced by other agents that activate adenylyl cyclase (such as glucagon or forskolin) or by the cyclic nucleotide in whole cells or membranes, ruling out a role of protein kinase A. It is worth mentioning that little, if any, expression of β -adrenergic receptor kinase and β -arrestin has been detected in liver using Northern analysis (Benovic et al., 1990; Lohse et al., 1990b).

Our data on 125 ICYP binding revealed that the pretreatment with isoproterenol induced a decreased of approx. 50% in the number of β -adrenergic receptors in the membrane of these cells. Such decrease, perfectly correlates with the fall in the response measured as cyclic AMP accumulation in whole cells or adenylyl cyclase activity in membranes, which suggests that a very important event in this process is the internalization of the receptors. Similar results had been observed by Refsnes et al. (1987) using primary cultures of hepatocytes. It is difficult to explain why in

perfused liver, the β -adrenergic glycogenolytic response is not desensitized even after successive β -adrenergic stimulation (Morgan et al., 1982). It is possible that in that model factors including non-parenchymal cells may participate in the effect. Nevertheless, it is clear from our data that in freshly isolated hepatocytes, desensitization takes place and that it is associated to a very rapid traffic of β -adrenoceptors. The close correlation between receptor number and response indicates also that hepatocytes have little β -adrenergic receptor reserve. These data are consistent with the observation that a major determinant of hepatocyte β -adrenergic responsiveness is the density of β_2 -adrenoceptors (García-Sáinz et al. 1989). Studies using different model systems have lead to the proposal that sequestration could be of major importance in cell containing relatively small number of the receptors (Lefkowitz et al., 1990).

The characteristics of the β_2 -adrenoceptors present in the plasma membrane of the desensitized hepatocytes are essentially identical (i. e., states of affinity, effect of guanine nucleotides) to those in the control liver cells. The fact that alkaline phosphatase was unable to revert desensitization, obviously does not allow us to rule out roles of protein kinases. Cheung et al., (1989,1990) and Campbell et al.,(1991) have studied this aspect using mutated forms of the receptors; their results have raised some doubts on the role(s) of receptor phosphorylation in internalization. A major question that remains open is the nature of the signal that triggers this later process.

Cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation indicate that a

diminution in Gs is not associated to desensitization. Previously, it has been shown that, in hepatocytes, Gs is not rate limiting for β -adrenergic stimulation of adenylyl cyclase but rather in excess to β_2 -adrenoceptors (García-Sáinz et al., 1989). In addition, in other models, Gs is not sequestered along with the β -adrenoceptors during desensitization (Stadel et al., 1983; Waldo et al., 1983). We observed a small increase in the levels of Gs, as reflected by an increased cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. One possibility to explain this is that the preincubation with isoproterenol may lead to the dissociation Gs into its α and β subunits; free α Gs seems to be a better substrate for the ADP-ribosylation catalyzed by cholera toxin. It should be mentioned, however, that GTP was included in the ADP-ribosylation buffer in order to obtain maximal labeling. We can not rule out the possibility of some agonist-induced association of Gs to the membrane since there is evidence that a fraction of Gs is not located in the plasma membrane in some cells (Roth et al., 1992).

In summary our data indicate that in freshly isolated hepatocytes, homologous β_2 -adrenergic desensitization is a rapid and selective process that is associated to a marked diminution of β_2 -adrenoceptor density in the plasma membrane.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN201889) and CONACyT (0310-N9107). The secretarial assistance of Ms. Guadalupe Ramirez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

Benovic, J. L., A. Deblasi, A. Stone, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, 1990, β -Adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* 248, 1547

Berry M.N. and D. S. Friend, 1969, High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43, 506

Brown B. L., J. D. M. Albano, P. Ekins and A. M. Sgherzi, 1971, A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate. *Biochem J.* 121, 561

Campbell P. T., M. Hnatowich, B. F. O'Dowd, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, 1991, Mutations of the human β_2 -adrenergic receptor that impair coupling to Gs interfere with receptor down regulation but no sequestration. *Mol. Pharmacol.* 39, 192

Cheung A. H., I. S. Sigal, R. A. F. Dixon and C. D. Strader, 1989, Agonist promoted sequestration of the β_2 -adrenergic receptor requires regions involved in functional coupling with Gs. *Mol. Pharmacol.* 35, 132

Cheung A. H., R. A. F. Dixon, W. S. Hill, I. S. Sigal and C. D. Strader, 1990, Separation of the structural requirements for agonist-promoted activation and sequestration of the β -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 37, 775

Clark, R. B., M. W. Kunkel, J. Friedman, T. J. Goka and J. A. Johnson, 1988, Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1442

García-Sainz J. A. and B. Michel, 1987, Homologous β -adrenergic desensitization in isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 246, 331

García-Sáinz, J. A., M. E. Huerta-Bahena and C. C. Malbon, 1989, Hepatocyte β -adrenergic responsiveness and guanine nucleotide-binding regulatory proteins. Am. J. Physiol. 256, C384

Hernández-Sotomayor, S. M. T., M. Macías-Silva, C. C. Malbon and J. A. García-Sáinz, 1991, Modulation of "Gs" activity by phorbol myristate acetate in rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 260, C259

Lefkowitz J. R., W. P. Hausdorff and M. G. Caron, 1990, Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptors. Trends. Biochem. Sci. 11, 190

Lohse M. J., J. L. Benovic, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, 1990a, Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. J. Biol. Chem. 265, 3202

Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, 1990b, β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. Science 248, 1547

Loten E. G. and J. C. Redshaw-Loten, 1986, Preparation of rat liver membranes in a high yield. *Anal. Biochem.* 154, 183

Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.

Morgan, N. G., E. A. Schuman, J. H. Exton, and P. F. Blackmore, 1982, Stimulation of hepatic glycogenolysis by α_1 - and β_2 -adrenergic agonists. Evidence against short term agonist-induced desensitization of the responses. *J. Biol. Chem.* 257, 13907

Munson, P. J. and D. Rodbard, 1980, LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107, 220

Refsnes M., D. Sandnes and T. Christoffersen, 1987, The relationship between β -adrenoceptors regulation and β -adrenergic responsiveness in hepatocytes. Studies on acquisition, desensitization and resensitization of isoproterenol-sensitive adenylate cyclase in primary culture. *Eur. J. Biochem.* 163, 457

Roth, D. A., K. Urasawa, D. Leiber, P. A. Insel and H. K. Hammond, 1992, A substantial proportion of cardiac Gs is not associated with the plasma membrane. *FEBS Lett.* 296, 135

Salomon Y., C. Londos and M. Rodbell, 1974, A highly sensitive

adenylate cyclase assay. Anal. Biochem. 58, 541

Stadel J. M., P. Nambi, R. G. L. Shorr, D. F. Sawyer, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz, 1983, Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the β -adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 3173

Waldo G. L., J. K. Northup, J. P. Perkins and T. K. Harden, 1983, Characterization of an altered membrane form of the β -adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. J. Biol. Chem. 258, 13900

TABLE I

PARAMETERS DERIVED FROM THE COMPETITION CURVES OF ISOPROTERENOL WITH [¹²⁵I]IODOCYANOPINDOLOL IN MEMBRANES FROM CONTROL AND DESENSITIZED HEPATOCYTES.

