



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM
POSGRADO**

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Regulación funcional del receptor
 α_{1d} – adrenérgico por IGF-I**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Ekaterina Vladimirovna Kalashnikova

TUTOR: Dr. Jesús Adolfo García Sáinz



México, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Rosario Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular
Secretario	Dra. Rosario Muñoz Clares	Facultad de Química
Suplente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química
Suplente	Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química

Este proyecto fue apoyado por los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (45837-Q) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA (IN 200206).

Durante la realización del proyecto, la autora recibió una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México para estudios de maestría.

Dedicatoria

A mi madre Lubov Mijailovna Kalashnikova, a mi padre Vladimir Ivanovich Kalashnikov, y a mis hermanos Andrei y Vladimir, porque siempre tuvieron el estímulo que inspiró mi deseo de superación y la fortaleza interior para permitir que me alejara de su lado desde mis estudios de licenciatura.

A mi otra familia mexicana que me adoptó como a su propia hija.

A mi Alex por brindarme su amor y cariño.

Я посвящаю мою научную работу моей любимой мамочке моему дорогому папе и моим потрясающим братьям. Ваша поддержка вдохновила меня к стремлению к лучшему и покорению новых вершин.

Я благодарю вас за то, что вы никогда ни учили меня жить а лишь верили в меня и мои мечты.

Ваша любящая дочь и сестра Екатерина

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por su comprensión y confianza personal, y especialmente, por su invaluable ayuda académica, pues sin su apoyo no hubiese podido terminar esta tesis.

A mi Comité Tutorial de maestría por su constante evaluación de mi desempeño académico, en particular, por sus observaciones que me permitieron corregir mis errores.

A los miembros del jurado por su gentileza y su tiempo para leer mi trabajo, igualmente por las notas y observaciones que hicieron a este trabajo. Su ayuda fue importante en mi trabajo final y contribuyó a darme confianza.

A la Dra. Ma.Teresa Romero Ávila por su comprensión durante mi estancia en el posgrado.

A mis compañeros de los laboratorios 303 y 304 sur, por su amable compañía durante mi estancia en el posgrado.

A la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez porque su clara inteligencia y sus conversaciones me alentaron a sostener mi esfuerzo en el posgrado.

A los auxiliares de laboratorio por su permanente actitud para apoyar el trabajo académico de los estudiantes.

En general a todo el personal académico y administrativo del Instituto de Fisiología Célular por la bella imagen que llevo a mi país de un centro de investigación y enseñanza mexicana.

Índice

Índice.....	I
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	V
I. Marco general de referencia.....	1
Un poco de historia.....	1
Receptores acoplados a proteínas G.....	1
Proteínas G.....	2
Activación de los GPCRs.....	4
Receptores adrenérgicos.....	6
La distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos y su importancia fisiológica.....	8
El receptor α_{1d} - adrenérgico.....	10
Los receptores con actividad de tirosina cinasa.....	11
El receptor del factor de crecimiento-1 similar a insulina (IGF-1R)....	12
Mecanismos de transducción.....	14
Proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G(GRKs)....	17
Arrestinas.....	18
Desensibilización.....	18
Desensibilización homóloga.....	18
Internalización.....	19
Desensibilización heteróloga.....	21

Índice

Índice.....	I
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	V
I. Marco general de referencia.....	1
Un poco de historia.....	1
Receptores acoplados a proteínas G.....	1
Proteínas G.....	2
Activación de los GPCRs.....	4
Receptores adrenérgicos.....	6
La distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos y su importancia fisiológica.....	8
El receptor α_{1d} - adrenérgico.....	10
Los receptores con actividad de tirosina cinasa.....	11
El receptor del factor de crecimiento-1 similar a insulina (IGF-1R)....	12
Mecanismos de transducción.....	14
Proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G(GRKs)....	17
Arrestinas.....	18
Desensibilización.....	18
Desensibilización homóloga.....	18
Internalización.....	19
Desensibilización heteróloga.....	21

II.	Antecedentes.....	24
III.	Hipótesis.....	26
IV.	Objetivos.....	27
	General.....	27
	Particulares.....	27
V.	Planteamiento experimental.....	28
VI.	Materiales y métodos.....	29
	Materiales y reactivos.....	29
	Línea celular y cultivo.....	29
	Metodología de la Determinación de Ca ²⁺	29
	Fosforilación de los receptores.....	30
	Análisis estadístico.....	31
VII.	Resultados	31
VIII.	Discusión y conclusiones.....	38
IX.	Referencias.....	44

Abreviaturas utilizadas en este trabajo:

AC: adenilato ciclasa

AR: receptor adrenérgico

AMPC: adenosin monofosfato cíclico

ATP: adenosin trifosfato

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

DAG: diacilglicerol

ET: endotelina

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERK: cinasa regulada por señales extracelulares

GRKs: cinasas de receptores acoplados a proteínas G

Grb2: proteína con afinidad por los receptores de factores de crecimiento

GPCR: receptores acoplados a proteínas G

GH: hormona de crecimiento

GTP: guanosin trifosfato

IGF-1R: receptor del factor de crecimiento-1 similar a insulina

IGFBP: proteínas unidas a IGF-1

IR: receptor de insulina

IP₃: inositol trifosfato

IGF-I: factor de crecimiento-1 similar a insulina

LPA: ácido lisofosfatídico

MAPK: cinasa activada por mitógenos

PLC: fosfolipasa C

PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa

P85: subunidad reguladora de la PI3K

P110: subunidad catalítica de la PI3K

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PDK1: la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos-3

PKC: proteína cinasa C

PKA: proteína cinasa A

PLA: fosfolipasa A

PLD: fosfolipasa D

TPA: tetradecanoil forbol acetato

TGF- β R: receptor del factor de crecimiento transformante β

RTK: receptores con actividad de tirosina cinasa

Resumen

En el presente trabajo se estudió la regulación funcional del receptor α_{1d} -adrenérgico por el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). Se utilizaron fibroblastos de la línea celular Rat -1 transfectados con el receptor α_{1d} -adrenérgico que expresan de manera estable al receptor.

La activación del receptor induce la generación de segundos mensajeros, uno de ellos es la concentración de calcio intracelular. La estimulación del receptor α_{1d} -adrenérgico por su agonista noradrenalina, produce un incremento en la concentración de calcio intracelular de al menos cuatro veces de la concentración basal. En este estudio, la preincubación de las células durante 15 minutos con IGF-I disminuyó significativamente la concentración de calcio intracelular inducida por noradrenalina. Estos datos sugieren que el receptor α_{1d} -adrenérgico sufre desensibilización heteróloga por IGF-I.

La fosforilación es un proceso importante para la regulación de los receptores α_1 -adrenérgicos. El receptor α_{1d} -adrenérgico se encuentra fosforilado en condiciones basales y la estimulación con IGF-I induce un incremento significativo en la fosforilación. La fosforilación inducida por IGF-I fue dosis-dependiente con una EC_{50} de ≈ 3 ng/ml, y con una respuesta máxima a una concentración de 30 ng/ml de IGF-I.

La desensibilización se presenta después de 15 minutos de exposición de las células a IGF-I, lo que correlaciona con el curso temporal de la fosforilación. El efecto de fosforilación observado fue muy rápido y transitorio, pues la fosforilación alcanzó su máximo grado de los 5 a los 15 minutos (190-200% del basal), y después disminuyó lentamente, manteniéndose desde los 30 hasta los 60 minutos en los valores de 163 a 159 % del basal, respectivamente.

Para estudiar las proteínas cinasas responsables de la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I en la respuesta de la concentración de calcio intracelular, utilizamos inhibidores de la PKC: la estaurosporina (ST) y la bisindolil maleimida-I (BIM); igualmente utilizamos inhibidores de la PI3K: la wortmanina (WT) y la LY294002 (LY). Usando esta estrategia observamos que el efecto del IGF-I se revertía con dichos inhibidores, lo cual sugirió la participación de las isoformas de la PKC y de la PI3K en la regulación de la señalización del receptor α_{1d} -adrenérgico.

La fosforilación inducida por IGF-I fue bloqueada por estos mismos inhibidores, lo que confirmó que la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I ocurre a través de la PKC y PI3K.

Los datos presentados en este proyecto demuestran claramente que el receptor α_{1d} -adrenérgico es sujeto de la fosforilación por el estímulo con IGF-I a través de las PKC y PI3K. Esta fosforilación parece estar relacionada con la desensibilización del receptor.

I. Marco general de referencia

Un poco de historia

Las discusiones más tempranas acerca de una molécula biológicamente activa que se une a sitios específicos en la célula, se atribuyen a Ehrlich, Langley y Dale en la primera década del siglo XX. Ellos fueron los primeros en manifestar explícitamente la idea de “una sustancia receptora” en las células reactivas. Sus deducciones estaban basadas en experimentos fisiológicos y farmacológicos, usando las preparaciones del músculo liso aislado o glándulas salivales submaxilares, y combinaciones de agonistas y antagonistas para los receptores de adrenalina y acetilcolina (Lefkowitz, 2004).

Desde entonces los farmacólogos se han dedicado a estudiar los receptores, pero los avances significativos se han alcanzado solamente en los últimos 30-35 años, cuando los descubrimientos han transformado los receptores de un concepto abstracto fisiológico a una entidad fisicoquímica (Lefkowitz, 2004).

Actualmente se ha logrado un desarrollo muy importante en el conocimiento de los procesos de comunicación en los sistemas biológicos. Junto con el desarrollo científico en este campo se han venido encontrando diversas perspectivas de aplicación de los conocimientos a los procesos de salud y enfermedad. El entender la regulación de los mecanismos de la comunicación entre los receptores acoplados a proteínas G y los receptores con actividad de tirosina cinasa constituye un campo de estudio sumamente importante, como se señala más adelante.

Receptores acoplados a proteínas G

En los sistemas biológicos las células constantemente están expuestas a una compleja combinación de estímulos. Los estímulos extracelulares varían en su naturaleza química, concentración y tiempo de exposición.

La membrana plasmática juega un papel importante para transmitir la señal extracelular al interior de la célula. Se han identificado aproximadamente 1000 genes que codifican para los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la familia más abundante y versátil de los receptores membranales (Reiter y Lefkowitz, 2006).

Estos receptores son proteínas integrales de la membrana, cuya estructura posee siete hélices α transmembranales unidas por asas alternadas intracelulares y extracelulares. El extremo amino se encuentra en el lado extracelular de la membrana y junto con los segmentos transmembranales forman el sitio de unión al agonista; el extremo carboxilo se encuentra en el lado intracelular de la membrana, contiene secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por proteínas cinasas. Los GPCRs responden a una gran cantidad de mensajeros químicos, incluyendo la luz, los olores, los neurotransmisores, y las hormonas (Reiter y Lefkowitz, 2006).

Los GPCRs han sido agrupados en base a su homología en tres grandes familias: A, B y C (o I, II, y III) (Bockaert y Pin, 1999). La familia A es la más abundante (más de 90%); incluye al receptor para la rodopsina, receptores para las aminas biogénicas

como la adrenalina, noradrenalina, dopamina, acetilcolina y serotonina; receptores para péptidos como los opioides y encefalinas; receptores para los odorantes, entre otros. La familia B es menos grande y contiene los receptores para la secretina, trombina y glucagon. La familia C es aún menos numerosa, incluye al receptor GABA_B, ocho receptores para ácido glutámico, receptores sensibles a Ca²⁺ y también los receptores para feromonas y sabores.

Los GPCRs juegan un papel importante en todas las funciones del organismo, lo que les convierte en un blanco terapéutico directo para más del 30% de los fármacos (Rovati *et al.*, 2007). Los GPCRs interactúan con las proteínas G heterotriméricas y transducen la señal a través de ellas (Hall *et al.*, 1999).

Proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas son las encargadas de transducir las señales de los receptores hacia el interior de la célula por medio de la activación de sus efectores. Las proteínas G pertenecen a la familia de proteínas con actividad de GTPasa. Esta familia incluye a dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de transducción. Las proteínas G de bajo peso molecular monoméricas tales como Ras, que participan en las vías de transducción que conducen a la proliferación celular, Rho que regulan la arquitectura celular modificando elementos del citoesqueleto de actina ante diversos estímulos extracelulares, y Rab que participan en la movilización intracelular de vesículas. El segundo grupo contiene a las proteínas G heterotriméricas (Gilman, 1987).

Las proteínas G heterotriméricas contienen tres componentes: la subunidad α , la subunidad β y la subunidad γ . La subunidad α tiene sitios para la unión de nucleótidos de guanina y actividad de GTPasa; las subunidades β y γ están asociadas fuertemente formando el complejo $\beta\gamma$ que actúa como un dímero funcional (Hur y Kim, 2002).

Las subunidades de las proteínas G tienen un rango de heterogeneidad muy amplio: hasta ahora han sido clonadas e identificadas 17 subunidades α , 5 subunidades β y 12 subunidades γ (Radhika y Dhanasekaran, 2001). Los estudios basados en la similitud de la secuencia de los aminoácidos han permitido clasificar las subunidades α en cuatro grandes subfamilias: Gs, Gi/o, Gq/11 y G_{12/13}. La estimulación de la subfamilia Gs activa a la adenilil ciclasa, mientras que la estimulación de la subfamilia Gi lleva a la inhibición de la adenilil ciclasa. La estimulación de la subfamilia Gq/11 activa la fosfolipasa C (PLC), y la subfamilia G_{12/13} esta implicada en la regulación de pequeñas proteínas G como Rho y Rab (Figura 2). La mayoría de los GPCRs tienen preferencia para acoplarse con ciertas subfamilias de proteínas G; sin embargo, los receptores pueden activar a varias clases de proteínas G con reducida eficacia (Hur y Kim, 2002).

Las proteínas G existen en su estado inactivo formando el trímero entre la subunidad α y las subunidades $\beta\gamma$. La activación de los GPCR llevan al intercambio de GDP por GTP en la subunidad α del heterotrímero. Una vez unida a GTP, la subunidad α adopta su conformación activa y el heterotrímero se disocia en G α -GTP y G $\beta\gamma$, ambos con actividad directa sobre diversos efectores (Hur y Kim, 2002) (Figura 1).

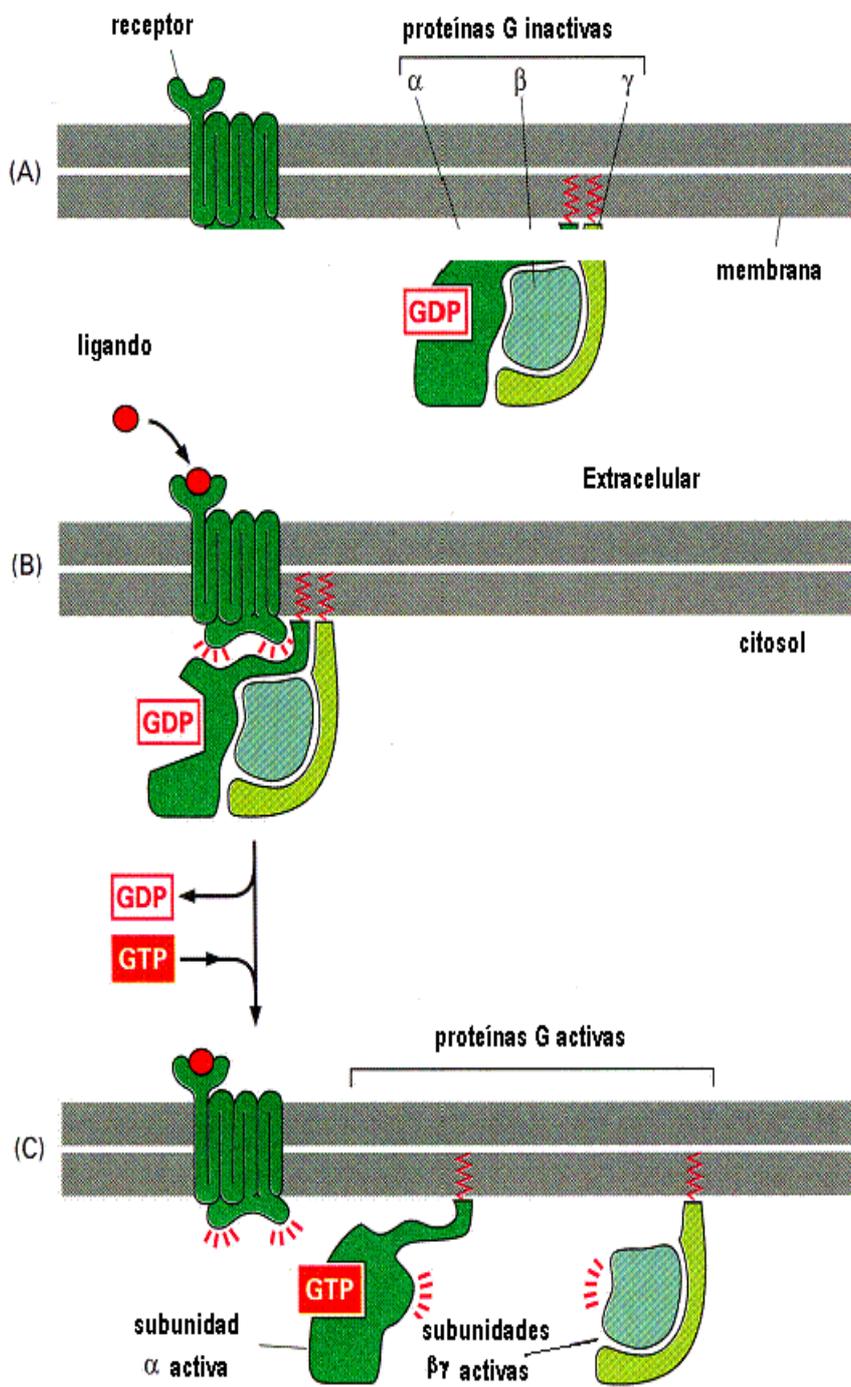


Figura 1. Activación de Proteínas G.

Las proteínas G existen en su estado inactivo formando el trímero entre la subunidad α y las subunidades $\beta\gamma$. La activación de los GPCR lleva al intercambio de GDP por GTP en la subunidad α del heterotrímero. Una vez unida a GTP, la subunidad α adopta su conformación activa y se disocia el heterotrímero en $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, ambos con actividad directa sobre diversos efectores (www.grossmont.edu/.716:17_gprot_dissociate.lpg).

La subunidad $G\beta\gamma$ transduce la señal interaccionando con muchas otras proteínas incluyendo: los GPCRs, las GTPasas y otras moléculas efectoras como la adenilil ciclasa, PLC β , PI3K y las proteínas de la vía de las MAP cinasas (Figura 2). El período de vida del estado activo de la subunidad α es limitado por la hidrólisis de GTP y el heterotrímero se vuelve a asociar adoptando su estado inactivo (Digby *et al.*, 2006).

De acuerdo con lo descrito, la diversidad de las proteínas G y las moléculas efectoras es bastante amplia. El panorama de las vías que pueden ser activadas por los GPCRs en una célula o en un órgano particular es muy complejo, lo que plantea mecanismos de regulación altamente específicos. Por ejemplo, podemos observar que la regulación de la actividad de las isoformas de la adenilil ciclasa es muy especializada. La especificidad es un punto crítico para el reconocimiento de ciertas proteínas G por el receptor. También la especificidad depende de las moléculas efectoras expresadas en cierto órgano o en un tipo celular. Igualmente las concentraciones de varios componentes juegan un papel importante en la vía de la transducción de señales.