PARAMETER	CONTROL		DESENSITIZED	
	ISOPROTERENOL	ISOPROTERENOL + Gpp(NH)p	ISOPROTERENOL	ISOPROTERENOL + Gpp(NH)p
Hill analysis				
EC ₅₀ (nM)	146 ± 10	1100 ± 200	215 ± 70	1380 ± 340
Coefficient	0.43 ± 0.06	0.80 ± 0.19	0.40 ± 0.06	0.95 ± 0.38

LIGAND analysis				
K _H (nM)	0.3 ± 0.3	----	1.8 ± 0.8	---
K _L (nM)	413 ± 100	230 ± 70	340 ± 106	270 ± 120
R _H (%)	64 ± 3	----	56 ± 4	----
R _L (%)	36 ± 3	100	44 ± 4	100

Results are the means ± S.E.M. of four experiments using different membrane preparations.

Fig. 1. Effect of preincubation with isoproterenol on the accumulation of cyclic AMP induced by isoproterenol, glucagon or forskolin. Hepatocytes were preincubated in the absence (open circles) or presence (solid circles) of 10 μ M isoproterenol, washed, and incubated with different concentrations of isoproterenol (panel A), glucagon (panel B) or forskolin (panel C). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicate determinations of four separate experiments using different cell preparations.

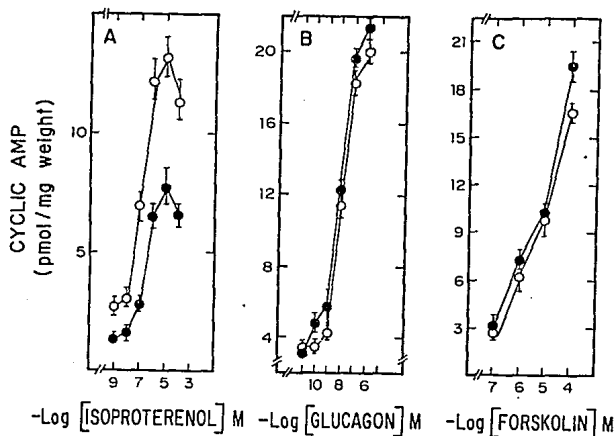


Fig. 2. Effect of preincubation with isoproterenol on the activation of adenylyl cyclase induced by isoproterenol, glucagon or forskolin. Hepatocytes were preincubated in the absence (open circles) or presence (solid circles) of 10 μ M isoproterenol; after this, membranes were prepared and adenylyl cyclase activity was assayed as described in Materials and Methods. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicate determinations using six different membrane preparations.

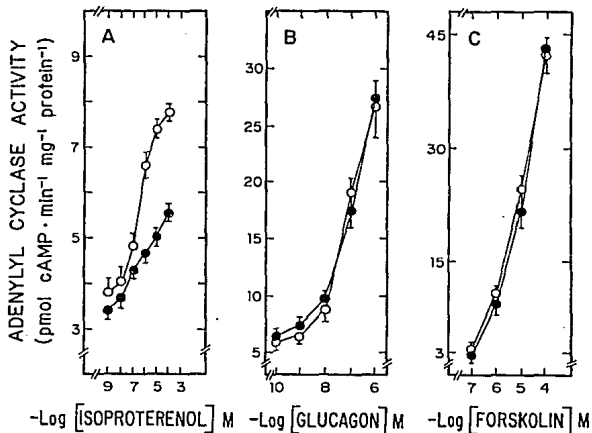


Fig. 3. Effect of preincubation with isoproterenol on [125 I]iodocyanopindolol binding to hepatocyte membranes. Hepatocytes were preincubated in the absence (open circles) or presence (solid circles) of 10 μ M isoproterenol; after this, membranes were prepared and binding experiments were performed as described in Materials and Methods. Data shown are from a representative experiment replicated six times. Panel A, saturation isotherms; panel B, Scatchard analysis.

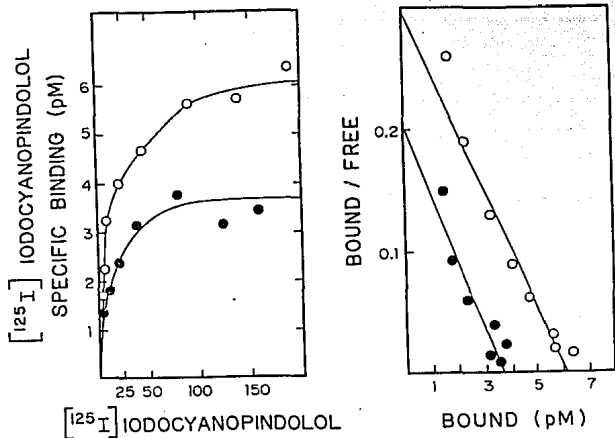


Fig. 4. Binding competition experiments. Membranes were prepared from hepatocytes preincubated in the absence (control) or presence of 10 μ M isoproterenol and were incubated with 200 pM [125 I]iodocyanopindolol and varying concentrations of isoproterenol in the absence (open circles) or presence (solid circles) of 0.1 nM Gpp(NH)p. Panels B and D show the Hill analysis of the competition studies. Data are from a representative experiment replicated 4 times using different membrane preparations.

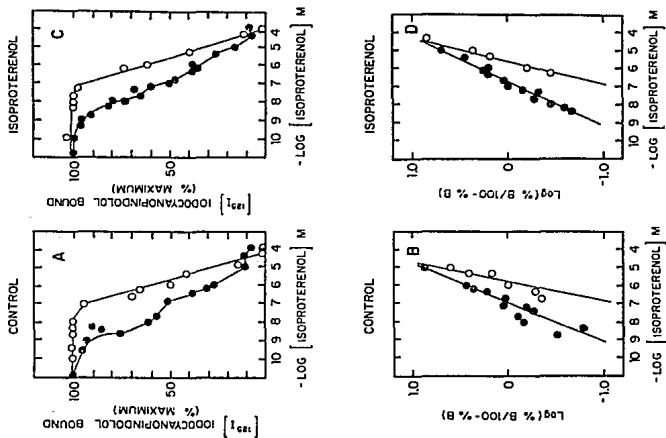
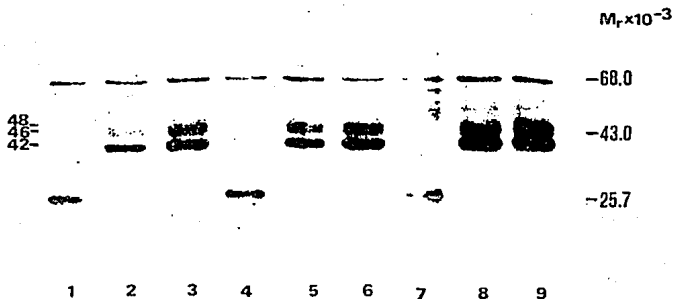


Fig. 5. Autoradiogram of cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation of membranes obtained from hepatocytes incubated in the absence (lines 2, 5 and 8) or presence (lines 3, 6 and 9) of 10 μ M isoproterenol. Membranes: 25 μ g (lines 1-3), 50 μ g (lines 4-6) or 100 μ g (lines 7-9) were incubated with activated cholera toxin (lines 2, 3, 5, 6, 8 and 9) or vehicle (lines 1, 4 and 7) as described in Materials and Methods. The autoradiogram (48 hs exposure) is representative of 4 separate experiments performed under identical conditions.



RESUMEN DE RESULTADOS

La numeración de estas figuras corresponden al trabajo anexo, sometido para su publicación:

FIG 1. Como se muestra en esta figura, el isoproterenol, un agonista β -adrenérgico (PANEL A), el glucagon (PANEL B) y la forskolina (PANEL C) incrementan los niveles de AMPc en hepatocitos de rata hipotiroidea, de una manera dependiente de la dosis. El pretratamiento con isoproterenol $10 \mu\text{M}$ durante 15 min. claramente disminuye (aprox. 50%) la habilidad del agonista β -adrenérgico para estimular nuevamente la formación de AMPc. En contraste, la acumulación de AMPc inducida por glucagon o forskolina se mantiene sin cambio en células control y en células desensibilizadas.

FIG 2. Los datos presentados en esta figura muestran que la preincubación con isoproterenol disminuye el efecto máximo del isoproterenol en todos los rangos de concentración sobre la actividad de la enzima adenilato ciclasa (PANEL A) cuando se compara con las membranas control. Mientras que no tiene ningún efecto sobre la magnitud del efecto ni la concentración efectiva 50 (EC_{50}) de las curvas dosis respuesta de glucagon (PANEL B) y forskolina (PANEL C).

FIG 3. En el PANEL A de esta figura se muestra el pegado del ligando [^{125}I CYP] a membranas de hepatocitos frescos, el cual se reduce marcadamente en membranas de células pretratadas con isoproterenol. Como se observa en el análisis de Scatchard (PANEL B) los datos dan una línea recta, tanto en membranas control como en membranas de células desensibilizadas, lo que nos indica una única clase de sitios de unión. Sin embargo, la preincubación con isoproterenol produce una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos sin ningún efecto sobre la afinidad de los sitios.

FIG 4 y TABLA I. Efecto de la preincubación con isoproterenol sobre las curvas de desplazamiento por isoproterenol sobre el pegado de [^{125}I CYP] a membranas de hepatocitos. En membranas de células control (PANEL A y B) el desplazamiento de [^{125}I CYP] por isoproterenol en ausencia del Gpp(NH)p, un análogo no hidrolizable del GTP, se observa una curva bifásica con un coeficiente de Hill de 0.43 ± 0.06 , lo que indica la presencia de sitios de unión heterogéneos para el [^{125}I CYP]. En presencia de Gpp(NH)p, la curva de competición se desplaza hacia la izquierda y ocasiona un incremento en el coeficiente de Hill a 0.80 ± 0.19 . Estos resultados muestran que el Gpp(NH)p disminuye la habilidad del isoproterenol para desplazar el [^{125}I CYP], lo que sugiere el Gpp(NH)p ocasiona que todos los receptores se desplacen a un único sitio de baja afinidad por el agonista. El pretratamiento con isoproterenol no cambia los estados de afinidad de los receptores β -adrenérgicos por el agonista, ni su modulación por Gpp(NH)p (PANEL C y D).

FIG 5. Efecto de la preincubación con isoproterenol sobre la proteína Gs. Esta figura muestra una autorradiografía representativa en donde podemos observar que en membranas control, la toxina del cólera marca principalmente 3 péptidos, un doblete de $M_r \approx 46-48$ kDa y un péptido de $M_r \approx 42$ kDa. En membranas obtenidas de hepatocitos pretratados con isoproterenol no se observa una disminución en el marcado de las 3 bandas, sino incluso un ligero incremento, sobre todo en el doblete de $M_r \approx 46-48$ kDa.

Estas figuras son datos que no se muestran en el artículo, pero se anexan al presente trabajo de tesis:

FIG 6. En esta figura se muestra el efecto de la preincubación con isoproterenol, glucagon o el análogo del AMPc (db-AMPc) sobre la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol, glucagon o forskolina. Como se puede observar, la preincubación con isoproterenol ocasiona una caída en la respuesta, hasta de un 50% en la acumulación estimulada por isoproterenol, sin tener ningún efecto sobre la estimulación por glucagon o forskolina con respecto al control, mientras que la preincubación con glucagon no produce desensibilización de la respuesta estimulada por ninguno de los tres agentes con respecto al control. La preincubación con db-AMPc no desensibiliza la respuesta β -adrenérgica, ni la del glucagon pero sí provoca una ligera disminución en la estimulada por forskolina.

FIG 7. Efecto de la Concanavalina A sobre la desensibilización β -adrenérgica en hepatocitos de rata hipotiroidea. Como se muestra en esta figura, la preincubación por 20 minutos con la Concanavalina A, ocasiona únicamente una ligera disminución en la desensibilización β -adrenérgica inducida por isoproterenol.

FIG 8. Efecto de la preincubación con fosfatasa alcalina sobre la desensibilización β -adrenérgica inducida por isoproterenol. Como se puede observar en esta figura, el tratamiento con fosfatasa alcalina per se ocasiona una ligera disminución en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol, tanto en membranas de células control como de células previamente desensibilizadas con isoproterenol. El tratamiento con fosfatasa alcalina no promueve una recuperación del estado desensibilizado inducido por isoproterenol. Es decir, la desensibilización inducida por el isoproterenol en este modelo es aparentemente resistente al tratamiento con fosfatasa alcalina.

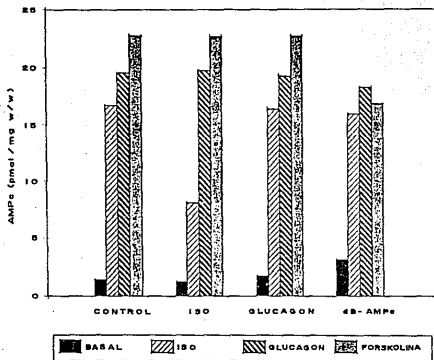


FIG 6. EFECTO DE LA PREINCUBACION CON ISOPROTERENOL, GLUCAGON O db-AMP SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR ISOPROTERENOL, GLUCAGON O FORSKOLINA. Los hepatocitos fueron preincubados en ausencia (CONTROL) o presencia de isoproterenol (ISO), glucagon (GLU) o dibutilil AMPc (db-AMP), lavados y estimulados con $10\mu\text{M}$ de isoproterenol, $10\mu\text{M}$ de glucagon o $100\mu\text{M}$ de forskolina. Los datos que se muestran son el promedio \pm E.S. de tres determinaciones de cuatro experimentos por separado.