Activación de los GPCRs

Los GPCRs se afectan por varios ligandos específicos para el receptor. Todos estos ligandos pueden unirse al receptor, pero su actividad puede ser modulada: los agonistas estimulan al máximo al receptor; los agonistas parciales pueden activar al receptor hasta un cierto grado. La acción de los agonistas puede ser evitada por los llamados “*antagonistas*”. Originalmente se pensaba que los “*antagonistas*” competían con los agonistas por el mismo sitio de unión del ligando, pero sin afectar la actividad del receptor directamente. Las observaciones experimentales de los últimos 10 años han llevado a los conceptos de la actividad constitutiva del receptor y del agonista inverso. La actividad constitutiva del receptor es la actividad intrínseca que posee el receptor independiente del ligando. Este concepto surge de la existencia de las drogas que son capaces de inhibir la actividad constitutiva del receptor (Strange, 2002). Los estudios en el ámbito farmacológico y en el nivel molecular han permitido desarrollar el “modelo del complejo alostérico ternario” para explicar la activación de los GPCRs (Samama *et al.*, 1993). De acuerdo con este modelo el receptor se encuentra en un equilibrio entre dos conformaciones: la inactiva R y la activa R*. El agonista estabiliza la conformación activa del complejo ternario formado por el agonista, el receptor activo R* y la proteína G. Los agonistas tienen una afinidad más alta por R*, lo que incrementa el cociente R*/R. Los agonistas inversos, al contrario, presentan una mayor afinidad por R, que por R* y disminuyen el cociente R*/R (Strange, 1999). Entonces muchos “*antagonistas*” han sido renombrados como agonistas inversos, ya que “antagonizan” la acción de los agonistas, y también pueden reducir los niveles basales de la actividad de los GPCR. Siguiendo la nueva nomenclatura, los agonistas inversos parciales son capaces de inhibir la actividad constitutiva; mientras que los antagonistas neutros tienen igual afinidad por ambas conformaciones y no modifican el equilibrio entre R* y R (Leurs *et al.*, 1998).

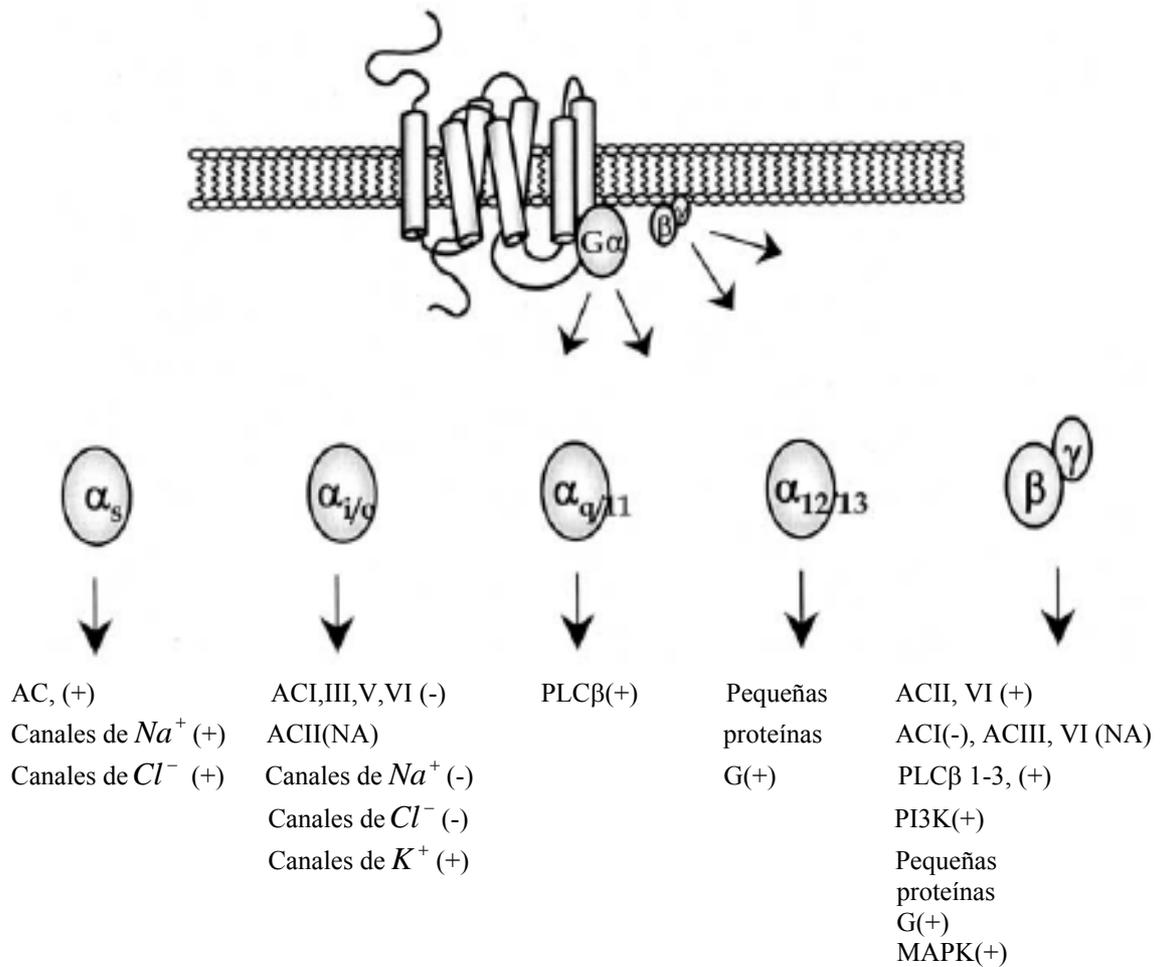


Figura 2. Moléculas efectoras reguladas por diferentes subunidades de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$.

Los GPCRs activan las proteínas G, lo que lleva a la formación de la $G\alpha$ -GTP y la $G\beta\gamma$, ambas con actividad directa sobre diversos efectores. (+) activación, (-) inactivación, (NA) no está afectado, AC-adenilato ciclasa, PI3K- fosfatidilinositol 3 cinasa, PLC- fosfolipasa C, MAPK- las cinasas activadas por mitógenos (Hur y Kim, 2002).

Receptores adrenérgicos

Dentro de los receptores acoplados a las proteínas G se encuentran los receptores adrenérgicos, los que están subdivididos en 3 familias: α_1 , α_2 y β basándose en su farmacología, estructura y mecanismos de señalización. Cada familia contiene tres subtipos y todos son miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (Hieble *et al.*, 1995) (Figura 3).

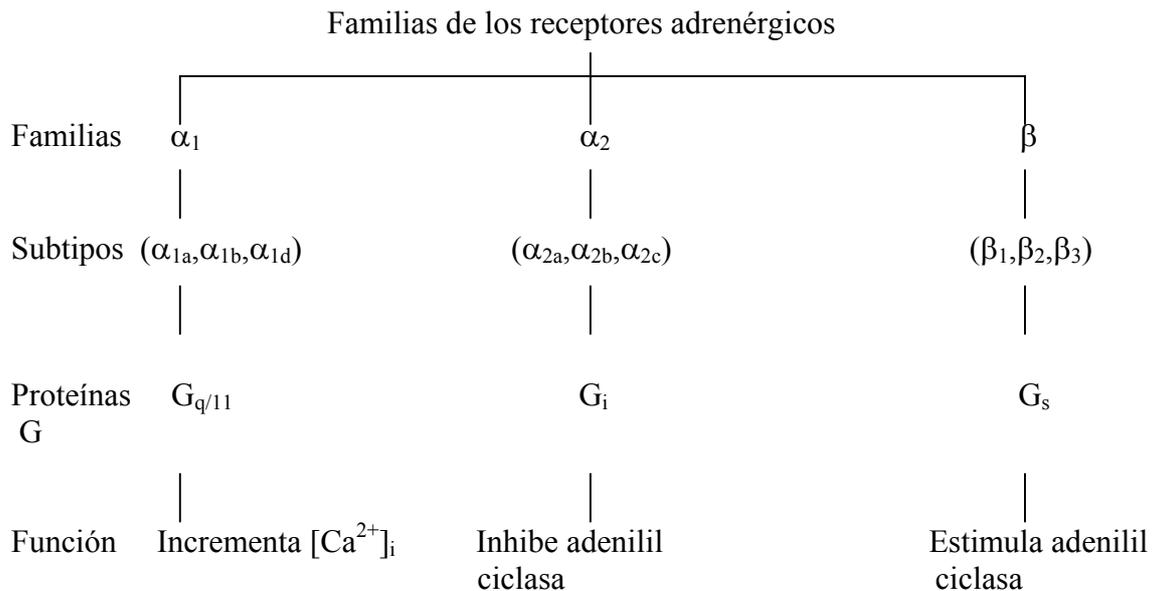


Figura 3. Familia de receptores adrenérgicos subdividida en 3 subfamilias.

Gracias a los estudios realizados utilizando la estructura cristalográfica de la rodopsina ha sido posible entender la estructura tridimensional de los GPCR. Usando modelaje molecular diversos grupos de investigadores han podido construir los modelos tridimensionales de los receptores α_1 – adrenérgicos (Carrieri *et al.*, 2001; Cotecchia *et al.*, 1998). Los receptores adrenérgicos se caracterizan por presentar un amino terminal extracelular, segmentos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que forman siete dominios transmembranales conectados por tres asas extracelulares, tres intracelulares y un carboxilo terminal intracelular, como se muestra en la Figura 4.

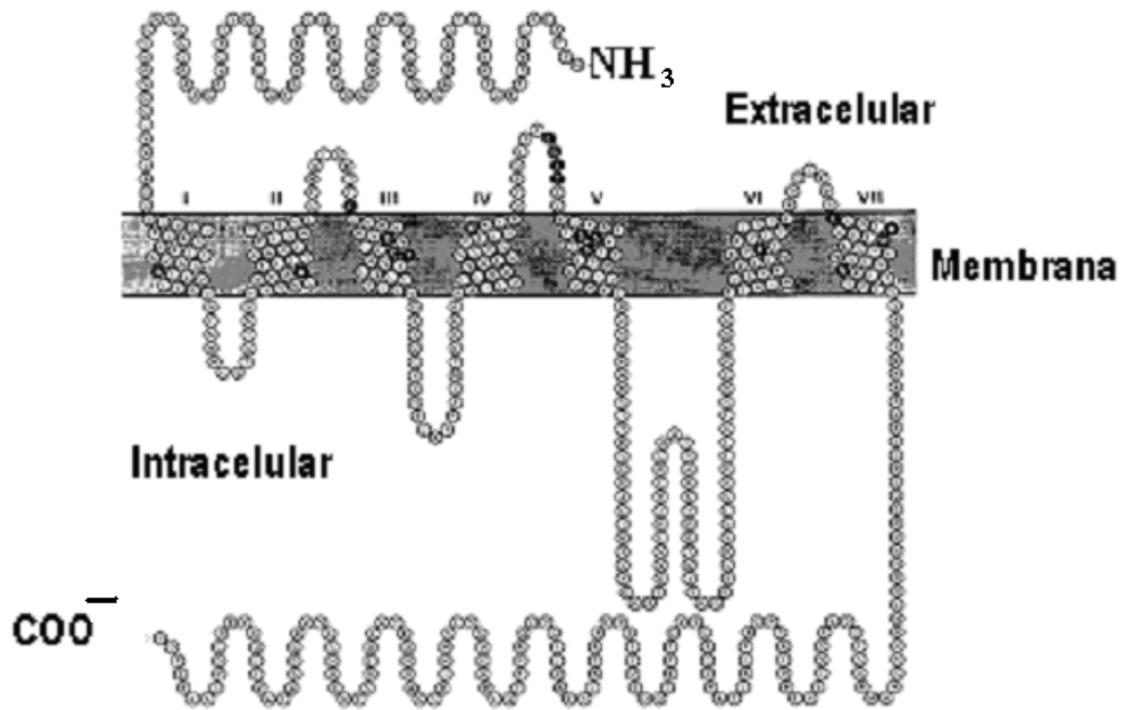


Figura 4. Dominios estructurales de los receptores adrenérgicos.

Estos receptores se caracterizan por presentar un amino terminal extracelular, segmentos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que forman siete dominios transmembranales conectados por tres asas extracelulares, tres intracelulares y un carboxilo terminal intracelular. En esta representación se muestra el receptor α_{1d} -adrenérgico (Carrieri *et al.*, 2001).

Los agonistas naturales de los receptores adrenérgicos son las catecolaminas adrenérgicas: la adrenalina y la noradrenalina. Easson y Stedman por primera vez trataron de explicar las diferencias funcionales de las aminas biogénicas dependiendo de su isomería óptica en el año de 1933 (Easson y Stedman, 1933). La idea central de su hipótesis consistía en que por lo menos hay tres puntos específicos que determinan la unión de las aminas biogénicas con el receptor y que era crítico para su función. Datos actuales son consistentes con ese modelo: el amino protónico de la noradrenalina interacciona con el ácido aspártico (Asp) del dominio transmembranal (TM) III, el β -hidroxilo del centro giratorio interacciona con la asparragina (Asn) del TM VI y los hidroxilos del anillo aromático interaccionan con las serinas (Ser) del TM V (Figura 5).

En aquel tiempo, cuando los residuos específicos del receptor ni siquiera eran conocidos, Easson y Stedman demostraron farmacológicamente la validez de su hipótesis. La mayoría de los GPCRs presentan residuos (los ácidos aspártico y glutámico) con carga negativa en la tercera asa transmembranal que actúa como contra-ión para contrarrestar la carga positiva que presentan muchos ligandos y permitiendo así que pueda existir una unión no covalente entre el receptor y su ligando. Actualmente, gracias a estudios realizados utilizando mutagénesis dirigida, ha sido posible conocer los aminoácidos y los sitios específicos de unión al ligando. El modelo estructural más aceptado indica que las asas extracelulares III, IV, V,VI forman un dominio de unión al ligando (Perez, 2007). Otro sitio de unión muy importante es el que interacciona con las proteínas G y se localiza en las asas intracelulares II y III. Se ha encontrado que el residuo de lisina (Lys) en el dominio TM VII está involucrado en la activación de los receptores α_{1b} - y α_{1d} -adrenérgicos. En el estado basal inactivo, este residuo de lisina (Lys 331 para el α_{1b} y Lys 379 para α_{1d}) forma puente salino con el ácido aspártico conservado en el dominio TM III (Asp 125 para el α_{1b} y Asp 170 para el α_{1d}). La unión del agonista promueve la ruptura del puente salino y la activación del receptor (Porter *et al.*, 1996; Carrieri *et al.*, 2001; Cotecchia *et al.*, 1998). Es interesante notar que el aminoácido lisina está conservado sólo en la familia de receptores α_1 – adrenérgicos, mientras que en la familia de receptores α_2 -adrenérgicos está substituido por aminoácidos neutros o polares y en la familia de receptores β -adrenérgicos está substituido por residuos hidrofóbicos (Carrieri *et al.*, 2001).

La distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos y su importancia fisiológica

Los receptores α_1 -adrenérgicos están presentes en muchos tejidos incluyendo cerebro, corazón, arterias, hígado, riñón, próstata y bazo. Participan en muchos procesos fisiológicos esenciales como la neurotransmisión a nivel central y periférico, regulación del ritmo cardíaco, modulación del metabolismo hepático, modulación del tono vascular y contracción del músculo liso en el sistema genitourinario (García-Sáinz *et al.*, 2000). En muchos tejidos la expresión de los subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos se traslapa, lo que hace más compleja la identificación del papel fisiológico de cada uno de los subtipos.

La distribución de los receptores α_1 -adrenérgicos en diferentes tejidos varía entre especies. En el humano el mRNA del subtipo α_{1a} es predominante en corazón, cerebro, corteza cerebral y próstata.

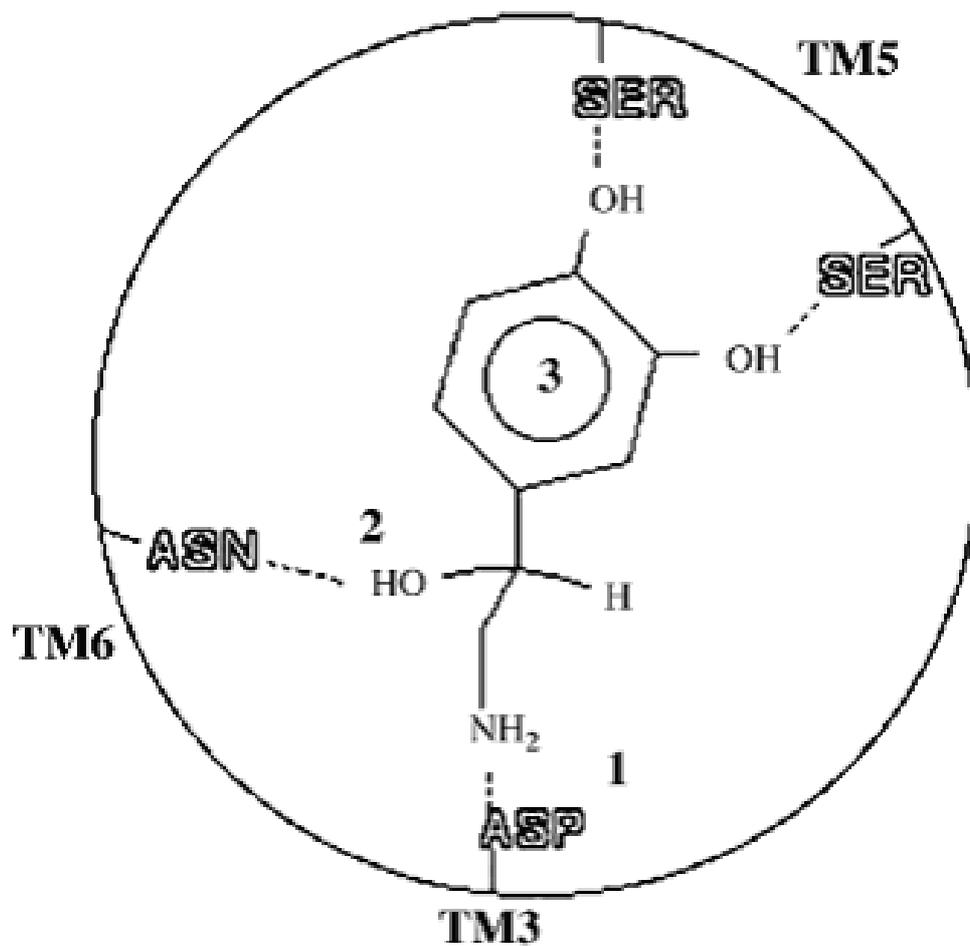


Figura 5. Sitios de unión de los agonistas al receptor.