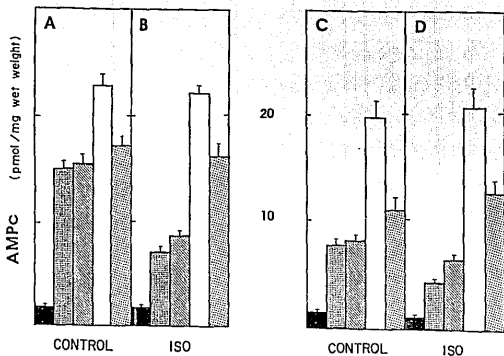


FIG 7. EFECTO DE LA PREINCUBACION CON CONCAVALINA A, SOBRE LA DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR ISOPROTERENOL. Los hepatocitos fueron preincubados en ausencia (A-B) o presencia (C-D) de concanavalina A, durante 20 min., lavados e incubados durante 15 min sin (CONTROL) y con isoproterenol (ISO). Después de lavarlos extensivamente, se determinó la acumulación de AMPc estimulada por 100 μM de forskolina (□) o 1 μM de glucagon (▨) o 10 μM de isoproterenol (▩). Los datos que se muestran son el promedio + E.S. de determinaciones por triplicado de 6 diferentes experimentos.

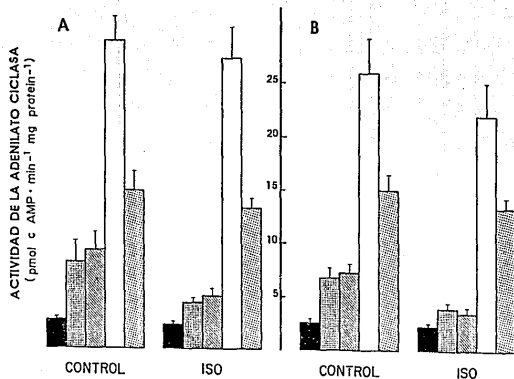


FIG 8. EFECTO DE LA PREINCUBACION CON FOSFATASA ALCALINA SOBRE LA DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR ISOPROTERENOL EN LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA. Los hepatocitos fueron incubados en ausencia (CONTROL) o presencia de $10\mu\text{M}$ de isoproterenol (ISO). Después de esto, se prepararon membranas, las cuales fueron incubadas en ausencia (A) o presencia (B) de 4 mU de fosfatasa alcalina durante 30 min. Al terminar, las membranas se lavaron y se determinó la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por $1\mu\text{M}$ (▤) $10\mu\text{M}$ (▥) de isoproterenol, $100\mu\text{M}$ de forskolina (□) o $1\mu\text{M}$ de glucagon (▧).

DISCUSION

Los resultados de este trabajo indican que una previa estimulación de los receptores β -adrenérgicos por el isoproterenol en hepatocitos de rata hipotiroidea ocasiona una disminución hasta de un 50% en la respuesta máxima reflejada como la acumulación del segundo mensajero AMPc, sin cambiar la EC_{50} . Como se había mostrado previamente, este fenómeno es específico del agonista y no altera la respuesta a otras hormonas como el glucagon, acoplada de la misma forma al sistema de la adenilato ciclasa, o al diterpeno forskolina, el cual estimula directamente la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Estos datos sugieren que la desensibilización inducida por el isoproterenol es específica de los receptores β -adrenérgicos y no se trata de un daño general sobre la célula o el complejo de la adenilato ciclasa.

En la misma forma, cuando se evalúa la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de células control y en células pretratadas con isoproterenol, los resultados son básicamente los mismos, observándose que la preincubación con isoproterenol disminuye el efecto máximo de la respuesta inducida por el agonista, sin afectar ni el efecto máximo, ni la EC_{50} de glucagon o forskolina. Estos datos claramente indican que no se requiere la célula completa para observar el fenómeno de desensibilización y que el pretratamiento con isoproterenol, no altera la función de la subunidad catalítica ni de la proteína regulatoria Gs, sino específicamente la del receptor β -adrenérgico.

Un gran número de estudios en diversos tipos celulares han mostrado que el fenómeno de desensibilización β -adrenérgica, está asociado con una reducción en el número de receptores β -adrenérgicos. Nuestros datos de pegado del ligando radiactivo [125 ICYP], un antagonista β -adrenérgico de alta actividad específica 2200 Ci/mmol, muestran que el pretratamiento con isoproterenol provoca una disminución del 50% en el número de receptores β -adrenérgicos. Esta disminución correlaciona perfectamente con la caída en la respuesta celular, medida como acumulación de AMPc en células completas o como actividad de la adenilato ciclasa en membranas.

Es importante recalcar la fuerte correlación cuantitativa entre el número de receptores y la respuesta celular en los hepatocitos frescos de rata hipotiroidea, durante el proceso de desensibilización del receptor β -adrenérgico, lo que sugiere que el evento molecular más importante en este proceso es el secuestro o internalización de los receptores β -adrenérgicos, vista como el resultado de una rápida translocación de los receptores desde la membrana plasmática a un depósito intracelular, de naturaleza aún no definida.

En un trabajo previo, Refsnes et al. (64), utilizando cultivos primarios de hepatocitos, obtuvieron resultados muy similares, en donde incluso observaron que al quitar al agonista del medio extracelular, ocurría un proceso rápido de resensibilización de la respuesta, relacionado con un incremento en el número de receptores, independiente de la síntesis de proteínas.

Un gran número de estudios en diferentes tipos celulares han llevado a proponer que el secuestro de los receptores es sólo un mecanismo auxiliar en el proceso de la desensibilización, aunque no se descarta que pudiera ser el evento molecular más importante en este proceso especialmente en células que contienen un número relativamente bajo de receptores (114). Esto significa que este proceso pudiera estar involucrado en la desensibilización de receptores β -adrenérgicos en tejidos periféricos, en donde el número de receptores es bajo y en donde aparentemente no existen condiciones fisiológicas de liberación intermitente de catecolaminas, como en las sinapsis neurales.

Por otra parte, la correlación cuantitativa entre la pérdida de receptores y la caída en la respuesta sugiere que en los hepatocitos de rata no existe una reserva de receptores o bien ésta es muy limitada. Es decir, aparentemente la respuesta sigue una cinética de primer orden. Aunque no podemos determinar si la ocupación del receptor, su activación o algún otro proceso es el paso limitante para que la captura de los receptores se lleve a cabo. Hemos observado que el propranolol, un antagonista β -adrenérgico, no induce desensibilización β -adrenérgica (65), lo que sugiere que la activación por el agonista pudiera ser un prerequisite para que el receptor sea secuestrado. De hecho, Campbell et al. (133) han propuesto que únicamente se requiere la ocupación por el agonista.