La idea central de su hipótesis consistía en tres puntos específicos que determinaban la unión de las aminas biogénicas con el receptor. El amino protónico de noradrenalina interacciona con el ácido aspártico (ASP) en TM III, el β -hidroxilo del centro giratorio interacciona con asparagina (ASN) en TM VI (2), los hidroxilos del anillo aromático interaccionan con las serinas en TM V (3) (Perez, 2007).

Músculo vascular y otros tipos de músculo liso expresan predominantemente el α_{1a} y el α_{1d} . El subtipo α_{1b} predomina en riñón y bazo y el α_{1d} en la aorta (Price *et al.*, 1994).

Por su importancia fisiológica la disfunción de los receptores α_1 -adrenérgicos ha sido ligada a varios padecimientos como la hipertrofia prostática benigna, la hipertrofia cardíaca y la hipertensión.

El receptor α_{1d} se expresa de manera funcional en arterias como la aorta, iliaca, carótida, mesentérica, femoral y renal (García-Sáinz *et al.*, 1999). Se ha sugerido que este subtipo de receptores es el más importante en la regulación del tono vascular periférico y que está relacionado con padecimientos vasculares como la hipertensión.

La hipertensión es un estado patológico caracterizado por el aumento en la resistencia vascular periférica, lo que lleva al incremento de la presión sanguínea, es el factor de riesgo más importante en las enfermedades cardiovasculares.

La hipersensibilidad de los músculos lisos vasculares a la noradrenalina ha sido considerada como un elemento importante involucrado en el incremento y mantenimiento de la presión sanguínea. Ha sido demostrado que el receptor α_{1d} -adrenérgico está involucrado en la contracción de arterias como la aorta, carótida y mesentérica de una rata adulta con hipertensión espontánea (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996). Los estudios del receptor α_{1d} -adrenérgico constitutivamente activo han revelado que es el responsable del mantenimiento de la contracción de la aorta y de otras arterias de la rata, retardando los cambios bruscos en el diámetro de los vasos sanguíneos cuando el estímulo se retira, para evitar saltos en la presión (Ziani *et al.*, 2002). Recientemente el papel del receptor α_{1d} -adrenérgico en el control de la presión sanguínea se ha confirmado con los resultados de los experimentos usando ratones “knockout” para el receptor α_{1d} ; la presión sanguínea de estos animales es significativamente baja lo que ha indicado que los receptores α_{1d} -adrenérgicos están involucrados en el mantenimiento de la presión arterial (Tanoue *et al.*, 2003).

El estudio de la modulación funcional de los receptores α_1 -adrenérgicos es de gran interés fisiológico y tiene perspectivas terapéuticas.

El receptor α_{1d} -adrenérgico

En un principio se había pensado que el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata era el subtipo α_{1a} , el cual ya se conocía, pero otro grupo de investigadores clonó de manera independiente el mismo receptor, descubriendo que en realidad era un nuevo subtipo de los receptores α_1 -adrenérgicos, denominado receptor α_{1d} -adrenérgico. Posteriormente se clonó el receptor α_{1d} -adrenérgico de humano; el gen para este receptor está localizado en el cromosoma 20.

Los receptores α_{1d} -adrenérgicos de rata y de humano son muy similares; más de 83% de sus secuencias son idénticas. El receptor α_{1d} -adrenérgico de rata es un polipéptido de 561 aminoácidos con una masa molecular de 59364 daltones, mientras que el receptor α_{1d} -adrenérgico de humano contiene 572 aminoácidos con una masa molecular de 60462 daltones. La masa molecular experimentalmente detectada dichos es de 70-80 Kda aproximadamente (García-Sáinz *et al.*, 2001). La discrepancia en peso se debe a glucosilación.

En el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata se han identificado dos sitios potenciales de glucosilación, Asn60 y Asn76; un enlace potencial disulfuro entre las asas extracelulares dos y tres (Cys163 –Cys240). También se han identificado dos sitios de palmitoilación en Cys413 y Cys415. El receptor no posee sitios de fosforilación para PKA pero sí tiene sitios potenciales para PKC en las siguientes posiciones: Ser 195 (segunda asa intracelular), Thr278 y Thr322 (tercer asa intracelular) y Ser424, Ser448 y Ser 480 en el carboxilo terminal (Watson y Arkininstall, 1994).

Los siete dominios transmembranales y tres asas extracelulares e intracelulares de los dos receptores α_{1d} -adrenérgicos son muy similares, con casi idénticas longitud y secuencia. Las diferencias más notables se presentan en el amino terminal extracelular y en el carboxilo terminal intracelular. El amino terminal del receptor de humano contiene 95 aminoácidos, mientras que el receptor de rata contiene sólo 90 aminoácidos. El carboxilo terminal del humano contiene 167 aminoácidos y el de rata sólo 161 aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que el residuo de lisina en la asa transmembranal VII está involucrado en la activación de receptor α_{1d} -adrenérgico. En el estado basal inactivo este residuo de lisina (Lys 379) forma un puente salino con el ácido aspártico conservado en el dominio TM III (Asp 170). La unión del agonista promueve la ruptura del puente salino y la activación del receptor (Porter *et al.*, 1996; Carrieri *et al.*, 2001; Cotecchia *et al.*, 1998).

Los GPCRs pueden formar homodímeros y heterodímeros, lo que genera la formación de complejos multiprotéicos, cuyo tráfico, señalización y propiedades farmacológicas resultan afectadas. El receptor α_{1d} -adrenérgico forma heterodímeros con el receptor α_{1b} -adrenérgico, lo que le permite al receptor α_{1d} -adrenérgico trasladarse a la membrana celular (Hague *et al.*, 2004b). El mismo grupo de investigadores (Hague *et al.*, 2004a) ha demostrado que el extremo amino del receptor α_{1d} -adrenérgico evita la localización del receptor en la membrana plasmática. Por esta razón la mayoría de los receptores han sido encontrados dentro de la célula, mientras que el receptor truncado en el extremo amino es trasladado hasta la membrana. Posteriormente, los estudios de los receptores quiméricos de otros subtipos que contienen el extremo amino del receptor α_{1d} -adrenérgico, han demostrado la disminución significativa de la densidad de los receptores en la membrana (Hague *et al.*, 2004a). Estos datos han fortalecido la idea de que el extremo amino del receptor α_{1d} -adrenérgico contiene una señal para su localización intracelular (Hague *et al.*, 2004a); (Hague *et al.*, 2004b).

Los receptores con actividad de tirosina cinasa

Dentro de los receptores con actividad enzimática se encuentran los receptores con actividad de tirosina cinasa, y entre ellos los receptores de insulina (IR), del factor de crecimiento epidérmico (EGF), del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y del factor de crecimiento-I similar a insulina (IGF-I).

Los receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) están involucrados en las señales de transducción que regulan funciones celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. Los RTKs presentan un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular con actividad de tirosina cinasa.

La unión del ligando induce la dimerización de receptores y la autofosforilación en residuos de tirosina en el dominio intracelular, formando sitios SH2 o sitios para la unión a fosfotirosina (phosphotyrosine binding (PTB) sites).

Los dominios SH2 o PTB del receptor adquieren una enorme afinidad por una serie de proteínas que se fijan al receptor formando un gran complejo. Entre estas proteínas se encuentran las que reconocen el dominio SH2 (Src y Ras-GAP) y las llamadas proteínas adaptadoras (Grb2, Shc and Crk). Igualmente se encuentran otras proteínas que permiten que nuevas proteínas se acoplen al complejo, como es el caso del acoplamiento de la proteína P₈₅ con la subunidad catalítica (P₁₁₀) de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Gavi *et al.*, 2006).

El receptor del factor de crecimiento-I similar a insulina (IGF-IR)

El receptor del factor de crecimiento-I similar a insulina (IGF-IR) está formado por dos cadenas idénticas de aminoácidos unidas covalentemente por puentes disulfuros. Cada una de ellas contiene una subunidad alfa extracelular y una subunidad beta localizada en las regiones transmembranal e intracelular. La subunidad beta posee la actividad de tirosina cinasa. El IGF-IR es transportado a la membrana en su forma dimerica. La unión de IGF-I o IGF-II al receptor induce el cambio conformacional que lleva a la transfosforilación entre las subunidades beta. El receptor activado y fosforilado en los residuos de tirosina recluta y fosforila las proteínas adaptadoras que sirven como anclaje para otras moléculas, activando las vías de señalización a través de PI3K y MAP cinasas (Ullrich *et al.*, 1986) (Figura 6).

Gracias a estudios realizados utilizando la estructura cristalográfica de IGF-IR ha sido posible construir un modelo molecular de la actividad catalítica del receptor. También se han determinado los residuos de tirosina críticos para la autofosforilación del receptor: Y1131, Y1135 y Y1136 (Favelyukis *et al.*, 2001).

El IGF-I que circula por la sangre es producido principalmente por el hígado, aunque varios tejidos también pueden sintetizar este péptido localmente. La síntesis del IGF-I en el hígado es dependiente, en gran parte, de la hormona de crecimiento (GH). El IGF-I y la GH juegan un papel muy importante en el período de crecimiento postnatal. La bioactividad del IGF-I en el suero es modulada por su unión a IGFBPs (proteínas de unión a IGF-I). Se han identificado seis miembros de esta familia (de IGFBP-1 a IGFBP-6), pero IGFBP3 es la predominante y forma más del 90% de los complejos con IGF-1 (Karamouzis y Papavassiliou, 2006). El acoplamiento de este complejo prolonga la vida media de IGF-1 en el suero sanguíneo de 10 minutos a 15 horas, evitando el efecto de hipoglucemia o el crecimiento celular no adecuado, que puede causar el IGF-I libre. La proteólisis de las IGFBPs por proteasas también es un factor importante en la regulación de la actividad de IGF-I, porque puede llevar a la liberación del IGF-I y su unión al receptor (Grimberg, 2003).

Monitoreando las evidencias de los últimos diez años se ha revelado el papel crítico de IGF-I en el desarrollo y progresión del cáncer. El IGF-IR se expresa en los tejidos donde juega un papel importante en el crecimiento celular. La hormona de crecimiento libera IGF-I y activa IGF-IR estimulando el crecimiento celular normal.

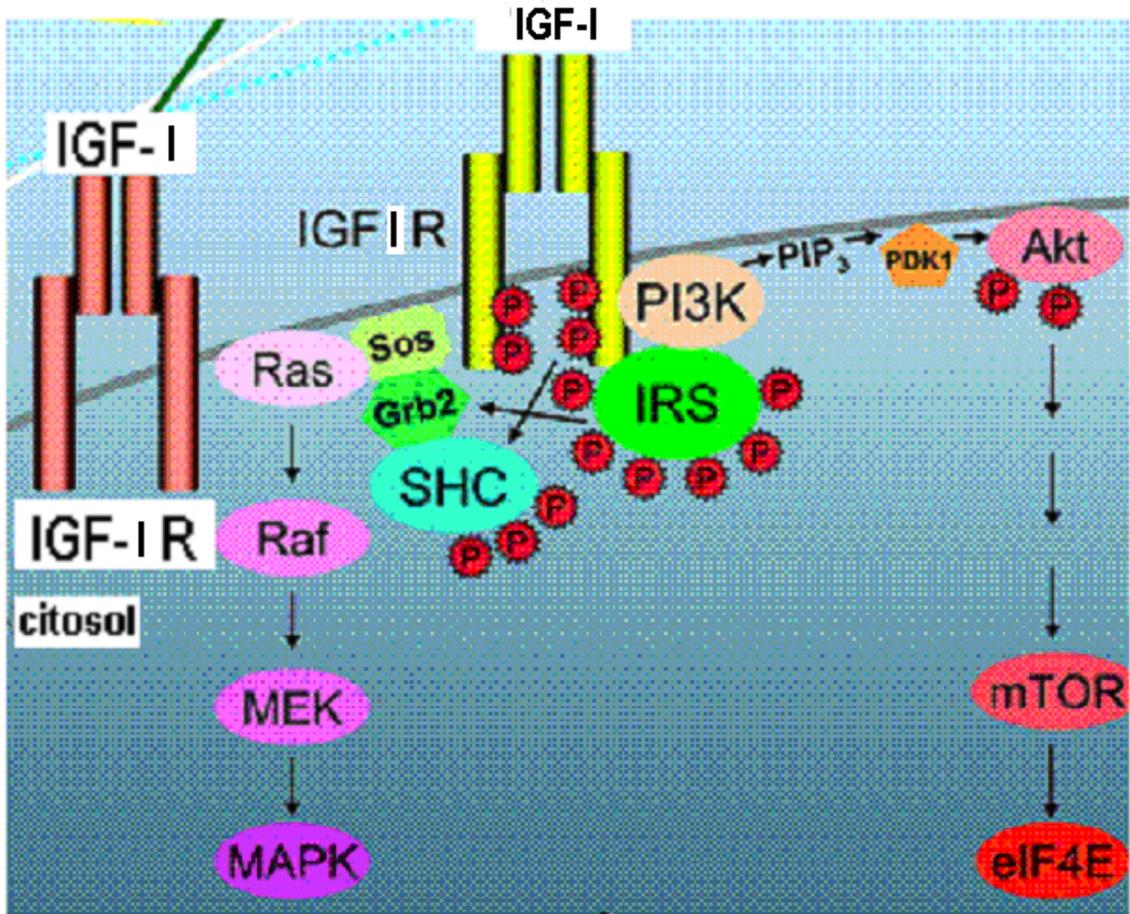


Figura 6. Cascadas de señalización del IGF-IR.

La unión del ligando promueve la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina en el dominio intracelular (P - sitios de fosforilación). El IGF-IR fosforilado recluta y fosforila a las proteínas adaptadoras como la ShC y la IRS, que a su vez activan cascadas de fosforilación vía MAP cinasas (ShC/Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/MAPK) y vía PI3K/Akt (actividad enzimática de PI3K que genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), activa la PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinosítidos-3), la que a su vez fosforila a proteína cinasa B/Akt) (Sachdev y Yee, 2007).

Por otro lado, los experimentos clásicos del grupo de Baserga han demostrado que el incremento del número de IGF-IR en la membrana puede llevar al crecimiento no adecuado de las células (Baserga, 1999). Muchos estudios experimentales y clínicos han demostrado que IGF-IR está sobreexpresado en los tejidos cancerosos, en comparación con los tejidos normales.

Posteriormente los estudios han reportado correlación entre mayor cantidad de IGF-I en el suero sanguíneo y los riesgos de diferentes tipos de cáncer (Hankinson *et al.*, 1998). Otro aspecto en el desarrollo del cáncer está basado en la estimulación de la actividad de IGF-IR por proto-oncogenes y su inhibición por supresores de los oncogenes (Baserga, 1994; Girnita *et al.*, 2000a; Girnita *et al.*, 2000b; Girnita *et al.*, 2000c; Kanter-Lewensohn *et al.*, 2000a; Kanter-Lewensohn *et al.*, 2000b).

La expresión del IGF-IR es estimulada por los esteroides y otras hormonas, así como por algunos factores de crecimiento, mientras que su expresión se inhibe por las proteínas supresoras tumorales.

Mecanismos de transducción

Uno de los sistemas de transducción de señales mejor conocido es la vía de recambio de fosfoinosítidos-calcio. Los receptores α_1 -adrenérgicos utilizan este sistema acoplándose a proteínas $G_{q/11}$. El efector principal de estas proteínas es la fosfolipasa C (PLC). La PLC hidroliza al fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato de la membrana liberando diacilglicerol (DAG) e IP_3 . El acoplamiento del IP_3 a su receptor en el retículo endoplásmico induce la liberación del Ca^{2+} intracelular, y simultáneamente el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) como se muestra en la Figura 7.

Los receptores α_1 -adrenérgicos también pueden actuar a través de la familia de las proteínas G sensibles a toxina pertusis (G_i , G_o , y G_s) y a través de la familia de $G_{12/13}$ activando otras moléculas de diferentes vías de señalización. Los receptores que actúan a través de las proteínas G_s y G_i provocan la estimulación o la inhibición de una enzima asociada a la membrana denominada adenilil ciclasa (AC), la cual al activarse convierte el ATP en 3'5'-AMP cíclico (AMPc). El AMPc activa, mediante un cambio conformacional, a la cinasa dependiente de AMPc, denominada PKA, la cual fosforila residuos de serina o treonina de diversas proteínas reguladoras, provocando respuestas celulares como la inducción de genes o la liberación de glucosa por el hígado. Si los receptores se unen a la subunidad G_i , se inhibe la adenilil ciclasa, por lo que la formación de AMPc no ocurre (Figura 8).

Los receptores α_1 -adrenérgicos pueden activar las proteínas G de bajo peso molecular monoméricas, que pueden actuar sobre diferentes isoformas de PLC (Nakaoka *et al.*, 1994). La estimulación de los receptores α_{1b} y α_{1d} también puede llevar a la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), produciendo la liberación de ácido araquidónico. Esta activación es mediada principalmente por la movilización de calcio intracelular y por el acoplamiento a proteínas G sensibles a la toxina pertusis, dependiendo del tipo celular (Perez *et al.*, 1993).

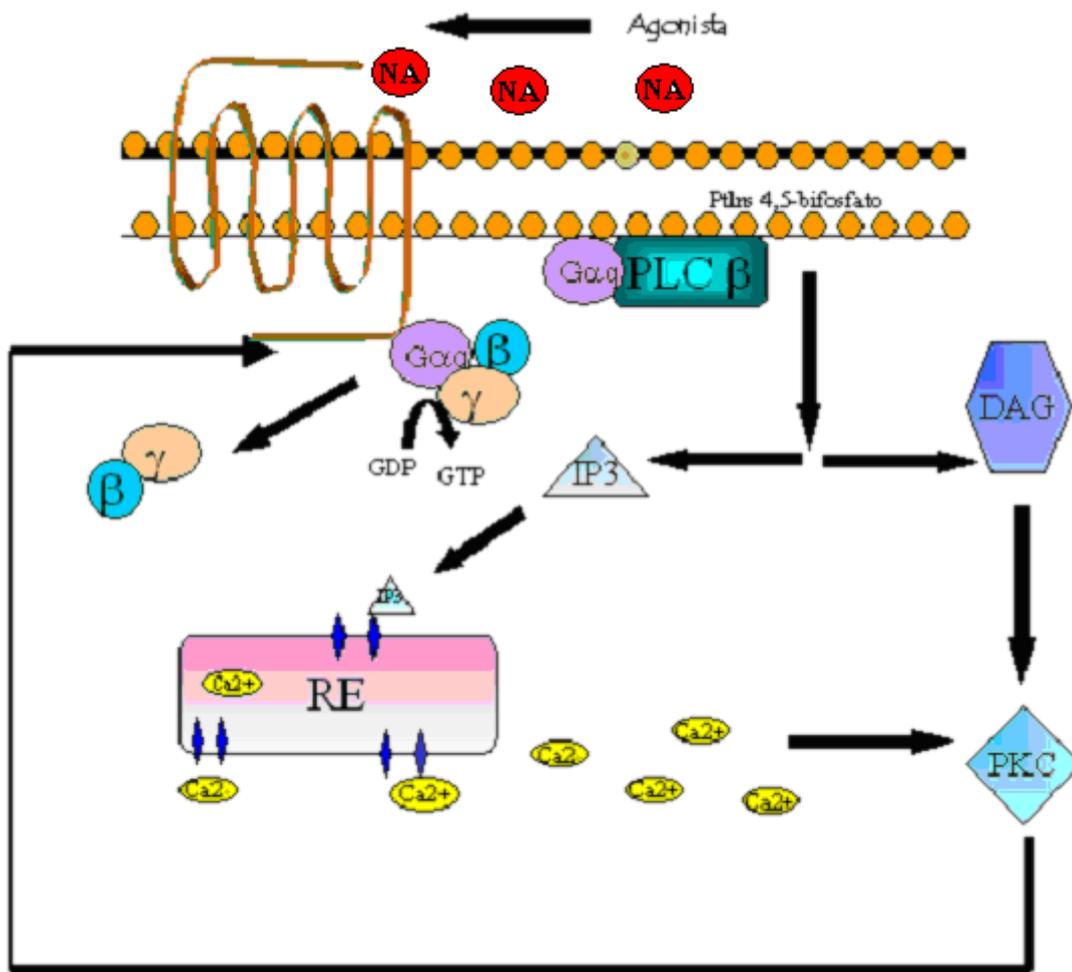


Figura 7. Vía de señalización del sistema de fosfoinosítidos-calcio.