Existen algunos compuestos como la concanavalina A que se utilizan para inhibir la internalización de los receptores. Si en

nuestro modelo el secuestro de los receptores, es el evento que determina la caída en la respuesta, al utilizar un inhibidor de dicho proceso, nosotros esperábamos que el fenómeno de la desensibilización fuera evitado. Sin embargo, este compuesto casi no tiene efecto sobre el patrón de desensibilización en los hepatocitos, aunque este ligero efecto, es dependiente de la concentración del inhibidor.

En la misma forma, el óxido de fenilarseno (PAO) ha sido utilizado para inhibir la internalización de los receptores de EGF, insulina e incluso el β -adrenérgico en otros modelos; sin embargo, cuando nosotros utilizamos este compuesto en los hepatocitos, la preincubación por 5 minutos con diferentes concentraciones de PAO resulta en una completa inhibición de la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol, glucagon y forskolina, aún después de lavar extensivamente a las células (datos no mostrados). Esto nos indica una extrema toxicidad de este compuesto y sus limitaciones para su utilización.

Es importante recalcar la incapacidad tanto de la concanavalina A como del PAO, para inhibir la desensibilización, aun cuando ambos compuestos han sido utilizados para inhibir la internalización de los receptores β -adrenérgicos en muchos tipos de células. En controversia con algunas observaciones de Waldo et al. (125), que sugieren que el pretratamiento con concanavalina A, no ocasiona cambios en los niveles de AMPc estimulados por isoproterenol en células control, nosotros observamos que este compuesto causa una disminución tanto en los niveles basales de

AMPC como en los estimulados por isoproterenol. En la misma forma, provoca un desplazamiento a la derecha en la curva dosis respuesta de la acumulación de AMPC estimulada por isoproterenol. Si nosotros consideramos estos cambios en los niveles de AMPC, únicamente se observa una ligera recuperación de la desensibilización inducida por el isoproterenol. Sin embargo, incluso esta pequeñísima recuperación no puede ser atribuida a la inhibición de la internalización, porque es posible que la Concanavalina A obstruya la interacción entre el agente desensibilizante y los receptores β -adrenérgicos.

Por otra parte, el PAO tiene una serie de acciones secundarias muy complicadas, que no se pueden inhibir fácilmente por lavado de las células o la utilización de reactivos bifuncionales como el ditiotreitól, mientras que la concanavalina A *per se* causa modificaciones en la superficie de la membrana. De esta forma, si se consideran los efectos secundarios de ambos agentes y otros compuestos utilizados para inhibir la internalización de los receptores, podemos concluir que no se cuenta todavía, con las herramientas adecuadas para inhibir específicamente este proceso, lo que posiblemente ha ocasionado una serie de conclusiones erróneas sobre este proceso.

Con el propósito de determinar si la disminución en el número de receptores β -adrenérgicos va acompañada de una disminución en los niveles de la proteína regulatoria Gs, se examinó el efecto del pretratamiento con isoproterenol y encontramos que en membranas obtenidas de hepatocitos pretratados con isoproterenol no sólo no

se observa una disminución en los niveles de esta proteína, sino incluso un ligero aumento en el marcaje de las bandas que ADP-ribosila la toxina del cólera. Sin embargo, es importante recalcar que no creemos que exista un incremento real en los niveles de Gs, sino más bien consideramos que el pretratamiento con isoproterenol provoca la disociación de esta proteína en sus subunidades α y $\beta\gamma$, y que esta forma de α -Gs es un mejor sustrato para la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del cólera. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que las catecolaminas induzcan una rápida conversión de una reserva de Gs de una forma inaccesible a la toxina a una accesible. Incluso Roth *et al.* (142) han mostrado que una parte de Gs se encuentra en el citosol de algunas células.

En muchos sistemas que se han estudiado, se ha demostrado que un evento inicial en la desensibilización β -adrenérgica es un desacoplamiento entre el receptor y Gs. En estos estudios se ha demostrado que la preincubación con agonistas provoca una disminución del 50-60% a 0-20% en la capacidad de los receptores para formar el estado de alta afinidad por el agonista, lo que indica que los receptores se encuentran desacoplados de Gs. Por esta razón, quisimos determinar si la desensibilización en hepatocitos de ratas hipotiroideas induce cambios tanto en el estado de afinidad de los β -adrenorreceptores, como en la capacidad de los nucleótidos de guanina para modular el estado de afinidad de éstos. Nuestros resultados indican que en este modelo la desensibilización no provoca cambios en los receptores que permanecen en la membrana después de la desensibilización.

El hecho de que los receptores que permanecen en la membrana después del proceso de desensibilización no se encuentran desacoplados de Gs, indirectamente nos dan evidencias de que por lo menos estos receptores que no han sido fosforilados, ya que aparentemente el desacoplamiento entre los receptores y Gs, se debe a la fosforilación mediada tanto por la proteína cinasa A como por la β -ARK, aunque esto no es suficiente para descartar la posibilidad de que la fosforilación se encuentre participando en este proceso de desensibilización.

Se ha sugerido que en este modelo la PKA no juega un papel importante en la desensibilización, ya que se ha observado que los análogos del AMPc, como el dB-AMPc, o algunas hormonas acopladas estimulatoriamente a la adenilato ciclasa, como el glucagon, son incapaces de inducir desensibilización β -adrenérgica, nosotros no podemos descartar la posibilidad de que la incapacidad de estos compuestos se deba a que es necesaria la ocupación del receptor por un agonista para ser transformado en un sustrato adecuado para la fosforilación por la PKA. Esta posibilidad está de acuerdo con algunas observaciones previas, de que la ocupación por un agonista del receptor β -adrenérgico de tejido de pulmón incrementa la velocidad de fosforilación por la PKA (143).

Otra posibilidad que nosotros debemos considerar es que en la misma forma en que los glucocorticoides y las hormonas tiroideas regulan el receptor β_2 -adrenérgico, podrían regular los genes de la β -ARK y la β -arrestina (144). Por lo que en este modelo, en donde el número de receptores β -adrenérgicos ha sido incrementado por la

falta de las hormonas tiroideas, es posible que en la misma forma los niveles en la β -ARK y la β -arrestina hayan sido incrementados. Por esta razón, nosotros quisimos considerar la fosforilación del receptor como un posible mecanismo de la desensibilización del receptor β -adrenérgico en este modelo. Debido a que no ha sido posible, hasta ahora, desarrollar un sistema de permeabilización para estas células con digitonina, para introducir inhibidores específicos de las cinasas como se ha reportado para las células A-430 (89), utilizamos la fosfatasa alcalina para probar la posibilidad de que una fosforilación se encuentre mediando el proceso de desensibilización en este modelo.