La activación del receptor por su ligando activa proteínas G, que a su vez inducen la activación de PLC. La PLC hidroliza al fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bifosfato de la membrana liberando diacilglicerol (DAG) e IP₃. El acoplamiento del IP₃ a su receptor en el retículo endoplásmico induce la liberación del Ca²⁺ intracelular, y simultáneamente el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC). Noradrenalina (NA), fosfolipasa C β (PLCβ), Inositol Trifosfato (IP₃), Diacil Glicerol (DAG), Proteína Cinasasa C (PKC).

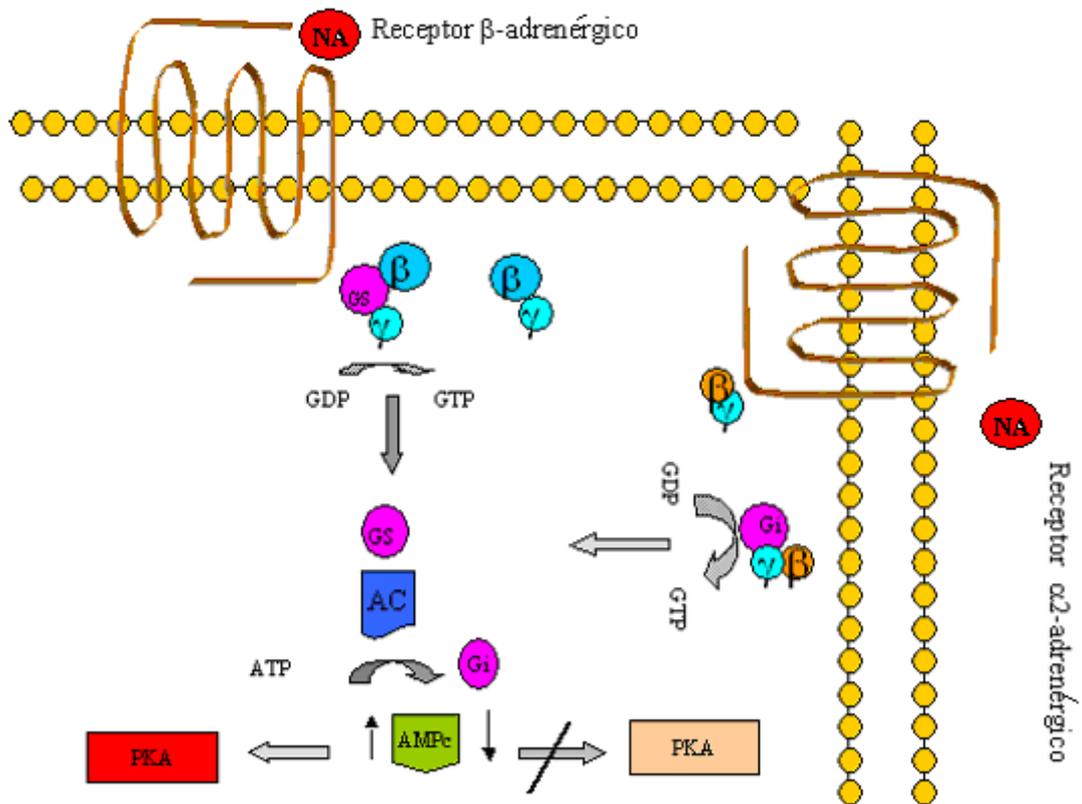


Figura 8. Vía de señalización de la Adenilil Ciclasa.

La activación del receptor lleva al intercambio de GDP por GTP provocando la estimulación o la inhibición de una enzima asociada a la membrana denominada adenilil ciclasa (AC), la cual al activarse convierte el ATP en 3'5' - AMP cíclico (AMPc). El AMPc activa, mediante un cambio conformacional, a la cinasa dependiente de AMPc, denominada PKA la cual fosforila residuos de serina o treonina de diversas proteínas reguladoras, provocando respuestas celulares como la inducción de genes o la liberación de glucosa en hígado. Si los receptores se unen a la subunidad Gi, se inhibe la adenilil ciclasa, por lo que la hidrólisis de ATP no ocurre. Norepinefrina (NE), Difosfato de Guanidina(GDP), Trifosfato de Guanidina(GTP), Adenilil Ciclasa (AC), Adenosin Monofasfato Ciclico (AMPc), Adenosin Trifosfato (ATP), Proteína Cinasa A (PKA).

Otras respuestas activadas por estos receptores incluyen modulación de los canales iónicos, control de las proteínas transportadoras, activación de proteínas cinasas y estimulación de factores de transcripción. La estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos puede modular la actividad de varios tipos de canales: canales de potasio, canales de calcio, canales de sodio. Se ha reportado que los receptores α_1 -adrenérgicos pueden activar o inhibir a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) incluyendo ERK, JNK y p38 (Zhong y Minneman, 1999), receptores con actividad de tirosina cinasa y a cinasas de tirosina que no funcionan como receptores. Por ejemplo Src o el receptor para el factor de crecimiento epidérmico, y otras proteínas cinasas: fosfatidilinositol-3 cinasa, Akt, rho cinasa, proteína cinasa dependiente de calmodulina (Della Rocca *et al.*, 1997). Las MAPKs activan respuestas mitogénicas en varios tipos celulares, realizando un papel importante en la regulación del crecimiento y la proliferación celular.

Proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs)

La regulación de los GPCRs se realiza a través de la gran familia de las proteínas cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs), enzimas que interaccionan y fosforilan al receptor activado por el agonista específicamente en residuos de serina y treonina (Pao y Benovic, 2005). La familia de las GRKs consta de siete miembros diferentes clasificados en tres subfamilias: GRK1 (rodopsina cinasa) y GRK7, que se encuentran en bastones y conos de la retina respectivamente, forman una subfamilia (Reiter y Lefkowitz, 2006). Las GRKs no visuales están divididas en dos subfamilias: la subfamilia de GRK2, que consiste de GRK2 (β ARK1) y de GRK3 (β ARK2) y la subfamilia GRK4 que consiste de GRK4, GRK5 y de GRK6. La GRK4 está predominante en testículos y en menor cantidad en cerebro y riñones. Las GRK2,3,5 y 6 se expresan en muchos órganos de los mamíferos (Yang y Xia, 2006). La estructura básica de los miembros de las GRKs encontradas en la retina es similar a la de otras GRKs encontradas en órganos diferentes, con un dominio central catalítico (263-266 aminoácidos) altamente conservado. La región amino terminal (N-terminal) de 185 aminoácidos es parecida entre las proteínas cinasas señaladas arriba. La similitud de N-terminal entre las GRKs lleva a pensar que esta región juega un papel importante en el reconocimiento del receptor. Todos las GRKs no visuales tienen un dominio de regulación de señalización de proteínas G (RGS- regulator of G-protein signaling) dentro del dominio N-terminal (Yang y Xia, 2006). El carboxilo terminal (C-terminal) de GRK2 y GRK3 contiene un dominio homólogo de la pleckstrina (PH), que interacciona con $G\beta\gamma$ y fosfatidilinositol-4,5-bifosfato activando el traslado de las GRKs primarias del citosol a la membrana (Reiter y Lefkowitz, 2006). Las GRK4,5 y 6 se localizan constitutivamente en la membrana, GRK4 y 6 son palmitoiladas y GRK5 se une directamente a los fosfolípidos. Las GRK1 y GRK7 tienen muchas similitudes con las GRKs no visuales: en el amino terminal contienen el dominio RGS y un dominio central catalítico, las dos se localizan en la membrana vía farnesilacion (Yang y Xia, 2006).

Arrestinas

La función de las arrestinas fue identificada por primera vez hace 20 años. La arrestina visual en aquel tiempo era conocida como “proteína de 48kDa” o “antígeno S” y era capaz de “arrestar” o apagar la actividad de fosfodiesterasa de cGMP en los bastones de la retina. Posteriormente fue clonada e identificada una proteína no visual, que inhibía la señalización del receptor β 2-adrenérgico, bloqueando su interacción con las proteínas G. La proteína identificada fue nombrada β -arrestina, por su semejanza con la arrestina visual y por su habilidad de “arrestar” (apagar) al receptor β 2-adrenérgico (Buchanan y DuBois, 2006).

Actualmente se conocen cuatro miembros funcionales de la familia de las arrestinas: la arrestina 1 (arrestina visual) (Yamaki *et al.*, 1988) la arrestina 4 (arrestina de cono)(Craft *et al.*, 1994), que se expresan exclusivamente en la retina, donde regulan la función del fotorreceptor; la arrestina 2 y la arrestina 3 (mejor conocidas como β -arrestina 1 y β -arrestina 2) son ubicuas (Reiter y Lefkowitz, 2006). Estas últimas están predominante expresadas en el cerebro y el bazo (Luttrell y Lefkowitz, 2002)

Desensibilización

En los sistemas biológicos las células están expuestas diariamente a muchas combinaciones de estímulos, lo que hace necesario un mecanismo de control altamente regulado. Los receptores adrenérgicos tienen un mecanismo de regulación llamado desensibilización. La desensibilización involucra una serie de procesos por los cuales los GPCRs presentan una atenuación en su respuesta, que sirve como un mecanismo de control que permite a la célula adaptarse ante los estímulos que recibe. Para su estudio el proceso de desensibilización se ha dividido en la desensibilización homóloga y la heteróloga.

Desensibilización homóloga

La desensibilización homóloga se caracteriza por una disminución de la respuesta del receptor, estimulado durante un tiempo prolongado por el agonista. La desensibilización homóloga es un mecanismo fisiológico de “feedback” (retroalimentación negativa) que evita la estimulación persistente del receptor. Las familias de las GRKs y de las arrestinas juegan un papel fundamental en el proceso de desensibilización del receptor activado por el agonista (Yang y Xia, 2006). Como anteriormente se mencionó, las GRKs fosforilan al receptor en los residuos de serina y treonina del carboxilo terminal y de la tercera asa intracelular lo que aumenta la afinidad del receptor por las arrestinas. El estado fosforilado del receptor por las GRKs en ausencia de las arrestinas es ya un estado desensibilizado (Luttrell y Lefkowitz, 2002). Todos los miembros de las arrestinas se asocian exclusivamente a los receptores activados por el agonista y son fosforilados por los GRKs. Las arrestinas asociadas bloquean la interacción entre receptor y las proteínas G, lo cual es crítico para la desensibilización del receptor.

Internalización

La internalización de los GPCRs, también llamada secuestro o endocitosis, es un proceso más lento que la desensibilización, y ocurre en minutos después de la estimulación por el agonista. Recientemente se ha establecido que la fosforilación del receptor por las GRKs y la interacción con las β -arrestinas facilita el proceso de internalización del receptor promovida por el agonista (Ferguson, 2001). Las β -arrestinas, en comparación con las arrestinas visuales, tienen un papel adicional en la desensibilización de los GPCR; las β -arrestinas actúan como proteínas adaptadoras que permiten la interacción con las proteínas de la maquinaria endocítica: las clatrin, dinaminas, EPS-15, etc (Kirchhausen, 1999). La variación de las GRKs y las β -arrestinas que participan en el proceso de internalización depende significativamente del receptor, del agonista o del tipo celular (Luttrell y Lefkowitz, 2002). Por ejemplo la internalización del receptor de adenosina A1 es bastante lenta ($t_{1/2}=90\text{min}$), comparada con la del receptor de adenosina A3 ($t_{1/2}=19\text{min}$) (Yang y Xia, 2006), mientras que la internalización del receptor β -adrenérgico es muy rápida ($t_{1/2}=2\text{min}$) (Waldo *et al.*, 1983). Las diferencias cinéticas sugieren que la internalización puede ser mediada por múltiples mecanismos de endocitosis y/o que la heterogeneidad entre los subtipos del receptor puede modular su afinidad por los adaptadores endógenos.

La internalización del receptor puede llevar a la degradación lisosomal del receptor o a su reciclaje a la membrana celular. La resensibilización del receptor requiere su desfosforilación y disociación del ligando. También hay evidencias que apoyan la hipótesis de que la internalización es requerida para la resensibilización de muchos GPCRs (Ferguson, 2001). En los estudios realizados al respecto se encontró que después de la estimulación, el receptor β_2 -adrenérgico se encontraba en las vesículas endosomales, enriquecidas de una proteína fosfatasa específica para los GPCRs, PP2A (Pitcher *et al.*, 1995). La desfosforilación del receptor ocurre en las vesículas acidificadas al tratar las células con cloruro de amonio, que neutraliza la acidez de las vesículas endosomales, la asociación del receptor con las fosfatasas se bloquea y se puede evitar la desfosforilación (Krueger *et al.*, 1997).

Dependiendo de la interacción del receptor con las β -arrestinas, los receptores se han agrupado en dos clases: la clase A incluye a los receptores β_2 y α_{1b} adrenérgicos, receptores opioides, receptores de la dopamina D1A y de la endotelina A. Estos receptores se unen a las β -arrestinas 2 con más afinidad que con las β -arrestinas 1 y no interactúan con las arrestinas visuales (Luttrell y Lefkowitz, 2002). La asociación de los receptores de la clase A con las β -arrestinas es transitorio y de reciclaje rápido (Lefkowitz *et al.*, 2006). La clase B está representada por los receptores para la angiotensina AT1a, la neurotensina 1, la vasopresina 2 y la neurokinina NK-1, estos receptores interactúan con β -arrestinas 1 y β -arrestinas 2 con afinidad equivalente y también se asocian con las arrestinas visuales. Los receptores de la clase B forman un complejo estable con las β -arrestinas y su reciclaje es retardado y puede favorecer a la degradación del receptor (Luttrell y Lefkowitz, 2002)(Figura 9).

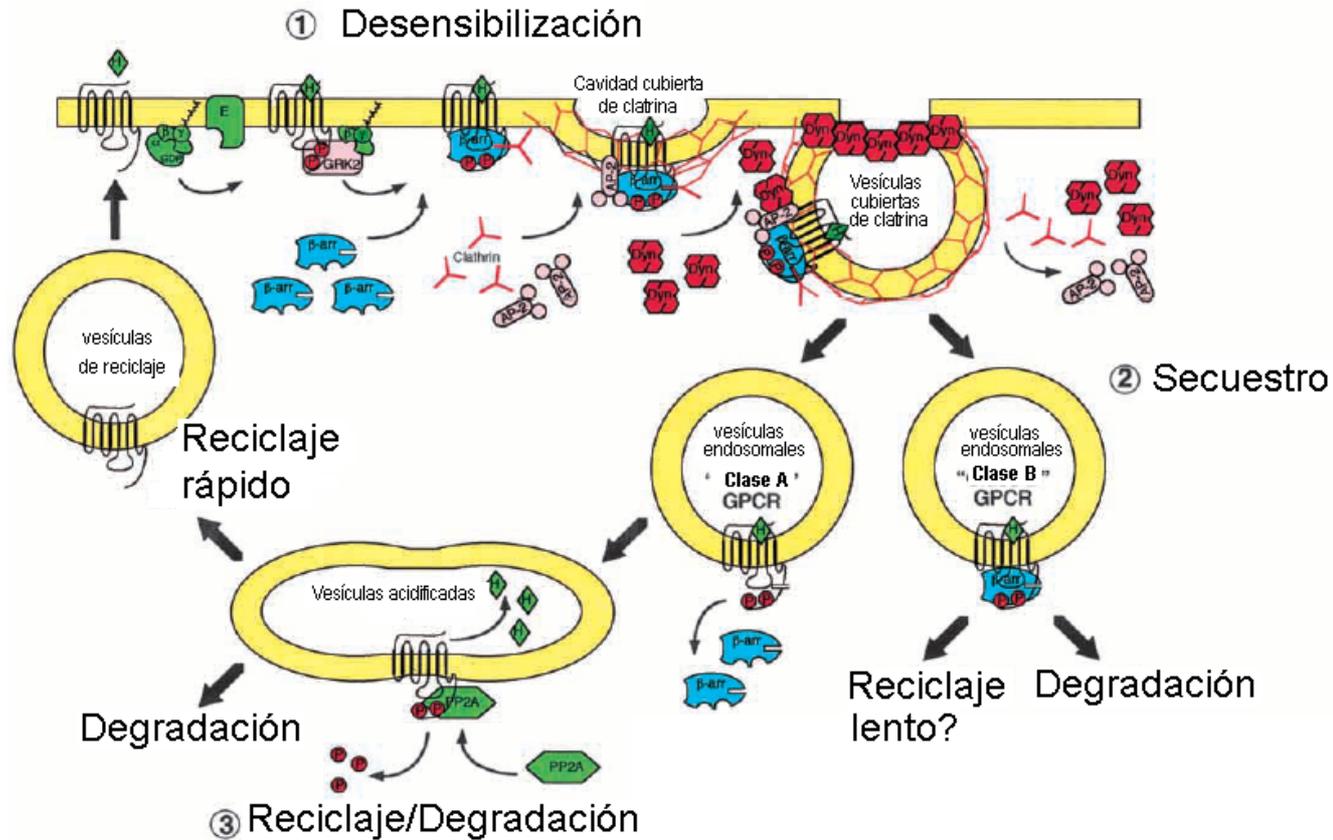


Figura 9. Papel de las β -arrestinas en la desensibilización, secuestro y reciclaje de los GPCRs.

En la desensibilización homóloga, cuando el receptor está ocupado por su agonista (H) (1) las GRKs fosforilan al receptor aumentando su afinidad por las β -arrestinas (β -arr). Las arrestinas asociadas bloquean la interacción entre el receptor y las proteínas G, lo cual es crítico para la desensibilización del receptor. Las β -arrestinas actúan como proteínas adaptadoras que permiten la interacción con las proteínas de la maquinaria endocítica: clatrin, AP2, NSF etc. El secuestro del receptor (2) depende de la interacción con la dinamina (Dyn) y lleva a la formación de la vesícula cubierta de clatrin. Dependiendo de la interacción del receptor con las β -arrestinas los receptores se han agrupado en dos clases: por ejemplo, el receptor de la "clase A" β_2 -adrenérgico, interactúa con las β -arrestinas transitoriamente y su reciclaje es rápido. Los receptores de la "clase A" se van a las vesículas acidificadas, donde se disocian del agonista y se desfosforilan por una proteína fosfatasa específica para los GPCRs (PP2A), lo que permite un reciclaje hacia la membrana plasmática (3). En otro ejemplo el receptor de la "clase B", para la angiotensina AT1a, forma un complejo estable entre el receptor y β -arrestinas, su reciclaje es retardado o el receptor puede ser degradado (Luttrell and Lefkowitz, 2002).