En un trabajo previo Yamashita et al. (145) demostraron que la fosfatasa alcalina disminuye la desensibilización de la adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol en membranas de reticulocitos de rata. Este mismo tratamiento de las membranas de hepatocitos no causa una reducción en el patrón de desensibilización de estas membranas.

Sin embargo, el estado fosforilado inducido por la β -ARK parece ser más resistente al tratamiento con fosfatasa alcalina en comparación con el estado inducido por la proteína cinasa A. Tomando en cuenta que la falta de hormonas tiroideas induce un aumento en el número de receptores β -adrenérgicos, es posible que en la misma forma se promueva un aumento en los niveles de la β -ARK y la β -arrestina, por lo que no podemos descartar del todo la posibilidad de una fosforilación de los receptores mediada por la β -ARK en este modelo.

Previamente Cheung et al. (127) habían concluido, basándose en estudios de mutagénesis dirigida del receptor β_2 -adrenérgico, que el secuestro del receptor es el principal evento molecular involucrado en la desensibilización, mientras que la fosforilación del receptor no tiene ningún papel importante en este proceso. Ya que ellos observaron que en mutantes que carecen de todos los sitios potenciales de fosforilación, tanto para la PKA como para la β -ARK, hay una correlación importante entre el secuestro y la desensibilización. Sin embargo, estas mutantes se expresan a muy bajos niveles y como ya se había mencionado, en modelos donde el número de receptores es bajo, el secuestro de los receptores β -adrenérgicos podría ser el evento mas importante en la desensibilización.

Finalmente, en un trabajo publicado muy recientemente, Zastrow y Kobilka (128), estudiando la regulación de los receptores β -adrenérgicos en células 293 transfectadas con estos receptores, aportaron una serie de evidencias importantes que muestran que la internalización de los receptores mediada por el agonista ocurre y que este proceso se revierte después de que se elimina el agonista. Esta redistribución de los receptores no fue bloqueada por la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Sin embargo en controversia con nuestros datos, estas células expresan un gran número de receptores β -adrenérgicos, por lo que estas células podrían no representar la regulación que ocurre normalmente en los tejidos. Aunque el secuestro de los receptores β -adrenérgicos en estas células es muy similar al proceso observado en hepatocitos y

en otras líneas celulares.

En conclusión, nosotros observamos que en hepatocitos de ratas hipotiroideas, el secuestro o internalización de los receptores β -adrenérgicos es el evento más importante en la regulación de la respuesta a agonistas. Aparentemente, los receptores que permanecen en la superficie de la membrana son capaces de mantener la respuesta celular residual, ya que conservan su integridad funcional.

Por último, es importante recalcar que más que ponderar la importancia del secuestro o la fosforilación de los receptores, como el evento primordial en la desensibilización, debemos considerar la posibilidad de que cada tipo celular tenga un modo específico de regulación, que difiera no sólo por las condiciones extracelulares a las que se enfrenta cada tejido en particular, sino también por la expresión diferencial de proteínas en una célula específica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- García-Sainz J.A. (1991) NIPS 6:169-173.
- 2.- Langley J.N. (1906) Proc. Roy. Soc. 78: 170-194.
- 3.- Lomasney J.W., Lorenz W., Allen L.F., King K, Regan J.W., Yang-Feng T.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:5094-5098.
- 4.- Barger G. y Dale H.H. (1910) J. Physiol. (Lond.) 41:19-59.
- 5.- Hoffman B.B., y Lefkowitz R.J. (1990) "Catecholamines and sympathomimetic drugs" en The Pharmacological basis of therapeutics ed. Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. 8a ed. PERGAMON PRESS.
- 6.- Ahlquist R.P. (1948) Am. J. Physiol. 153:586-600.
- 7.- Lands, A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P., Brown T.C. (1967) Nature 214:597-598.
- 8.- Emorine L.J., Marullo S., Briend-Sutren M.M., Patey G., Tate K., Delavier-Klutcho C., Strosberg D. (1989) Science 245:1118-1121.
- 9.- Fève B., Emorine L.J., Lasnier F., Blin N., Baude B., Nahmias C., Strosberg A.D., Pairault J. (1991) J. Biol. Chem. 266:20329-20336.
- 10.- Dubocovich M.L. y Langer S.Z. (1974) J. Physiol. (London) 237:505-519.
- 11.- Berthelsen S. y Pettinger, W.A. (1977) Life Sci 21:595-606.
- 12.- Morrow A.L. y Creese I (1986) Mol. Pharmacol. 29:321-330.
- 13.- Cotecchia S., Schwinn D.A., Randall R.R., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Kobilka B.K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 85:7159-7163.
- 14.- Schwinn D.A., Lomasney J.W., Lorenz W., Szklut P.J., Fremeau R.T. Jr, Yang-Feng T.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Cotecchia S (1990) J. Biol. Chem. 265:8183-8189.
- 15.- Lomasney J.W., Cotecchia S., Lorenz W., Leung W.Y., Schwinn D.A., Yang-Feng T.L., Brownstein M, Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1991) J. Biol. Chem. 266:6365-6369.
- 16.- Schwinn D.A., Page S.O., Middleton J.P., Lorenz W., Liggett S.B., Yamamoto K., Lapetina E.G., Caron M.G., Lefkowitz R.J.

Cotecchia S. (1991) *Mol. Pharmacol.* 40:619-626.

- 17.- Bylund D.V. (1988) *Trends. Pharmacol. Sci.* 9:356-361.
- 18.- Murphy T.J. y Bylund D.B. (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244:571-578.
- 19.- Michel A.D., Loury D.N., Whiting R.L. (1989) *Br. J. Pharmacol.* 98:890-897.
- 20.- Kobilka B.K., Matsui H., Kobilka T.S. Yang-Feng T.L., Franke U. Caron M.G., Lefkowitz R.J., Regan J.W. (1987) *Science* 238:650-656.
- 21.- Lomasney J.W., Cotecchia S., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1991) *Biochimica et Biophysica Acta* 1095:127-139.
- 22.- Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Masato N., Satoh T. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60:349-400.
- 23.- Murayama Y., Okamoto T., Ogata E., Asano T., Iiri T., Katada T., Ui M., Grubb J.H., Sly W.S., Nishimoto I. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:17456-17462.
- 24.- Brown A. M. y Birnbaumer L (1988) *Am. J. Physiol.* 23H 401-410.
- 25.- Berridge M.J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:159-193
- 26.- Baudry M., Evans J., Lynch G. (1986) *Nature* 319:329-331.
- 27.- Enjalbert A., Sladeczek F., Guillon G., Bertrand P., Shu C. Epelbaum J., Garcia-Sainz A., Jard S., Lombard C., Kordon C., Bockaert J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:4071-4075.
- 28.- Taylor S.J. y Exton J.H. (1991) *FEBS Lett* 286:214-216.
- 29.- Rhee S. G., Suh P.G., Ryu S.H., Lee S.Y. (1989) *Science* 244:546-550.
- 30.- Crabos M., Imber R., Woodtli T., Fabbro D, Erne P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:878-883.
- 31.- Thompsom N.T., Bonser R.W., Garland L.G. (1991) *TIPS* 12:404-408.
- 32.- Harris B.A., Robishaw J.D., Mumby S.M., Gilman A.G. (1985) *Science* 229:1274-1277.
- 33.- Bray P., Carter A., Simons C., Guo V., Puckett C., Kamholz J. Spiegel A.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:8893-8897.

- 34.- Robishaw J.D., Russell D.W., Harris B.A., Smigel M.D., Gilman A.G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:1251-1255.
- 35.- Graziano M.P., Casey P.J., Gilman A.G. (1987) J. Biol. Chem. 262: 11375-11381.
- 36.- Sugimoto K., Nukada T., Tahabe T., Takahasi H., Noda M., Minamino N., Kanyawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S. Numa S. (1985) FEBS Lett 191:235-240.
- 37.- Gao B., Gilman A.G., Robishaw J.D. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 84:6122-6125.
- 38.- Hurley J.B., Fong H.K.W., Teplow D.B., Dreyer W.J., Simon M. I. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6948-6952.
- 39.- Gautam N., Baetscher M., Aebersold R., Simon M.I. (1989) Science 244:971-974.
- 40.- Robishaw J.D., Kalman V.K., Moomaw C.R., Slaughter C.A. (1989) J. Biol. Chem. 264:15758-15761.
- 41.- Takai K., Kurashina Y., Suzuki-Hori C., Okamoto H., Hayaishi O. (1974) J. Biol. Chem. 249:1965-1972.
- 42.- Smigel M.D. (1986) J. Biol. Chem. 261:1976-1982.
- 43.- Pfeuffer E., Dreher M.R., Metzger H., Pfeuffer T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 82:3086-3090.
- 44.- Hildebrandt J.P., Codina J., Birnbaumer L. (1984) J. Biol. Chem. 259:13178-13185.
- 45.- Katada T., Northrup J.K., Bokoch G.M., Ui M., Gilman A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259:3578-3585.
- 46.- Taylor S.S., Buechler J.A., Yonemoto W. (1990) Annu. Rev. Biochem. 59:971-1005.
- 47.- Palczewski K., Mc. Dowell H.J., Jakes S., Ingebritsen T.S., Hargrave P.A. (1989) J. Mol. Biol. 264:15770-15773.
- 48.- Jelsema C.L. y Axelrod J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3623-3627.
- 49.- Lerea, C.L., Somers D.E., Hurley J.B., Klock I.B., Bunt-Milam A. H. (1986) Science 234:77-80.
- 50.- Cerione R.A., Strulovici B., Benovic J.L., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1983) Nature (London) 306:562-566.

- 51.- Dohlman H.G., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1987) *Biochemistry* 26:2657-2664.
- 52.- Shorr R.G.L., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:5820-5826.
- 53.- Lefkowitz R.J., Stadel J.M., Caron M.G. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52:159-186.
- 54.- Lefkowitz R.J. y Caron M.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:4993-4996.
- 55.- Benovic J.L., Shorr R.G.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1984) *Biochemistry* 23: 4510-4518.
- 56.- Dixon R.A.F., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennet C.D., Rands E., Diehl R.E., Mumford M.A., Slater E.E., Sigal I.S., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Strader C.D. (1986) *Nature* 321:75-79.
- 57.- Kobilka B.K., Kobilka T.S., Daniel K., Regan J.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1988) *Science* 240:1310-1316.
- 58.- O'Dowd B.F., Hnatowich M., Regan J.W., Leader W.M., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992.
- 59.- Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Bogachuk A.S. (1988) *FEBS Lett.* 230:1-5.
- 60.- O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:7564-7569.
- 61.- Lefkowitz R.J. (1982) *Am. J. Physiol.* 243:E43-E47.
- 62.- Morishima I. W., Thompson J., Robinson G.A., Strada S.J. (1980) *Mol. Pharmacol.* 18:370-378.
- 63.- Harden T.K. (1983) *Pharmacol. Rev.* 35:5-32.
- 64.- Refsnes M., Sandnes D., Christoffersen T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163:457-466.
- 65.- García-Saiz J.A. y Michel B. (1987) *Biochem. J.* 246:331-336.
- 66.- Frederich R.C., Waldo G.L., Harden T.K., Perkins J.P. (1983) *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 9:103-118.
- 67.- Mukherjee C., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1945-1949.
- 68.- Mickey J.V., Tate R., Mullikin D., Lefkowitz R.J. (1976) *Mol. Pharmacol.* 12:409-419.

- 69.- Su Y.F., Harden T.K., Perkins J.P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 38-41.
- 70.- Su Y.F., Harden T.K., Perkins J.P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:7410-7419.
- 71.- Chuang D. M. y Costa E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3024-3028.
- 72.- Chuang D.M., Kinnier W.J., Farber L., Costa E. (1980) *Mol. Pharmacol.* 18:348-355.
- 73.- Harden T.K. Cotton C.V., Waldo G.L., Lutton J.K., Perkins J.P. (1980) *Science* 210:441-443.
- 74.- Strasser R.H., Sibley D.R., Lefkowitz R.J. (1986) *Biochemistry* 25:1371-1377.
- 75.- Strulovici B., Stadel J.M., Lefkowitz R.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:6410-6414.
- 76.- Strasser R.H., Stiles G.L., Lefkowitz R.J. (1984) *Endocrinology* 115:1392-1400.
- 77.- Doss R.C., Perkins J.P., Harden T.K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:12281-12286.
- 78.- Strulovici B. y Lefkowitz R.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:4389-4395.
- 79.- Strulovici B., Cerione R.A., Kilkprattick B.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1984) *Science* 225:837-840.
- 80.- Kassis S. y Fishman P.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:5312-5318.
- 81.- Kuhn H. y Dreyer W.J. (1972) *FEBS Lett.* 20:1-6.
- 82.- Sibley D.R., Strasser R.H., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:3883-3886.
- 83.- Benovic J.L., Pike L.J., Cerione R.A., Staniszewski C., Yoshimasa T., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:7094-7101.
- 84.- Sibley D.R., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1987) *Cell* 48:913-922.
- 85.- Cerione R.A., Strulovici B., Benovic J.L., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1983) *Nature* 306:562.
- 86.- Benovic J.L., Strasser R.H., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:2797-2801.