Actualmente se ha incrementado el número de evidencias que sugieren que los subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos tienen diferencias en su habilidad para interactuar con las proteínas específicas. Se han encontrado algunas proteínas que se asocian selectivamente con los receptores α_1 -adrenérgicos, como es el caso de la α -syntrofina y la ezrina. Se ha demostrado que la interacción de la α -syntrofina con el receptor α_{1d} -adrenérgico probablemente permite que el receptor α_{1d} -adrenérgico se acumule en las vesículas intracelulares sin ser degradado, ya que la α -syntrofina puede modificar la estabilidad de algunas proteínas. La ezrina puede interactuar con el receptor α_{1b} -adrenérgico directamente lo que posiblemente facilita el reciclaje del receptor a la membrana (Chen *et al.*, 2006b; Stanasila *et al.*, 2006).

Desensibilización heteróloga

Uno de los fenómenos más complejos en la regulación de los GPCRs es la desensibilización heteróloga. Esta es la capacidad de un receptor estimulado por su agonista para afectar la respuesta de otro receptor diferente. La activación de una cinasa dependiente de segundos mensajeros por cualquier vía, como de la cinasa dependiente de cAMP (PKA) o de la cinasa regulada por calcio y diacilglicerol (PKC), puede inducir la fosforilación en residuos de serina y treonina presentes en el carboxilo terminal y en la tercera asa intracelular de los GPCRs. La fosforilación en estos sitios es suficiente para reducir la interacción entre receptor y las proteínas G, lo cual es crítico para la desensibilización del receptor.

La regulación de receptores por las cinasas dependientes de segundos mensajeros tiene implicaciones importantes en la comunicación cruzada entre los subtipos de los GPCRs o en la comunicación cruzada entre los GPCRs con los receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK).

Los receptores acoplados a proteínas Gq incrementan la hidrólisis de fosfoinosítidos, generando diacilglicerol (DAG) e IP₃. El DAG puede activar a la proteína cinasa C (PKC) induciendo la fosforilación y la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico. En nuestro laboratorio se ha observado que la activación del receptor de la endotelina ET_A, expresado endógenamente en células Rat-1 transfectadas establemente con el receptor α_{1b} -adrenérgico, induce la fosforilación y la desensibilización de este último receptor (Vázquez-Prado *et al.*, 1997). Adicionalmente se ha observado que la bradicinina también puede inducir la desensibilización heteróloga del receptor α_{1b} -adrenérgico (Medina *et al.*, 1998).

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y los receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) representan dos vías importantes para la transducción de señales celulares y están involucradas en múltiples estados fisiológicos y patológicos. Uno de los ejemplos más estudiados de la comunicación cruzada entre GPCRs y RTKs es la regulación del metabolismo de glucosa. En este proceso están involucrados el receptor para la insulina (IR) y el receptor β_2 -adrenérgico. La función anabólica de la insulina consiste en disminuir los niveles de glucosa, aumentando la síntesis de glucógeno (Saltiel y Kahn, 2001). Las catecolaminas, al contrario, estimulan la gluconeogénesis y la lipólisis (Haring *et al.*, 1994). Se ha demostrado que la insulina puede inducir la fosforilación del receptor β_2 -adrenérgico en residuos de tirosina (Karoor *et al.*, 1995).

Se han realizado muchos análisis detallados para identificar los sitios de fosforilación necesarios para llevar a cabo la internalización del receptor β_2 -adrenérgico. En el carboxilo terminal se han encontrado las secuencias responsables que incluyen dominios SH2 (Tyr 350) y los sitios de fosforilación de Akt (Tyr 345 y 346).

La activación del IR provoca la fosforilación del receptor β_2 -adrenérgico en los residuos de Tyr 350 y 364 y en los sitios de fosforilación de Akt (Tyr 345 y 346).

La fosforilación de Tyr 350 crea sitios SH2, atrayendo Src, Grb, dinamina, etc., que participan en la internalización del receptor β_2 -adrenérgico.

La insulina activa a la PI3K y los productos generados por su actividad enzimática activan a la PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinosítidos-3), la que a su vez fosforila a la proteína cinasa B/Akt. La inhibición de la actividad de PI3K con LY294002 (un inhibidor de PI3K) bloquea la desensibilización del receptor β_2 -adrenérgico por la insulina. La doble mutación en los sitios de Akt (tirosina345 y tirosina346 por alanina) anula la capacidad de la insulina de intervenir en la regulación del receptor β_2 -adrenérgico. La dominante negativa de Akt también bloquea la desensibilización del receptor β_2 -adrenérgico por la insulina (Dalle *et al.*, 2002) (Fig.10)

La regulación cruzada entre GPCRs y RTKs puede ser bidireccional. Los estudios pioneros de Ullrich y colaboradores han demostrado que los GPCRs son capaces de transducir señales de proliferación a través de los receptores con actividad de tirosina cinasa (Daub *et al.*, 1996). Hay muchas evidencias que indican que los GPCRs inducen la transactivación de los receptores con actividad de tirosina cinasa, por medio de la capacidad proteolítica de las metaloproteasas de liberar los factores de crecimiento atrapados en matriz extracelular cercana. Se ha observado que la activación de los receptores acoplados a proteínas G induce la transactivación de receptores para EGF a través de la ruptura del HB-EGF (heparin-binding EGF - EGF con afinidad por heparina) por metaloproteasas (Daub *et al.*, 1997).

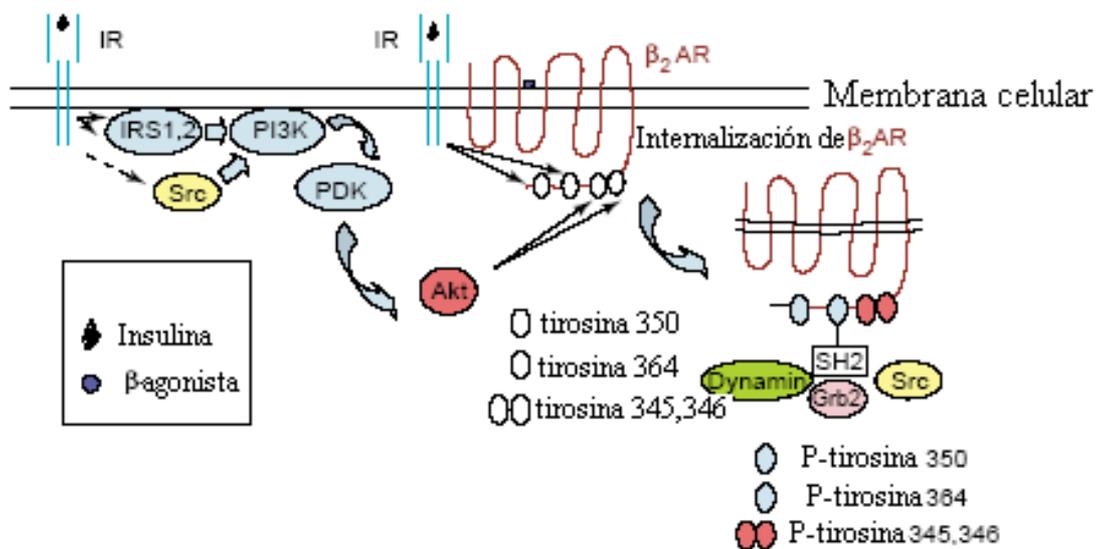


Figura 10. La desensibilización heteróloga del receptor β_2 -adrenérgico por la insulina.

La insulina activa a su receptor y sucesivamente activa a la IRS1, 2, a la PI3K y los productos generados por su actividad enzimática activan PDK (cinasa dependiente de fosfoinosítidos-3), a su vez, la PDK1 fosforila a la proteína cinasa B/Akt. La activación de la proteína cinasa B/Akt provoca la fosforilación de receptor β_2 -adrenérgico en los residuos de Tyr 350 y 364 y en los sitios de fosforilación de Akt (tirosina 345 y tirosina 346). La fosforilación de Tyr 350 crea sitios SH2, que sirven como anclaje para atraer las proteínas Src, Grb y dinamina, que participan en la internalización del receptor β_2 -adrenérgico (Gavi *et al.*, 2006).

II. Antecedentes

Diversos estudios han demostrado diferentes vías de señalización dependiendo de los subtipos expresados en varios órganos y tejidos. En trabajos realizados en nuestro laboratorio se han encontrado diferencias funcionales entre los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.

La fosforilación es un proceso importante para la regulación funcional de los receptores acoplados a proteína G. El estudio de los tres subtipos de receptores β -adrenérgicos ha revelado que la regulación por fosforilación es muy diferente y más compleja entre los receptores de una misma subfamilia. Así, la desensibilización inducida por activación de TPA es muy pronunciada para el β_2 , mucho menor para el β_1 y no afecta la actividad del β_3 (Nantel *et al.*, 1993). Se ha demostrado que los subtipos de receptores tienen diferente sensibilidad a la activación farmacológica de la PKC por TPA. Las células transfectadas con algún subtipo de los receptores adrenérgicos y a la vez preincubadas con TPA responden de manera diferente al estímulo con noradrenalina en la liberación de calcio intracelular y en la producción de IP₃. El análisis de la estructura primaria de estos receptores indica que posiblemente existen diferencias en el grado de fosforilación entre los tres subtipos, pues el receptor α_{1a} que es poco sensible a TPA posee sólo tres sitios de fosforilación, el α_{1b} que es medianamente sensible presenta cuatro sitios y el subtipo α_{1d} que es el más sensible a TPA posee seis sitios de fosforilación potencial por la PKC (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

Otros experimentos enfocados a entender modulación de las vías de MAP cinasas por diferentes subtipos han revelado que en las células PC12 el subtipo α_{1a} estimula la activación de ERK, JNK y p38; el subtipo α_{1b} activa ERK y p38 y el subtipo α_{1d} activa solamente ERK (Zhong y Minneman, 1999). Ha sido reportado que el nivel basal de ERK era más elevado en las células expresando el receptor α_{1d} – adrenérgico, a lo que se debe la actividad constitutiva del receptor.

Todas estas diferencias funcionales entre los subtipos ponen de manifiesto la necesidad de estudiar cada subtipo de receptores de manera particular. Parece que la fosforilación es uno de los mecanismos a través de los cuales se realiza la regulación de la función de los receptores α_1 -adrenérgicos (García-Sáinz *et al.*, 2000). El subtipo más estudiado en nuestro laboratorio es el α_{1b} -adrenérgico. El estado fosforilado de este receptor modula la sensibilidad del receptor por sus ligandos y como consecuencia modifica sus respuestas fisiológicas. Se considera que la fosforilación es un paso inicial en el proceso de desensibilización. Las cinasas dependientes de los segundos mensajeros (PKCs) promueven la fosforilación e inducen hacia la desensibilización heteróloga. En nuestro laboratorio se ha demostrado que se presenta la fosforilación y la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico, inducidas por otros receptores acoplados a proteínas G, como es el caso de los receptores de la bradicinina (B2) (Medina *et al.*, 1998), del receptor de la endotelina (ET_A) (Vázquez-Prado *et al.*, 1997), y del ácido lisofosfatídico (LPA) (Casas-González *et al.*, 2000). Además hay evidencia de que la fosforilación y la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico puede ser inducida por receptores con actividad de serina/treonina cinasa, como el receptor del

factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Romero-Ávila *et al.*, 2002). Lo mismo ocurre con receptores con actividad de cinasa de tirosina, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), de la insulina (García-Sáinz *et al.*, 2004b), el del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el del factor de crecimiento-I similar a insulina (IGF-I) (Molina-Muñoz *et al.*, 2006). También en nuestro laboratorio se ha demostrado que los receptores α_{1d} adrenérgicos de rata y de humano son sujetos de regulación por fosforilación (García-Sáinz *et al.*, 2004a; García-Sáinz *et al.*, 2001). El receptor α_{1d} adrenérgico está fosforilado en el estado basal y en presencia de los agonistas o TPA esta fosforilación se aumenta (García-Sáinz *et al.*, 2004a; García-Sáinz *et al.*, 2001). Igualmente se ha observado que el receptor α_{1d} de rata se fosforila en respuesta a la estimulación por agonistas no adrenérgicos como endotelina, ácido lisofosfatídico y bradicinina, lo que sugiere que el receptor sufre la desensibilización heteróloga a través de fosforilación. La fosforilación de los receptores α_1 adrenérgico y sus implicaciones se han estudiado en nuestro laboratorio, pero la parte funcional de la desensibilización heteróloga del subtipo α_{1d} adrenérgico por el receptor con actividad de cinasa de tirosina como el del factor de crecimiento-I similar a insulina (IGF-I) todavía no se ha estudiado en detalle. En esto reside la importancia del presente trabajo, pues se encontraron algunos nuevos elementos que permiten una visión más completa para entender los procesos de desensibilización heteróloga en la regulación de la función de los subtipos α_1 adrenérgicos.

III. Hipótesis

El receptor α_{1d} – adrenérgico se fosforila y se desensibiliza en forma heteróloga a través de la activación de receptores de IGF-I.

IV. Objetivos

General

Ampliar los conocimientos acerca del proceso de desensibilización de los receptores α_{1d} -adrenérgicos enfocándose principalmente en la desensibilización heteróloga por IGF-I.

Particulares

- 1) Estudiar si se presenta el proceso de desensibilización del receptor α_{1d} – adrenérgico inducido por IGF-I, midiendo como respuesta fisiológica la movilización de Ca^{2+} intracelular.
- 2) Estudiar la participación de proteínas cinasas involucradas en el proceso de fosforilación inducido por IGF-I usando los inhibidores de la PKC y de la PI3K.
- 3) Estudiar si la fosforilación del receptor α_{1d} – adrenérgico por IGF-I está relacionada con la desensibilización.

V. Planteamiento experimental

El interés fundamental de este trabajo es explorar el proceso de desensibilización heteróloga del receptor α_{1d} – adrenérgico por el IGF-I y estudiar la relación entre la función del receptor y su fosforilación.

De manera general la estrategia planteada fue la siguiente:

1.-Estudiar si el receptor α_{1d} – adrenérgico se desensibiliza de manera heteróloga por el IGF-I.

Para demostrar que el receptor se desensibiliza de manera heteróloga se estudió el efecto de la preincubación de células que expresan el receptor α_{1d} – adrenérgico con IGF-I sobre la liberación de calcio intracelular inducido por noradrenalina.

2.-Estudiar el proceso de fosforilación del receptor α_{1d} – adrenérgico.

Con el fin de saber si el proceso de desensibilización del receptor α_{1d} – adrenérgico involucra la fosforilación del receptor, caracterizamos la fosforilación dosis-dependiente y su curso temporal inducidos por IGF-I.

3.- Estudiar las proteínas cinasas involucradas en el proceso de fosforilación inducido por la estimulación del receptor α_{1d} – adrenérgico por el IGF-I.

Para estudiar las proteínas cinasas participantes, observamos el efecto de inhibidores específicos de la PKC y de la PI3K sobre la fosforilación del receptor.

VI. Materiales y métodos

Materiales y reactivos

Los fármacos (-)- noradrenalina, TPA, ácido lisofosfatídico, estaurosporina, wortmanina, e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma- Aldrich. De Calbiochem fueron el LY294002 y el RO318220. El medio de cultivo DMEM, el suero fetal bovino, la tripsina, los antibióticos y otros reactivos usados en el cultivo celular fueron de Invitrogen Life Technologies. Los compuestos radiomarcados [³²P]Pi (8500-9120 ci/mmol) y myo-[2,3-³H] inositol fueron de PerkinElmer Life Sciences. La proteína A acoplada a sefarsa fue de Upsdate Biotechnology. El Fura -2/AM se obtuvo de Molecular Probes.

Línea celular y cultivo

Se utilizaron fibroblastos de rata de la línea celular Rat -1 transfectados con el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata, los cuales expresan de manera estable al receptor; estas células fueron donadas por los doctores R.J.Levkowitz, M.G. Caron, y L. Allen de Duke University.

Se utilizaron fibroblastos de rata de la línea celular Rat -1 transfectados con el receptor α_{1d} -adrenérgico humano truncado en el extremo amino, los primeros 79 aminoácidos, (Minneman, 2003), los cuales expresan de manera estable al receptor; la construcción de estas células fue hecha por la doctora Guadalupe Reyes del CINVESTAV y la línea estable fue obtenida por Ekaterina Rodríguez-Pérez del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta glucosa y glutamina adicionado con 10% de suero fetal bovino, 300 μ g/ml del análogo de neomicina G-418 sulfato, 100 μ g/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. En los experimentos las células se ayunaron en medio sin suero 12 horas antes del experimento.

Metodología de la determinación de Ca²⁺

Las células en confluencia se incubaron toda la noche con medio DMEM sin suero ni antibióticos. Al día siguiente las células fueron cargadas con el fluoróforo FURA 2AM (4 μ M) en una solución de 4 ml de medio Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20mM, CaCl₂ 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4) con 0.05% de albúmina de suero bovino a pH 7.4 durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Después de la incubación se lavaron tres veces con solución fisiológica amortiguadora para eliminar la albúmina y el FURA 2AM externo, las células fueron

despedadas de la caja con 0.5 ml de tripsina al 0.3% durante 1 minuto, pasado este tiempo fueron resuspendidas en medio Krebs-Hepes- Glucosa-BSA con CaCl_2 y trasladadas a tubos cónicos de 15 ml para realizar 3 lavados, éstos consistieron en centrifugar 3 min a 3000 rpm, en donde se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió muy suave en 10 ml de Krebs-Hepes-Glucosa. En el último lavado las células fueron resuspendidas en el mismo medio.

La movilización de calcio intracelular se observó a través de la estimulación con noradrenalina en diferentes concentraciones, mediante cambios en la fluorescencia manteniendo a las células en agitación constante utilizando un espectrofotómetro – fluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, el cual registra la fluorescencia de excitación a 340 nm y a una emisión de 510 nm del fluoróforo.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se cuantificó utilizando un programa de cómputo incluido en el espectrofluorómetro a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] [Sf_2 / Sb_2]$, donde la K_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} ; R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{\min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar el quelante de Ca^{2+} , EGTA (5 mM) y R_{\max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Triton-X-100 al 1%. Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre (Sf_2) y el unido al calcio (Sb_2) en la longitud de onda 2.

Fosforilación de los receptores

Se realizó en células Rat-1 que expresan por transfección estable a los receptores α_{1d} -adrenérgicos. Los experimentos de fosforilación se realizaron con cultivos confluentes en pozos de 35 mm. Las células se mantuvieron en medio DMEM libre de fosfatos por 1 hora y después se incubaron con 1 ml por pozo de este mismo medio conteniendo 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, durante 3 horas a 37 °C.

Las células marcadas metabólicamente se estimularon con noradrenalina y/o IGF-I. Posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS) fría y se resuspendieron en 500 μl de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 500 mM; NaCl 1M; tritón 1%; NaF 50 mM; Na_3VO_4 100 μM ; β -glicerofosfato 10 mM; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM; p-Serina 1 mM; p-Tirosina 1 mM; 1 mM p-Treonina 1 mM; EDTA 500 mM; leupeptina 20 $\mu\text{g/ml}$; fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 $\mu\text{g/ml}$ y de inhibidor de tripsina de soya 50 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 final) dejándose por una hora sobre hielo. Los extractos se colectaron y centrifugaron a 10,000 x g por 15 minutos. Los sobrenadantes de las muestras se transfirieron a tubos nuevos, que contenían 5 μl del antisuero generado contra los receptores α_{1d} adrenérgicos, se les adicionaron además 25 μl de proteína A-sefarosa.

Se incubaron toda la noche a 4°C; posteriormente se centrifugaron las muestras, las esferas de sefarosa se lavaron tres veces por resuspensión-centrifugación, con solución amortiguadora de: Hepes 50 mM, NaHPO_4 50 mM, NaCl 100 mM, NaF 10 mM, Tritón 1%, SDS 0.1% a pH 7.2 (solución de lavado). A las esferas lavadas se les agregó solución de Laemmli y SDS (10% de SDS con 8% de urea) y fueron sometidas a ebullición durante cinco minutos.

Se centrifugaron, y los sobrenadantes de las muestras fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones reductoras. Los geles una vez secados, fueron expuestos sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics con el software ImageQuant, para la cuantificación de la fosforilación.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados y graficados utilizando el software Prisma 4 para Windows y se presentan como promedios \pm SEM. A los datos se les aplicó un análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba para comparación múltiple Newman-Keuls.

VII. Resultados

Nuestro principal interés fue estudiar la regulación funcional del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I. El receptor α_{1d} -adrenérgico se expresa de manera funcional en arterias como la aorta, iliaca, carótida, mesentérica, femoral y renal (Garcia-Sainz et al., 1999). Se ha sugerido que este subtipo de receptores es el más importante en la regulación del tono vascular periférico y que está relacionado con padecimientos vasculares como la hipertensión. Monitoreando las evidencias de los últimos diez años se ha revelado el papel crítico de IGF-I en el desarrollo y progresión del cáncer. El estudio de la modulación funcional del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I es de gran interés fisiológico y tiene perspectivas terapéuticas.

El primer aspecto del presente trabajo fue estudiar la señalización y la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico de rata. La activación del receptor α_{1d} -adrenérgico induce la generación de segundos mensajeros y se monitoreó uno de ellos, la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).

Durante el estudio de la señalización y desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico, se observó que la estimulación con 10 μ M de noradrenalina (NA) inducía el incremento rápido y transitorio hasta 400-450 nM de la concentración de calcio intracelular en estas células (Figura 11A). El receptor para IGF-I no se acopla a la vía de señalización del sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, por esta razón al estimular las células con IGF-I no se observa ningún cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 11B). Lo que llamó nuestra atención fue que la preincubación de estas células con 100 ng/ml de IGF-I durante 15 minutos disminuyó significativamente la respuesta a noradrenalina (Figura 11C y D). Estos datos sugieren que el receptor α_{1d} -adrenérgico sufre desensibilización independiente del agonista, es decir, desensibilización heteróloga.

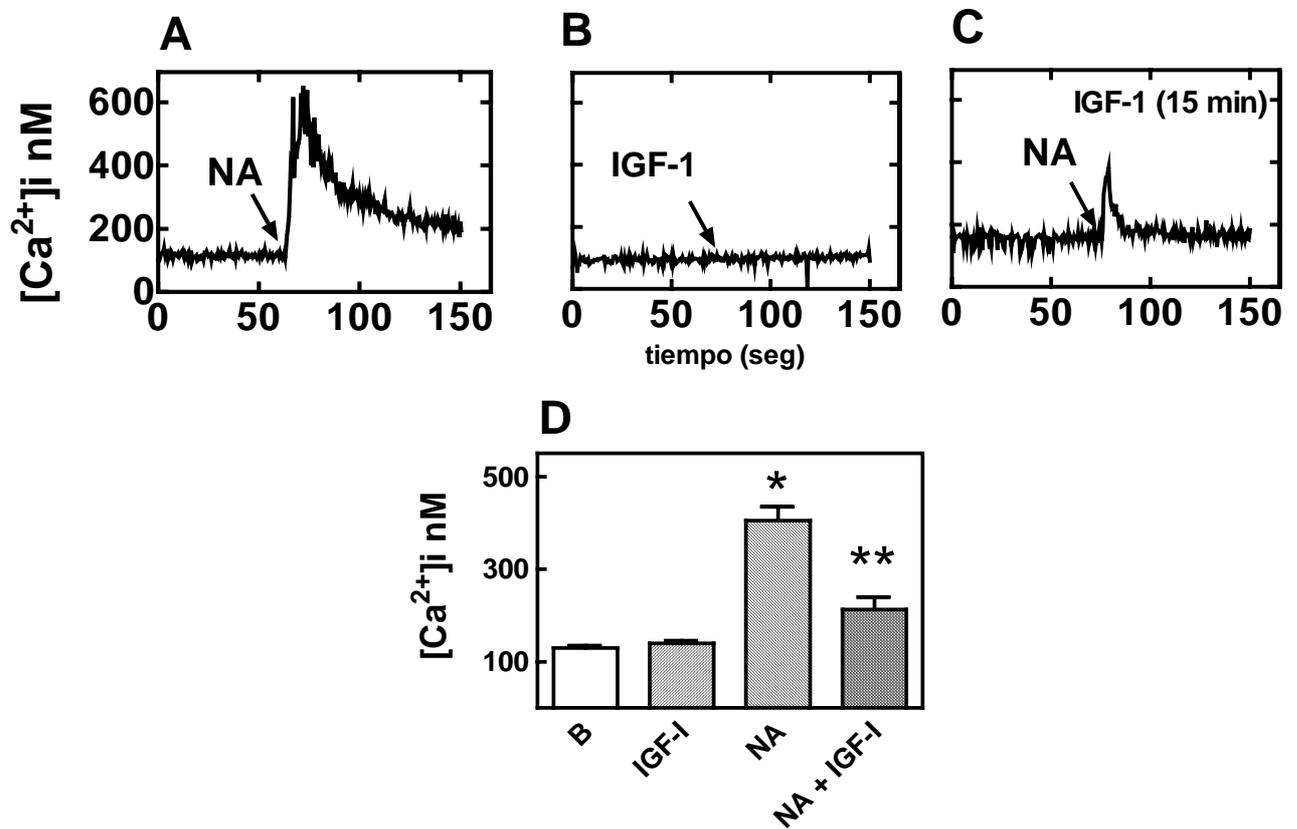


Figura 11. Señalización y desensibilización de los receptores α_{1d} -adrenérgicos de rata en las células Rat-1.

A. Trazo representativo de la movilización de calcio intracelular inducida por 10 μ M de NA; B. Células estimuladas con 100 ng/ml de IGF-I; C. Células preincubadas con 100 ng/ml de IGF-I y estimuladas posteriormente con 10 μ M de NA; D. Células incubadas en ausencia de algún agente (basal), en presencia de 100 ng/ml de IGF-I, 10 μ M de NA, o células pretratadas con 100 ng/ml de IGF-I y estimuladas posteriormente con 10 μ M de NA (IGF-I+NA). * $P < 0.001$ vs. todos los demás grupos, ** $P < 0.05$ vs. su basal (B) o IGF-I solo y $P < 0.001$ vs. NA solo. Las gráficas se elaboraron considerando los datos de 5 a 6 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

Con base en lo observado en la figura 11, caracterizamos la respuesta inducida por diversas concentraciones de noradrenalina en la concentración de calcio intracelular en las células, así como el efecto de IGF-I sobre esa respuesta. En las células Rat-1, transfectadas con el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata, la NA incrementa inmediatamente la concentración de calcio intracelular en forma dosis-dependiente con una EC_{50} de 48 nM. Cuando las células se preincubaban 15 minutos con 100ng/ml de IGF-I y posteriormente se estimulan con diversas concentraciones de NA, el efecto sobre la movilización de calcio intracelular se reduce en forma importante sin modificar en forma clara la EC_{50} (28 nM) para NA (Figura 12A). Después probamos diferentes períodos de incubación con 100ng/ml de IGF-I para observar el proceso de desensibilización en el transcurso del tiempo. Como podemos ver en la Figura 12B, el efecto de desensibilización es bastante rápido, pues a los cinco minutos ya se nota una disminución de la concentración de calcio intracelular, y este efecto llega a su punto máximo a los 15 minutos, manteniéndose posteriormente.

El siguiente paso fue estudiar el proceso de fosforilación del receptor. Como podemos observar, el receptor se encuentra fosforilado en el estado basal, y esta fosforilación se incrementa de 2 a 3 veces por la acción de su agonista y por la activación farmacológica de la proteína cinasa C (PKC) por TPA, lo que no fue sorprendente considerando los trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Garcia-Sainz et al., 2001) (Figura 12 C, parte superior). Con el fin de saber si el proceso de desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I, que habíamos observado en los experimentos previos, involucra la fosforilación del receptor, verificamos si se presenta la fosforilación inducida por IGF-I. Así, se pudo observar que IGF-I induce la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico, hasta un nivel cercano al inducido por la noradrenalina (Figura 12 C, parte inferior).

El receptor α_{1d} -adrenérgico es muy difícil de estudiar, dado que la mayor parte de este receptor se encuentra en vesículas intracelulares y la densidad del receptor en la membrana es muy pequeña, lo que dificulta su inmunoprecipitación y marcaje. Por esa razón empezamos a trabajar con fibroblastos de rata de la línea celular Rat -1 transfectados con el receptor α_{1d} -adrenérgico humano truncado en el extremo amino, en los primeros 79 aminoácidos (Pupo *et al.*, 2003). Como ya explicamos anteriormente, el extremo amino del receptor α_{1d} -adrenérgico evita la localización del receptor en la membrana plasmática, y al eliminar 79 aminoácidos del extremo amino aumenta la densidad del receptor en la membrana y facilita su inmunoprecipitación y detección.

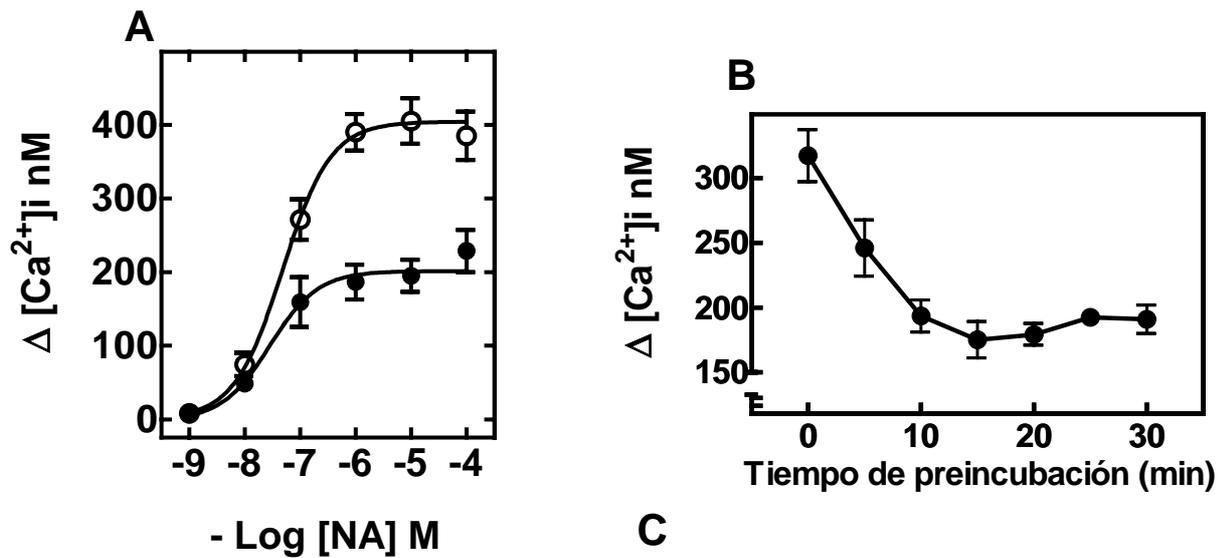


Figura 12. Dosis-respuesta, curso temporal de la movilización de calcio intracelular y fosforilación del receptor α_{1D} -adrenérgico de rata.

A. Curva dosis-respuesta de la movilización de calcio intracelular inducida por 10 μ M de NA, en ausencia (\circ) y en presencia (\bullet) de 100 ng/ml de IGF-I en las células Rat-1; B. Curso temporal de la movilización de calcio intracelular inducida por 10 μ M de NA en presencia de 100 ng/ml de IGF-I a diferentes tiempos de incubación; C, Parte superior. Las células Rat-1 se marcaron metabólicamente con [32 P]Pi, no se estimularon (B) o estimularon durante 5 minutos con 10 μ M de NA, o 1 μ M de TPA. C, Parte inferior. Las células Rat-1 se marcaron metabólicamente con [32 P]Pi, no se estimularon (B) o estimularon durante 5 minutos con 10 μ M de NA, y durante 15 minutos con 100 ng/ml de IGF-I. El receptor α_{1D} -adrenérgico se inmunoprecipitó usando un anticuerpo policlonal, generado en nuestro laboratorio (García-Sáinz *et al.*, 2001).

Como un paso previo en el proceso de estudio del comportamiento del receptor α_{1d} -adrenérgico humano truncado en el extremo amino caracterizamos la señalización y la desensibilización de este receptor.

Durante el estudio de la funcionalidad del receptor, observamos que la estimulación con $10\mu\text{M}$ de NA inducía un incremento rápido (hasta $400\text{-}450\text{ nM}$) de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células (Figura 13A). Al estimular células con 100ng/ml de IGF-I, se observó un cambio muy discreto, no significativo, en la movilización de calcio intracelular (Figura 13B). El efecto de desensibilización se observó claramente al preincubar las células durante 15 minutos con 100ng/ml de IGF-I; la respuesta inducida por NA en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se disminuyó marcadamente (Figura 13C). La noradrenalina, sola y en presencia de 100ng/ml de IGF-I durante 15 minutos, tuvo un comportamiento dosis-dependiente con valores de EC_{50} de $55 \pm 7\text{ nM}$ y de $166 \pm 6\text{ nM}$, respectivamente (Figura 13D).

Para estudiar las cinasas posiblemente responsables de la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I en la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizamos los inhibidores de la PKC: la estaurosporina (ST) y la bisindolil maleimida-I (BIM), y los inhibidores de la PI3K: la wortmanina (WT) y el LY294002 (LY). Usando esta estrategia observamos que el efecto del IGF-I se revertía, lo cual sugería la participación de ambas, PKC y PI3K, en la regulación de la señalización del receptor α_{1d} -adrenérgico (Figura 13E). Los antagonistas por sí mismos no afectan la fosforilación basal del receptor en forma significativa.

Con el fin de saber si el proceso de desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por el IGF-I involucra la fosforilación del receptor, caracterizamos este proceso. Los resultados mostraron que el receptor α_{1d} -adrenérgico se encuentra fosforilado en su estado basal y su grado de fosforilación se incrementa en células tratadas durante 15 minutos con 100ng/ml de IGF-I; las células estimuladas durante 5 minutos con NA o TPA sirvieron de control, pues existe evidencia de que los dos inducen la fosforilación (Figura 14A). Parece que uno de los eventos que ocurren durante la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico es la fosforilación. Sin embargo, existen algunos receptores que son fosforilados sin que esté presente o sea muy pequeña la desensibilización, como ocurre en el caso del receptor α_{1a} -adrenérgico (Vazquez-Prado et al., 2000). La fosforilación del receptor muestra un comportamiento dosis-dependiente, con una EC_{50} aparente de $\approx 3\text{ ng/ml}$, y alcanza una respuesta máxima a una concentración de 30 ng/ml de IGF-I (Figura 14C). El efecto de fosforilación observado fue muy rápido y transitorio, pues la fosforilación alcanzó su máximo grado de los 5 a los 15 minutos ($190\text{-}200\%$ del basal), y después disminuyó lentamente, manteniéndose desde los 30 hasta los 60 minutos en los valores alrededor de 160% del basal (Figura 14B).

Al realizar los experimentos de fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico en presencia de los inhibidores de la PKC, la estaurosporina (ST) y la bisindolil maleimida-I (BIM), y los inhibidores de la PI3K, la wortmanina (WT) y el LY294002 (LY), observamos que el uso de los inhibidores evita la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I (Figura 14D). Estos resultados demuestran que la activación de PKC y PI3K por IGF-I participan tanto en la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico como en su fosforilación y que ambos eventos están correlacionados.

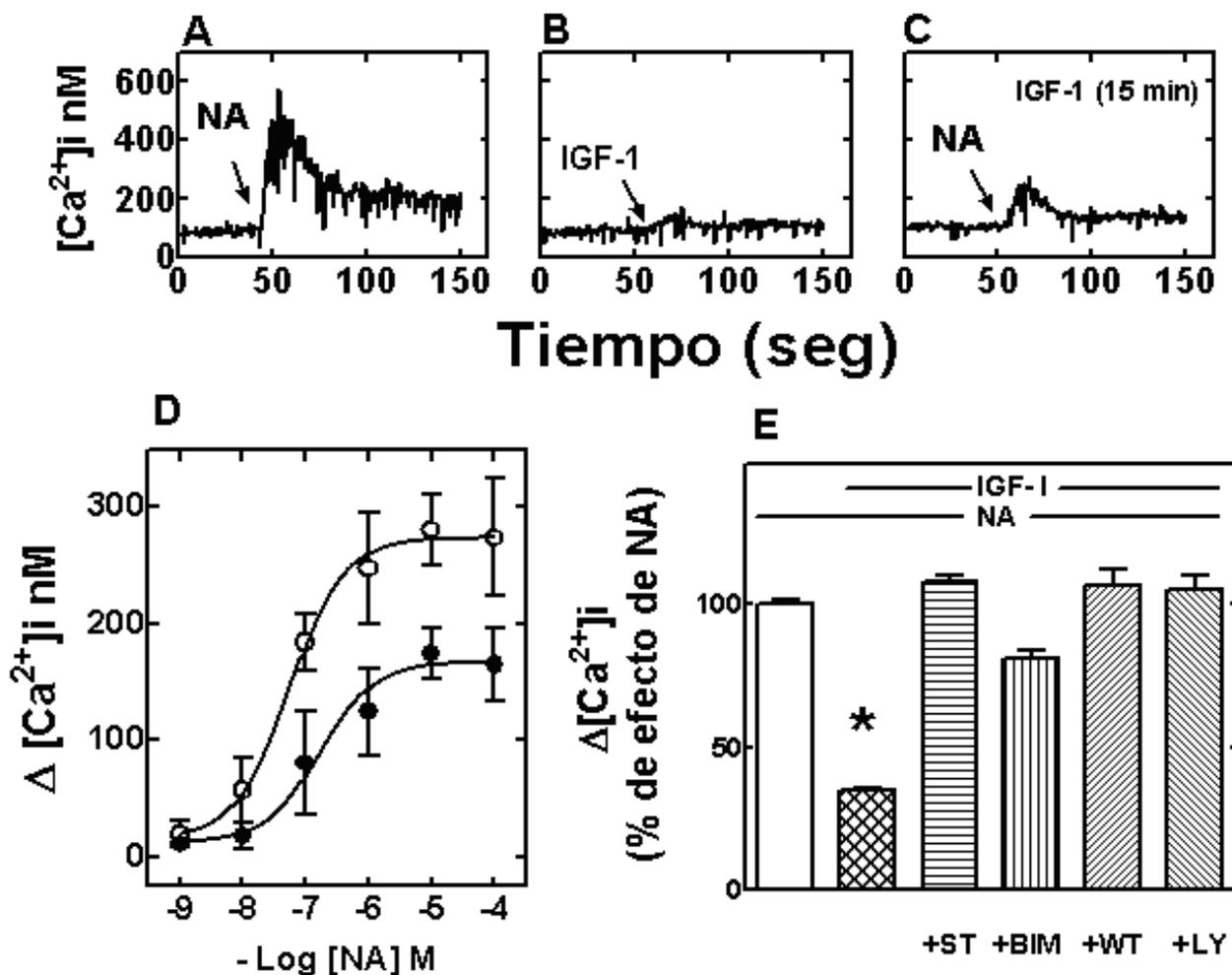


Figura 13. Señalización y desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico de humano truncado en el extremo amino.