- 87.- Benovic J.L., Mayor F.J., Staniszewski C., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:9026-9032.
- 88.- Sibley D.R., Strasser R.H., Benovic J.L., Daniel K., Lefkowitz R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:9408-9412.
- 89.- Lohse M.J., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Benovic J.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3011-3015.
- 90.- Hoffman B.B., Mullikin-Kilkpatrick D., Lefkowitz R.J. (1979) *J. Cyclic Nucleotide Res.* 5:355-366.
- 91.- Clark R.B., Kunkel M.W., Friedman J., Goka T.J., Johnson J.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:1442-1446.
- 92.- Simpsom I.A. y Pfeuffer T. (1980) *Eur. J. Biochem.* 111:111-116.
- 93.- Stadfel J.M., De Lean A., Mullikin-Kilkpatrick D., Sawyer D. D., Lefkowitz R.J. (1981) *J. Cyclic Nucleotide Res.* 7:37-47.
- 94.- Stadel J.M., Nambi P., Lavin T.N., Heald S.L. Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:9242-9245.
- 95.- Stadel J.M., Strulovici B., Nambi P., Lavin T.N., Briggs M.M., Caron M.G. y Lefkowitz R.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:3032-3038.
- 96.- Stadel J.M., Nambi P., Shorr R.G.L., Sawyer D.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:3173-3177.
- 97.- Sibley D.R., Peters J.R., Nambi P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:9742-9749.
- 98.- Bouvier M., Leeb-Lundberg L.M., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:3106-3113.
- 99.- Kelleher D.J. Pressin J.E., Ruoho A.E., Johnson G.L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4316-4320.
- 100.- Briggs M.M., Stadel J.M., Iyengar R., Lefkowitz R.J. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 224:142-151.
- 101.- Ross E.M. y Gilman A.G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:3715-3719.
- 102.- Zick Y., Sagi-Eisenberg R., Pines M., Giers C. P., Spiegel A.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:9294-9297.
- 103.- Rich K.A., Codina J., Floyd G., Sekura R., Hildebrandt J.D., Iyengar R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:7893-7901.

- 104.- Katada T., Gilman A.G., Watanabe Y., Beuer S., Jakobs K.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151 : 431-437.
- 105.- Heyworth C.M., Hanski E.M., Houslay M.D. (1984) *Biochem. J.* 222:189-194.
- 106.- Hernández-Sotomayor S.M.T., Macías S. M., Plebañsky M., García-Saiz J.A. (1988) *Biochimica et Biophysica Acta* 972:311-319.
- 107.- Yoshimasa T., Sibley D.R., Bouvier M., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1987) *Nature* 327:67-70.
- 108.- Strasser R.H. (1989) en "Receptor phosphorylation" ed. V.K. Moudgil CRC Press.
- 109.- Kassis S. y Fishman P.H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6686-6690.
- 110.- Liggett S.B., Bouvier M., Hausdorff W.P., O'Dowd B.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) *Mol. Pharmacol.* 36:641-646.
- 111.- Hausdorff W.P., Bouvier M., O' Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:12657-12665.
- 112.- Clark R.B., Friedman J., Dixon R.A.F. Strader C.D. (1989) *Mol. Pharmacol* 36:343-348.
- 113.- Lohse M.J., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:3202-3209.
- 114.- Lefkowitz R.J., Hausdorff W.P., Caron M.G. (1990) *Trends. Pharmacol. Sci.* 11:190-194.
- 115.- Mirshahi M., Borgese F., Razaghi A., García-Romeu F., Faure J.P., Natais R. (1989) *FEBS Lett.* 258:240-246.
- 116.- Lohse M.J., Benovic J.L. Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) *Science* 248:1547-1549.
- 117.- Benovic J.L., De Blasi A., Stone W.C., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) *Science* 246:235-240.
- 118.- Wagner R., Ryba N., Uhl R. (1988) *FEBS Lett.* 235:103-108.
- 119.- Wagner R., Ryba N., Uhl R. (1988) *FEBS Lett.* 234:44-48.
- 120.- Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60:653-688.
- 121.- Uhl R., Wagner R., Ryba N. (1990) *Trends. Neurosci* 13:64-70.

- 122.- Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) FASEB J. 4:2881-2889.
- 123.- Hertel C., Courtel S.J., Perkins J.P. (1985) J. Biol. Chem. 260:12547-12553.
- 124.- Box R.J. y Staehelin M. (1987) FEBS Lett 214:323-326.
- 125.- Waldo G.L., Northup J.K., Perkins J.P., Harden T.K. (1983) J. Biol. Chem. 258:13900-13908.
- 126.- Bouvier M., Hausdorff W.P., De Blasi A., O'Dowd B.F., Kobilka B.K., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1988) Nature 333:370-373.
- 127.- Cheung A.H., Sigal I.S., Dixon A.F., Strader C.D. (1989) Mol. Pharmacol. 34:132-138.
- 128.- Zastrow M.V. y Kobilka B.K. (1992) J. Biol. Chem. 267:3530-3538.
- 129.- Collins S., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:497-508.
- 130.- Campbell P.T., Hnatowich M., O'Dowd B.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Hausdorff W.P. (1991) Mol. Pharmacol. 39:192-198.
- 131.- Bouvier M., Collins S., O'Dowd B.F., Campbell P.T., De Blasi A., Kobilka B.K., MacGregor C., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) J. Biol. Chem. 264:16786-16792.
- 132.- Hadcock J.R. y Malbon C.C. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5021-5025.
- 133.- Collins S., Bouvier M., Bolanowski M.A., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:4853-4857.
- 134.- Collins S., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1992) TIBS 17:37-39.
- 135.- Zhou X.M. y Fishman P.H. (1991) J. Biol. Chem. 266:7462-7468.
- 136.- Lam V. y Bar H.P. (1976) Biochem. Pharmacol. 25:2103-2104.
- 137.- Gurr J.A. y Ruh T.A. (1980) Endocrinology 107:1309-1319.
- 138.- Reilly T.M. y Blecher M. (1982) Biochim. Biophys. Acta 720:126-132.
- 139.- Morgan N.G., Shuman E.A., Exton J.H., Blackmore P.F. (1982) J. Biol. Chem. 257:13907-13910.

- 140.- Hernández-Sotomayor, Macías S.M., Malbon C.C., García-Sainz J.A. (1991) *Am. J. Physiol.* C259-C265.
- 141.- Itoh H., Katada T., Ui M., Kawasaki (1988) *FEBS Lett.* 230:85-89.
- 142.- Roth D.A., Urasawa K., Leiber D., Insel P.A., Hammond H.K., (1992) *FEBS Lett.* 296:135-140.
- 143.- Nambi P., Peters J.R., Sibley D.R., Lefkowitz R.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2165-2171.
- 144.- Bahouth S.W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15863-15869.
- 145.- Yamashita A., Kurokawa T., Fujii Y., Yasuda H. Ishibashi S., (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 188:229-234.
- 146.- Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S.L., Krans H.M.J. (1971) *J. Biol. Chem.* 252:1877-1882.