A Trazo representativo de la movilización de calcio intracelular inducida por 10 μ M de NA; B Trazo representativo de la movilización de calcio intracelular de células estimuladas con 100 ng/ml de IGF-I. C Células preincubadas durante 15 minutos con 100 ng/ml de IGF-I y estimuladas posteriormente con 10 μ M de NA; D Curva dosis-respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por 10 μ M de NA, sólo (\circ) y en presencia (\bullet) de 100 ng/ml de IGF-I durante 15 minutos. E Incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por 10 μ M de NA o incubadas por 15 minutos con 1 μ M de estaurosporina (+ST), 1 μ M de bisindolil maleimida-I por (BIM), 100 nM de wortmanina (+WT), o 1 μ M de LY294002 (LY) y preincubados posteriormente con 100 ng/ml de IGF-I también durante 15 minutos. * $P < 0.001$ vs. todos los demás grupos. Las gráficas se elaboraron considerando los datos de 6 a 7 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

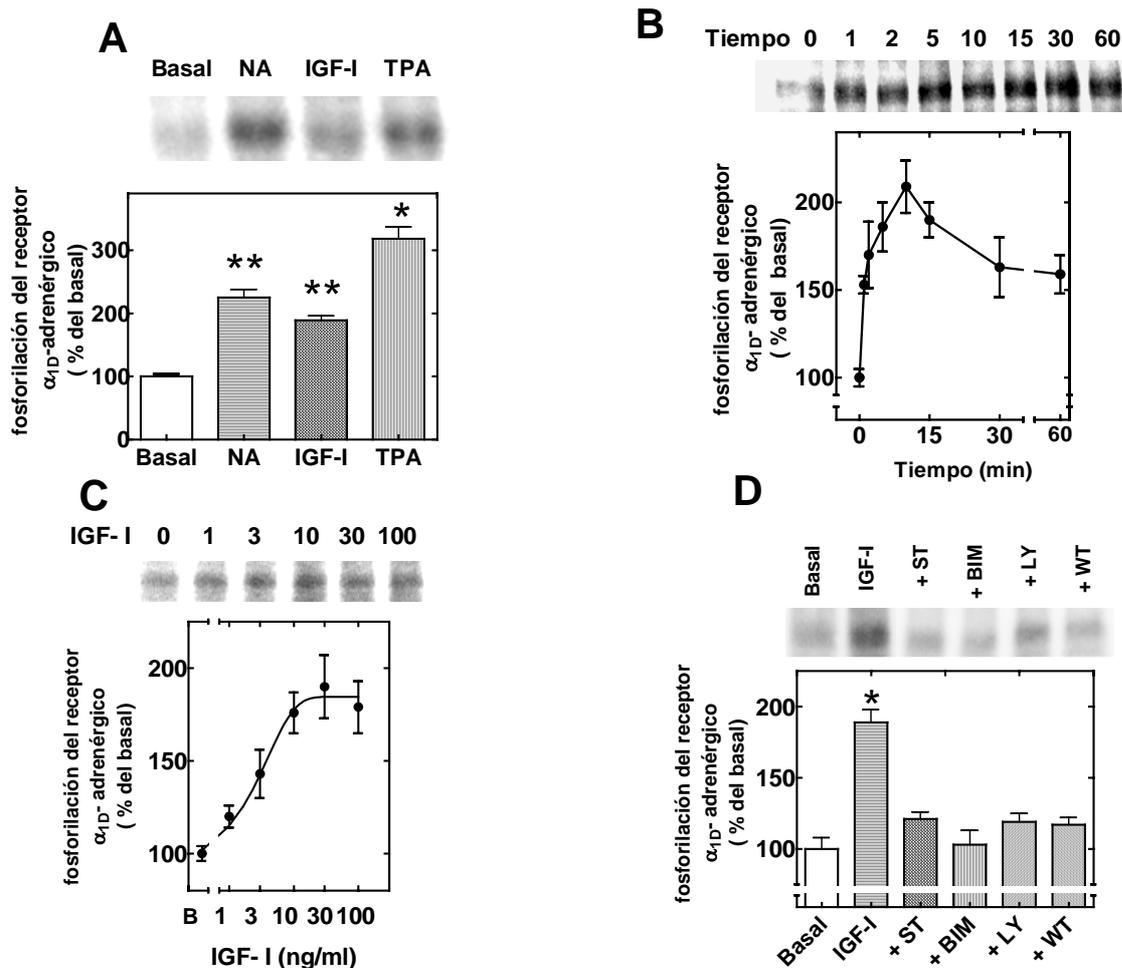


Figura 14. Fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico.

A Las células Rat-1 se marcaron metabólicamente con [32 P]Pi, no se estimularon (Basal) o estimularon durante 5 minutos con 10 μ M de NA o con 1 μ M de TPA y durante 15 minutos con 100 ng/ml de IGF-I. En la parte superior de la gráfica, se presenta una autorradiografía representativa. En la parte inferior se presenta la gráfica de la densitometría. Los resultados están expresados como porcentaje de la fosforilación basal del receptor α_{1d} -adrenérgico. * $P < 0.001$ vs. Basal, ** $P < 0.01$ vs. Basal. Las gráficas se elaboraron considerando los datos de 4 a 8 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células. B Curso temporal del efecto de IGF-I en la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico. C Curva dosis-respuesta del efecto de IGF-I en la fosforilación del receptor. En cada caso se presenta una autorradiografía representativa y las gráficas corresponden a los promedios de la densitometría de 4 a 12 experimentos independientes. D Fosforilación del receptor en células preincubadas durante 15 minutos con y sin 1 μ M de estaurosporina (+ST), 1 μ M de bisindolil maleimida I (+BIM), 100 nM de wortmanina (+WT), o 1 μ M de LY294002 (+LY) y después estimuladas durante 15 minutos con 100 ng/ml de IGF-I. En la parte superior de D, se presenta una autorradiografía representativa. En la inferior se presenta la gráfica de la densitometría. Los resultados están expresados como porcentaje de la fosforilación basal del receptor α_{1d} -adrenérgico. * $P < 0.001$ vs. todos los demás grupos. Las gráficas se elaboraron considerando los datos de 5 a 7 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

VIII. Discusión y conclusiones

El conocimiento de la regulación del receptor α_{1d} -adrenérgico es muy importante por su participación en procesos fisiológicos y patológicos.

La distribución de los RNAs mensajeros de los diferentes subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos ha demostrado que en varios tejidos dichos receptores presentan coexpresión, aunque uno de los subtipos es usualmente predominante. La transducción de señales es el idioma a través del cual las células “perciben”, “escuchan” y “sienten” los cambios que se producen en el medio extracelular y “responden” a ellos. Las respuestas a diferentes estímulos pueden variar dependiendo de los subtipos, sus sensibilidades de “percibir” al mensajero y “responder” a ellos a través de diferentes vías de señalización. Esto sin duda deja ver con claridad la necesidad de estudiar cada subtipo de receptores de manera particular.

En este estudio nuestro principal interés fue estudiar la regulación funcional del receptor α_{1d} -adrenérgico por el IGF-I. En este trabajo, hemos demostrado que IGF-I es capaz de inducir la fosforilación y la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico en forma rápida y con concentraciones relativamente bajas. La EC_{50} obtenida de los experimentos de dosis respuesta a noradrenalina, sola y en presencia de 100 ng/ml de IGF-I durante 15 minutos sobre la movilización de calcio intracelular del receptor α_{1d} -adrenérgico, muestra pequeñas diferencias en la sensibilidad del receptor al agonista. Sin embargo, lo más dramático es el cambio en la respuesta máxima que induce la noradrenalina en la concentración de calcio intracelular.

En las células Rat-1, transfectadas con el receptor α_{1d} -adrenérgico de rata, la NA incrementa inmediatamente la concentración de calcio intracelular en forma dosis-dependiente con una EC_{50} de 48 nM. En las células Rat-1, transfectadas con el receptor α_{1d} -adrenérgico de humano, truncado en el extremo amino, la estimulación con 10 μ M de noradrenalina provocó el incremento rápido hasta 400-450 nM y este efecto tuvo un comportamiento dosis dependiente con una EC_{50} de 55 nM, que es similar a la observada para el receptor de rata. En el caso del receptor α_{1d} -adrenérgico completo de humano, la EC_{50} es de 150 nM y el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es sólo de 80 nM (García-Sáinz *et al.*, 2004a), lo que demuestra que es menos sensible y menos eficaz a su agonista; probablemente estas diferencias se deben a que la mayor parte de este receptor se encuentra en las vesículas intracelulares y su densidad en la membrana es muy pequeña. Cuando las células se preincubaban por 15 minutos con 100 ng/ml de IGF-1 y posteriormente se estimulan con 10 μ M de NA, el efecto de la movilización de calcio intracelular se reduce en forma dependiente de la dosis, con una EC_{50} de 28 nM en el caso del receptor de rata y de 166 nM en el caso de humano. El receptor α_{1d} -adrenérgico de rata es más sensible a la desensibilización heteróloga inducida por IGF-I, probablemente debido a diferencias en sus secuencias de los aminoácidos.

En las células Rat-1, transfectadas con el receptor α_{1d} -adrenérgico truncado de humano, el IGF-I induce claramente la fosforilación del receptor hasta $\approx 200\%$ del basal y muestra un comportamiento dosis-dependiente con una EC_{50} de 3 ng/ml. En las células Rat-1 y DDT₁-FM2, transfectadas con el subtipo de α_{1b} -adrenérgico, IGF-I

induce un incremento en la fosforilación dos veces mayor ($\approx 400\%$ del basal); esta fosforilación crece en forma dosis- dependiente con una EC_{50} de 13 ng/ml (Molina-Muñoz *et al.*, 2006). La acción de IGF-I demuestra similitudes y diferencias, dependiendo del subtipo de los receptores α_1 -adrenérgicos y del contexto celular, lo que puede jugar un papel importante en la definición de las consecuencias funcionales de las acciones hormonales. Muchos otros factores pueden influir en las diferencias funcionales, entre ellos: la densidad relativa de los receptores en comparación con sus hormonas, la especificidad de los sustratos y su disponibilidad, así como las preferencias por acoplarse con ciertas subfamilias de proteínas G y su disponibilidad.

Para los receptores α_1 -adrenérgicos se han encontrado diferencias en la sensibilidad de cada subtipo cuando se experimenta desensibilización homóloga inducida por noradrenalina o desensibilización heteróloga por activación de la PKC por TPA. Así, el orden de sensibilidad $\alpha_{1d} \gg \alpha_{1b} > \alpha_{1a}$, se correlaciona con el número de sitios potenciales de fosforilación por PKC (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996). Si esta sensibilidad a la desensibilización dependiera del grado de fosforilación del receptor, debería de reflejarse en la EC_{50} obtenida de los experimentos de dosis-respuesta, en donde se determina la relación entre la concentración de IGF-I y la fosforilación del receptor.

En el caso del receptor α_{1d} -adrenérgico, el nivel de fosforilación se mantiene desde los 30 hasta los 60 minutos en valores cercanos a 160% del basal, en comparación con el receptor α_{1b} - adrenérgico, donde el nivel de fosforilación disminuye lentamente. Este mantenimiento del estado fosforilado del receptor α_{1d} -adrenérgico inducido por IGF-I pudiera ser importante para los tejidos vasculares, ya que se ha sugerido que este subtipo de receptores es el más importante en la regulación del tono vascular periférico (Tanoue *et al.*, 2003).

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el receptor α_{1d} -adrenérgico tiene una elevada actividad constitutiva, y que varios ligandos se comportan como agonistas inversos, disminuyendo la actividad basal del receptor en la generación de segundos mensajeros (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999). El estudio de la localización subcelular del receptor en el microscopio confocal ha demostrado que la mayor parte del receptor se encuentra internalizado en condiciones basales, pero que la incubación de estas células con un antagonista induce una relocalización del receptor hacia la membrana plasmática (McCune *et al.*, 2000). Estas observaciones sugieren que la localización subcelular del receptor puede ser resultado de la actividad intrínseca del receptor.

El estudio de la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico, realizado por nosotros, evidenció que el receptor está fosforilado en condiciones basales y que esta fosforilación aumenta por acción de NA, TPA e IGF-I. En el caso de la estimulación por su agonista natural, la noradrenalina, el receptor sufre desensibilización homóloga, y en el caso de la fosforilación por TPA o IGF-I experimenta desensibilización heteróloga. Al comparar la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico con la observada en los otros subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos vemos que su fosforilación basal es mayor. Así, para detectar experimentalmente la fosforilación del subtipo α_{1b} o del α_{1a} se utiliza fósforo en mayor concentración que la utilizada con el α_{1d} . La explicación del estado fosforilado del receptor α_{1d} -adrenérgico en condiciones basales puede estar correlacionada con el hecho de que el receptor α_{1d} -adrenérgico tiene la actividad intrínseca más elevada de todos los subtipos.

En la literatura científica por lo general se ha considerado que los receptores de siete dominios transmembranales son los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Sin embargo, parece ser que esto se ha hecho sólo para simplificar los términos y los conceptos, pues se sabe que algunos receptores con un dominio transmembranal, incluyendo los receptores con actividad de tirosina cinasa, también pueden interactuar con las proteínas G, que a su vez median en las acciones hormonales (Patel, 2004). La primera vez que se reportó que el receptor de IGF-I se acopla a proteínas G heterotriméricas fue en 1987 (Nishimoto *et al.*, 1987). Los estudios recientes han revelado que el receptor de IGF-I está asociado con las subunidades $G\alpha_i$ y $G\beta\gamma$ (Dalle *et al.*, 2001). En experimentos con células de músculo liso de intestino de humano, se ha demostrado que la activación del receptor de IGF-I inhibe a la adenilil ciclasa a través de $G\alpha_i$ y activa a las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) a través de $G\beta\gamma$, modulando de esta manera el crecimiento de estas células, pues la elevación de los niveles de cAMP disminuye el crecimiento celular, mientras que la elevación de la actividad de las ERK aumenta el crecimiento de las células. Cabe mencionar que en estas células la activación de la PI3K en respuesta a IGF-I fue independiente de la activación de las proteínas G heterotriméricas, aunque la PI3K puede activar a Akt y otras vías también, modulando la sobrevivencia y el crecimiento celular. Por lo tanto, sólo algunas y no todas las acciones de IGF-I se modulan por el acoplamiento a las proteínas G_i . Aún existen muchas interrogantes para determinar con certeza que la interacción es directa.

Además, los estudios de Dalle han revelado que las β -arrestinas están asociadas con el receptor IGF-I (Dalle *et al.*, 2001). El papel de las β -arrestinas en la señalización todavía no está claro: una de las hipótesis es que las β -arrestinas pueden servir para transportar las proteínas G hacia el receptor de IGF-I, ya que se ha demostrado que las β -arrestinas y $G\alpha_i$ coimmunoprecipitan. Por otro lado, las β -arrestinas pueden facilitar la internalización del receptor de IGF-I, lo que puede ser necesario para la activación de las cascadas de señalización vía ERKs.

Los estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la toxina pertusis (un inhibidor de las proteínas de la familia G_i) inhibe la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico inducida por IGF-I, lo que sugiere que en la regulación funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico por IGF-I pueden participar las proteínas de la familia G_i . Además, se ha demostrado que la acción de la insulina, EGF, y PDGF en la fosforilación del receptor α_{1b} -adrenérgico es también sensible a la toxina pertusis. Es muy importante mencionar que la toxina pertusis no bloquea completamente el efecto de fosforilación por los factores de crecimiento, lo que indica que las proteínas G no son los únicos mediadores de este efecto y que la actividad de tirosina cinasa de estos receptores y la formación de los residuos de fosfotirosina en sus proteínas blanco posiblemente también juega un papel crítico en la regulación cruzada entre los GPCR y RTK. Las proteínas G_i posiblemente están involucradas en la regulación funcional del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I; sin embargo esto debe demostrarse experimentalmente, pues como ya hemos observado hay muchos factores que influyen en las vías de señalización hormonal.

Como ya mencionamos anteriormente, la regulación cruzada entre GPCRs y RTKs puede ser bidireccional. Los estudios de Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2006a) han demostrado que en glándulas lacrimales aisladas la activación del receptor α_{1d} -adrenérgico por su agonista estimula la secreción de la peroxidasa y la activación de Erk1/2, y además induce la transactivación del receptor de EGF por

medio de la capacidad proteolítica de las metaloproteasas de liberar los factores de crecimiento atrapados en la matriz extracelular cercana. La transactivación del receptor de EGF sirve como un mecanismo de retroalimentación negativa que evita la estimulación persistente del receptor α_{1d} -adrenérgico por su agonista y disminuye la secreción de la peroxidasa y activación de Erk1/2 (Chen *et al.*, 2006a). Los estudios de nuestro laboratorio han demostrado que IGF-I induce la fosforilación y desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico, y que en este proceso está involucrado la transactivación del receptor de EGF a través de la ruptura de HB-EGF por metaloproteasas (Molina-Muñoz *et al.*, 2006). Existe la posibilidad de que un proceso similar puede ocurrir en la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-I, ya que existen algunas evidencias de regulación cruzada entre el receptor de IGF-I y el receptor de EGF, sin embargo se necesitan las confirmaciones experimentales.

La familia de la PI3K incluye tres grandes grupos, que están involucrados en muy diversas funciones celulares, incluyendo crecimiento celular, adhesión, supervivencia, transporte intracelular y muchas otras.

Los miembros de la familia PKC tienen diferencias en la especificidad a su substrato y en la sensibilidad a activar a sus moléculas efectoras (blanco). En nuestro estudio, la fosforilación inducida por el IGF-I fue bloqueada por los inhibidores de la PI3K y de la PKC, lo que sugiere que la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por IGF-1 ocurre a través de la PKC y de la PI3K. En el presente trabajo nuestro objetivo no incluía verificar las isoformas de las cinasas participantes; sin embargo los trabajos anteriores de nuestro laboratorio han revelado que varias isoformas de PKC participan en este proceso, lo que evidencia que diferentes isoformas participan en diferentes pasos de la regulación cruzada o que puede existir redundancia funcional entre las isoformas.

La fosforilación es un proceso importante para la regulación heteróloga del receptor α_{1d} -adrenérgico. La fosforilación inducida por el IGF-I es sensible a inhibidores de la PKC y de la PI3K, lo cual sugiere que estas cinasas, posiblemente, actúan en forma secuencial. La PI3K contiene dos subunidades: la reguladora (p85) y la catalítica (p110), cuando el receptor de IGF-1 es activado y fosforilado en los residuos de tirosina, reclutando las proteínas adaptadoras que sirven como anclaje para otras moléculas entre las cuales está la proteína p85 que permite que se acople la subunidad catalítica de PI3K. PI3K es la molécula moduladora de la actividad de PKC a través de síntesis de fosfoinosítidos-3. Estos lípidos actúan como importantes segundos mensajeros y activan a la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), la que, a su vez, fosforila a diferentes isoformas de la PKC. Esta proteína probablemente participa en la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico. También se ha reportado que los fosfoinosítidos-3 pueden activar a las isoformas de PKC directamente.

Esta información sugiere la conveniencia de identificar y estudiar a las isoformas de las PKCs y PI3Ks que posiblemente participan en el proceso de desensibilización heteróloga, con objeto de conocer mejor los mecanismos de regulación de los procesos de desensibilización de los receptores α_{1d} -adrenérgicos por IGF-I.

Varios reportes han documentado la importancia de la regulación cruzada entre los receptores acoplados a la misma o a diferentes vías de señalización. Esta regulación cruzada resulta ser muy importante cuando se trata de condiciones fisiológicas donde las células están constantemente expuestas a mezclas de mensajeros. Los receptores

acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) representan dos vías importantes para la transducción de señales celulares y están involucradas en varios estados fisiológicos y patológicos. Nuestros datos indican que la activación de los receptores de IGF-I inducen la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico, y que este efecto está asociado a la desensibilización y posiblemente su internalización. Esta fosforilación inducida por el receptor de IGF-I es sensible a inhibidores de PKC y PI3K, sugiriendo que en la desensibilización del receptor α_{1d} -adrenérgico por el IGF-I participan estas dos cinasas (Figura 15).

Nuestros datos sugieren un papel regulador del IGF-I sobre las acciones α_{1d} -adrenérgicas en las células que normalmente coexpresan estos receptores (músculo liso vascular, corazón, etc.) (Araujo *et al.*, 2007; Chisalita y Arnqvist, 2005; Chisalita *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 1998).

Los receptores α_1 -adrenérgicos tienen múltiples funciones fisiológicas, por lo que el control de su actividad es importante en la investigación y tiene perspectivas terapéuticas en sus aplicaciones concretas, por lo que este tipo de trabajo de investigación consolida el conocimiento ya adquirido y abre posibilidades a nuevos desarrollos para enfrentar problemas en el campo de la salud.

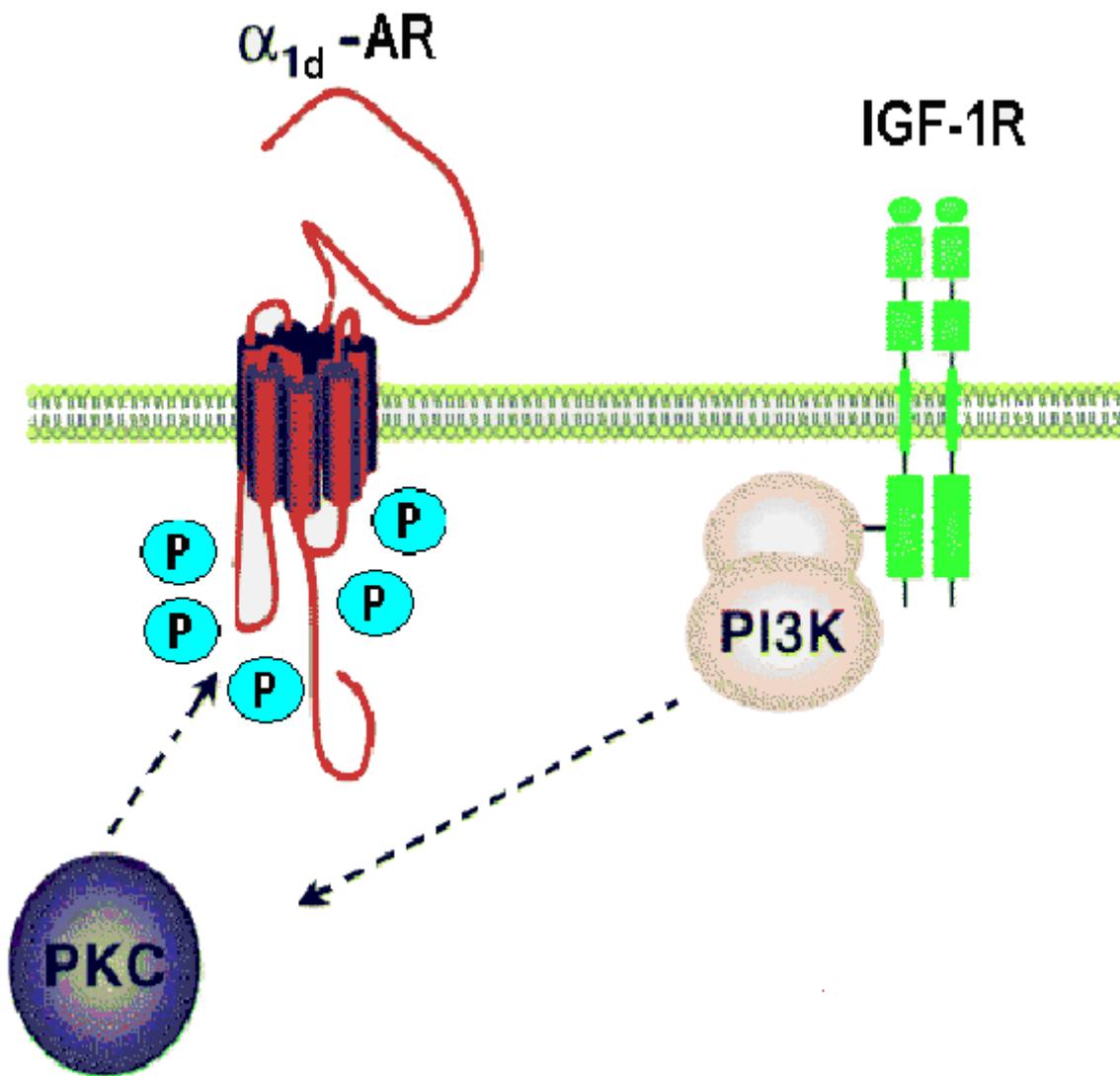


Figura 15.Regulación del receptor α_{1d} -adrenérgico por fosforilación inducida por IGF-1.

La unión del IGF-I promueve la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina. El IGF-IR fosforilado recluta proteínas que activan cascadas de fosforilación vía PI3K, que llevan a la activación de la PKC. La PKC induce la fosforilación del receptor α_{1d} -adrenérgico, este efecto está asociado a la desensibilización y posiblemente a la internalización del receptor.

IX. Referencias

- Araujo, A.S., Enzweiler, A.T., Schenkel, P., Fernandes, T.R., Ribeiro, M.F., Partata, W.A., Llesuy, S., Bello-Klein, A., 2007. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 240, 17-25.
- Baserga, R., 1994. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79, 927-930.
- Baserga, R., 1999. The IGF-I receptor in cancer research. *Experimental Cell Research* 253, 1-6.
- Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* 18, 1723-1729.
- Buchanan, F.G., DuBois, R.N., 2006. Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle (Georgetown), Tex* 5, 2060-2063.
- Carrieri, A., Centeno, N.B., Rodrigo, J., Sanz, F., Carotti, A., 2001. Theoretical evidence of a salt bridge disruption as the initiating process for the alpha1d-adrenergic receptor activation: a molecular dynamics and docking study. *Proteins* 43, 382-394.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 2000. Lysophosphatidic acid modulates alpha(1b)-adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Molecular Pharmacology* 57, 1027-1033.
- Cotecchia, S., Scheer, A., Diviani, D., Fanelli, F., De Benedetti, P.G., 1998. Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Farmacologia* 53, 273-277.
- Craft, C.M., Whitmore, D.H., Wiechmann, A.F., 1994. Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 4613-4619.
- Chen, L., Hodges, R.R., Funaki, C., Zoukhri, D., Gaivin, R.J., Perez, D.M., Dartt, D.A., 2006a. Effects of alpha1D-adrenergic receptors on shedding of biologically active EGF in freshly isolated lacrimal gland epithelial cells. *American Journal of Physiology* 291, C946-956.
- Chen, Z., Hague, C., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2006b. Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 12414-12420.
- Chisalita, S.I., Arnqvist, H.J., 2005. Expression and function of receptors for insulin-like growth factor-I and insulin in human coronary artery smooth muscle cells. *Diabetologia* 48, 2155-2161.

Chisalita, S.I., Nitert, M.D., Arnqvist, H.J., 2006. Characterisation of receptors for IGF-I and insulin; evidence for hybrid insulin/IGF-I receptor in human coronary artery endothelial cells. *Growth Horm IGF Res* 16, 258-266.

Dalle, S., Imamura, T., Rose, D.W., Worrall, D.S., Ugi, S., Hupfeld, C.J., Olefsky, J.M., 2002. Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating beta-arrestin-1. *Molecular and Cellular Biology* 22, 6272-6285.

Dalle, S., Ricketts, W., Imamura, T., Vollenweider, P., Olefsky, J.M., 2001. Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 15688-15695.

Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., Ullrich, A., 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *The EMBO Journal* 16, 7032-7044.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A., 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.

Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D.K., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1997. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 19125-19132.

Digby, G.J., Lober, R.M., Sethi, P.R., Lambert, N.A., 2006. Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17789-17794.

Favelyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R., Miller, W.T., 2001. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nature Structural Biology* 8, 1058-1063.

Ferguson, S.S., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews* 53, 1-24.

García-Sáinz, J.A., Rodríguez-Perez, C.E., Romero-Ávila, M.T., 2004a. Human alpha1D-adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochemical Pharmacology* 67, 1853-1858.

García-Sáinz, J.A., Romero-Ávila, M.T., Molina-Muñoz, T., Medina Ldel, C., 2004b. Insulin induces alpha1B-adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. *Life Sciences* 75, 1937-1947.

García-Sáinz, J.A., Torres-Padilla, M.E., 1999. Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors. *FEBS letters* 443, 277-281.

- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Cuevas, F.G., Romero-Ávila, M.T., 2001. Phosphorylation and desensitization of alpha1d-adrenergic receptors. *The Biochemical Journal* 353, 603-610.
- García-Sainz, J.A., Vázquez-Prado, J., del Carmen Medina, L., 2000. Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 389, 1-12.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Villalobos-Molina, R., 1999. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Archives of Medical Research* 30, 449-458.
- Gavi, S., Shumay, E., Wang, H.Y., Malbon, C.C., 2006. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 17, 48-54.
- Gilman, A.G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of Biochemistry* 56, 615-649.
- Girnita, L., Girnita, A., Brodin, B., Xie, Y., Nilsson, G., Dricu, A., Lundeberg, J., Wejde, J., Bartolazzi, A., Wiman, K.G., Larsson, O., 2000a. Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: functional impact. *Cancer Research* 60, 5278-5283.
- Girnita, L., Girnita, A., Wang, M., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., Larsson, O., 2000b. A link between basic fibroblast growth factor (bFGF) and EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 19, 4298-4301.
- Girnita, L., Wang, M., Xie, Y., Nilsson, G., Dricu, A., Wejde, J., Larsson, O., 2000c. Inhibition of N-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. *Anti-cancer Drug Design* 15, 67-72.
- Grimberg, A., 2003. Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2, 630-635.
- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A.S., Schulte, N.A., Toews, M.L., Minneman, K.P., 2004a. The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309, 388-397.
- Hague, C., Uberti, M.A., Chen, Z., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2004b. Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 15541-15549.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *The Journal of Cell Biology* 145, 927-932.

Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F.E., Pollak, M., 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351, 1393-1396.

Haring, H.U., Kellerer, M., Mosthaf, L., 1994. Modulation of insulin receptor signalling: significance of altered receptor isoform patterns and mechanism of hyperglycaemia-induced receptor modulation. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S149-154.

Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Ruffolo, R.R., Jr., 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological Reviews* 47, 267-270.

Hur, E.M., Kim, K.T., 2002. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cellular Signalling* 14, 397-405.

Kanter-Lewensohn, L., Dricu, A., Girnita, L., Wejde, J., Larsson, O., 2000a. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and p27Kip1 in melanocytic tumors: a potential regulatory role of IGF-1 pathway in distribution of p27Kip1 between different cyclins. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 17, 193-202.

Kanter-Lewensohn, L., Girnita, L., Girnita, A., Dricu, A., Olsson, G., Leech, L., Nilsson, G., Hilding, A., Wejde, J., Brismar, K., Larsson, O., 2000b. Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 165, 131-137.

Karamouzis, M.V., Papavassiliou, A.G., 2006. The IGF-1 network in lung carcinoma therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 12, 595-602.

Karoor, V., Baltensperger, K., Paul, H., Czech, M.P., Malbon, C.C., 1995. Phosphorylation of tyrosyl residues 350/354 of the beta-adrenergic receptor is obligatory for counterregulatory effects of insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 25305-25308.

Kirchhausen, T., 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual review of Cell and Developmental Biology* 15, 705-732.

Krueger, K.M., Daaka, Y., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J., 1997. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 5-8.

Lefkowitz, R.J., 2004. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 413-422.

Lefkowitz, R.J., Rajagopal, K., Whalen, E.J., 2006. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Molecular cell* 24, 643-652.

Leurs, R., Smit, M.J., Alewijnse, A.E., Timmerman, H., 1998. Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends in Biochemical sciences* 23, 418-422.

Luther, H.P., Podlowski, S., Schulze, W., Morwinski, R., Buchwalow, I., Baumann, G., Wallukat, G., 2001. Expression of alpha1-adrenergic receptor subtypes in heart cell culture. *Molecular and Cellular Biochemistry* 224, 69-79.

Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science* 115, 455-465.

McCune, D.F., Edelman, S.E., Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J., Perez, D.M., Piascik, M.T., 2000. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Molecular Pharmacology* 57, 659-666.

Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz Muñoz, M.E., García-Sáinz, J.A., 1998. Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS letters* 422, 141-145.

Molina-Muñoz, T., Romero-Ávila, M.T., García-Sáinz, J.A., 2006. Insulin-like growth factor-I induces alpha(1B)-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma and epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md 20, 2773-2783.

Nakaoka, H., Perez, D.M., Baek, K.J., Das, T., Husain, A., Misono, K., Im, M.J., Graham, R.M., 1994. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science (New York, N.Y)* 264, 1593-1596.

Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L.J., Zilberfarb, V., Strosberg, A.D., Bouvier, M., Marullo, S., 1993. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Molecular Pharmacology* 43, 548-555.

Nishimoto, I., Ogata, E., Kojima, I., 1987. Pertussis toxin inhibits the action of insulin-like growth factor-I. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 403-411.

Pao, C.S., Benovic, J.L., 2005. Structure/function analysis of alpha2A-adrenergic receptor interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 11052-11058.

Patel, T.B., 2004. Single transmembrane spanning heterotrimeric g protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacological Reviews* 56, 371-385.

Perez, D.M., 2007. Structure-function of alpha(1)-adrenergic receptors. *Biochemical Pharmacology* 73, 1051-1062.

Perez, D.M., DeYoung, M.B., Graham, R.M., 1993. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Molecular Pharmacology* 44, 784-795.

Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A., Lefkowitz, R.J., 1995. The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8343-8347.

Porter, J.E., Hwa, J., Perez, D.M., 1996. Activation of the alpha1b-adrenergic receptor is initiated by disruption of an interhelical salt bridge constraint. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 28318-28323.

Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D., Schwinn, D.A., 1994. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Molecular Pharmacology* 45, 171-175.

Pupo, A.S., Uberti, M.A., Minneman, K.P., 2003. N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European Journal of Pharmacology* 462, 1-8.

Radhika, V., Dhanasekaran, N., 2001. Transforming G proteins. *Oncogene* 20, 1607-1614.

Reiter, E., Lefkowitz, R.J., 2006. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17, 159-165.

Romero-Ávila, M.T., Flores-Jasso, C.F., García-Sáinz, J.A., 2002. alpha1B-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta. *The Biochemical Journal* 368, 581-587.

Rovati, G.E., Capra, V., Neubig, R.R., 2007. The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Molecular Pharmacology* 71, 959-964.

Sachdev, D., Yee, D., 2007. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1-12.

Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.

Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., Lefkowitz, R.J., 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 4625-4636.

Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D., Cotecchia, S., 2006. Ezrin directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 4354-4363.

Strange, P.G., 1999. G-protein coupled receptors: conformations and states. *Biochemical Pharmacology* 58, 1081-1088.

Strange, P.G., 2002. Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 89-95.

Tanoue, A., Koshimizu, T.A., Shibata, K., Nasa, Y., Takeo, S., Tsujimoto, G., 2003. Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14, 107-113.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., et al., 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO Journal* 5, 2503-2512.

Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 1996. Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Molecular Pharmacology* 50, 17-22.

Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 27330-27337.

Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Ávila, M.T., González-Espinosa, C., García-Sáinz, J.A., 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 6553-6559.

Villalobos-Molina, R., Ibarra, M., 1996. Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *European Journal of Pharmacology* 298, 257-263.

Waldo, G.L., Northup, J.K., Perkins, J.P., Harden, T.K., 1983. Characterization of an altered membrane form of the beta-adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 13900-13908.

Wolff, D.W., Dang, H.K., Liu, M.F., Jeffries, W.B., Scofield, M.A., 1998. Distribution of alpha1-adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 32, 117-122.

Yamaki, K., Tsuda, M., Shinohara, T., 1988. The sequence of human retinal S-antigen reveals similarities with alpha-transducin. *FEBS letters* 234, 39-43.

Yang, W., Xia, S.H., 2006. Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol* 12, 7753-7757.

Zhong, H., Minneman, K.P., 1999. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways in PC12 cells by closely related alpha1-adrenergic receptor subtypes. *Journal of Neurochemistry* 72, 2388-2396.

Ziani, K., Gisbert, R., Noguera, M.A., Ivorra, M.D., D'Ocon, P., 2002. Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries. *American Journal of Physiology* 282, H475-481.

www.aderis.com/img/art_gprotein.gif

www.grossmont.edu/.716:17_gprot_dissociate.ipg

