



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“REVISIÓN BIBLIOHEMEROGRÁFICA
ELECTRÓNICA DE LOS PROCESOS DE
HOMODIMERIZACIÓN Y
HETERODIMERIZACIÓN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
ELIZABETH MAQUEDA CÁRDENAS

ASESORAS:
DRA. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR
DRA. JAZMIN FLORES MONROY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Revisión bibliohemerográfica electrónica de los procesos de homodimerización y heterodimerización.

Que presenta la pasante: Elizabeth Maqueda Cárdenas

Con número de cuenta: 099581037 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Azucena Lee Mendoza	
2do. SUPLENTE	M. en C. Diego Lezama Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor

A Gerardo

Mi compañerito, mi amigo, por haber recorrido este camino juntos, por tu compañía, por tu apoyo y cariño, por tu calidez y por tu gran calidad humana, recuerda la grandeza que hay en ti y todas esas virtudes que te hacen una gran persona. Gracias por ser el padre de nuestros niños y por procurar nuestro bienestar, por tus desveladas por esos días difíciles y por esos días buenos, por los recuerdos, por tus canciones, tus ocurrencias y aprendizajes, esto es resultado de tu apoyo. Gracias por todo, gracias por tu sonrisa y tus abrazos te amo.

A mis niños

Ximena, mi güerita, por llegar a mi vida con tu sonrisita, por permitirme ir aprendiendo lo que es ser madre, la emoción de cada primera vez, por compartir la emoción y el nerviosismo de un resultado. A ti Vale porque en mi mente siempre está tu sonrisita, porque eres atrevida y por esa yocura tuya que como te lo he dicho no es otra cosa más que tu imaginación esa que te hace tan peculiar. Yayo, mi papo, mi Gerardo a escala, niño travieso y juguetón, tienes mucha capacidad y un gran potencial utilízalo para lograr tus metas. A los tres les dedico este trabajo, mucho del cual lo hice junto con ustedes a la hora de la tarea, después de ayudarles, cuando dormían, cuando aún no despertaban, cuando estaban en la escuela, pero en todas partes siempre están en mi mente porque desde que me eligieron como su mamá nuestra historia ha escrito muchas páginas, porque cada logro es para compartirlo, deseo que esto les sirva de ejemplo para conseguir sus metas, y que tanto papá como yo podamos celebrarlo con ustedes los amo mis viejitos.

A mi mamá

Por estar pendiente de mi educación, por darnos una niñez divertida, por acompañarnos, por guiarnos y por dedicarte a nosotros, gracias.

A Cane

Por ser un gran ejemplo, por tu fuerza, tus logros, por compartir juegos de niña y pláticas y enseñanzas de hermanita mayor, estoy orgullosa de las cosas que has logrado y de como te has reinventado, eres mi heroína. A Irene y Selene gracias por los recuerdos de la niñez, por las anécdotas que aun hoy me provocan sonrisas.

A mi padre

Por los libros nuevos, por los recuerdos plasmados con tu cámara, por las veces que te hice sentir orgullo, y por esas cosas que me hubiera gustado poder compartir contigo.

A la Doctora Luisa Martínez

Por su paciencia y comprensión hacia mi persona, como se lo he mencionado la admiro como mujer, como líder, como profesora, como madre y agradezco su tiempo, sus enseñanzas, sus pláticas, su confianza, este trabajo lo hice gracias a su guía y su enorme apoyo para lograrlo, en este día este logro es para las dos, gracias por compartir su conocimiento y sacar lo mejor de nosotros. Gracias por que, en este camino siempre me acompañó con su comprensión y aliento.

A la Doctora Jaz

Por permitirme compartir anécdotas, pláticas, noticias, recuerdos y sobre todo por permitirme conocerte y descubrir la personita especial y divertida, admiro tu determinación para hacer las cosas que te propones y tus logros.

Gracias a mis sinodales por su paciencia, consejos para mejorar este trabajo, por dedicarme su tiempo y por el excelente trabajo que dedican a nuestra facultad.

A los chicos del laboratorio

Dianita, Iban, Diego, Luis y todos aquellos con los que compartí mi estancia en farma, gracias por los momentos, por el apoyo y la ayuda.

A mis amig@s

Por las risas, el llanto, frustración, logros, trabajos, desveladas, fiestas, por esas pláticas de horas y horas por teléfono, esperando clase, después de mucho tiempo sin vernos, gracias por alegrarse conmigo y por mí, por llorar conmigo y apapacharme cuando lo necesitaba, gracias por levantarme mi autoestima y aconsejarme para mejorar, gracias por los desayunos, las comidas, las bebidas, los viajes, las locuras y los recuerdos. Gracias Olga pero Magdala, Deisy, Aideé, Mirsha, Angie, Maru.

En especial

A amá Cata(mi suegra) porque es una persona tan especial, después de usted se rompió el molde, la admiro y la considero un gran ejemplo de humanidad, gracias a ti Yola que en tu nombre lo llevas eres mucho corazón y al igual que tu mami estas llena de sabiduría, humanidad y calidez, Lupe te admiro tu determinación para hacer las cosas, Lina estas llena de ideas, a todas ustedes gracias porque desde que las conocí he recibido cosas buenas, me han enseñado valores llevados a la práctica no solo teoría, son un buen equipo y les agradezco todo lo que han hecho por mí, por Gerardo y mis niños.

Gracias a mi amada **UNAM**, es un gran orgullo pertenecer a esta máxima casa de estudios, cada que escucho tu himno o entonar una goya no puedo evitar el erizar mi piel, a mi Facultad por ser mi segunda casa, porque en ella pase una parte fundamental e irrepetible de mi vida y conocí a gente extraordinaria y a los mejores profesores.

Agradecimientos a los proyectos:

PAPIIT IN213318 DG APA-UNAM; PIAPI 1828 – FESC UNAM y PIAPIME 2018 ID . 2 . 11 . 02 18 FESC - UNAM

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Farmacología del Miocardio Unidad de Posgrado Campo Uno FESC – UNAM.

INDICE

	Pág.
ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos Particulares	3
3. METODOLOGIA.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	6
4.1 Respuesta a los fármacos	6
4.1.1 Receptores	7
4.1.1.1 Propiedades de los receptores que regulan los efectos de los ligandos.....	7
4.1.1.1.1 Fuerzas de Van der Waals.....	9
4.1.1.1.2 Uniones de hidrógeno.....	10
4.1.1.1.3 Uniones iónicas.....	10
4.1.1.1.4 Uniones covalentes.....	11
4.1.1.2 Mecanismos efectores: transducción de señales.....	12
4.1.1.3 Concentración y ocupación de receptores.....	13
4.1.2 Teoría cualitativa de los receptores y Análisis de Scatchard.....	14
4.1.2.1 Relación entre la unión ligando-receptor y el tiempo.....	18
4.1.2.1.1 Disociación.....	20
4.1.2.1.2 Asociación.....	21
4.1.2.1.3 Cuantificación de la asociación.....	23
4.1.2.2 Cuantificación de la ocupación del receptor en el tiempo.....	24
4.1.3 Terapéutica y relación dosis-respuesta.....	25

4.1.3.1	Características de la relación concentración-respuesta de los fármacos.....	26
4.1.3.2	Dinámica de los receptores y relación concentración-respuesta.....	28
4.1.2.2.1	Dinámica de los receptores.....	29
4.1.3.2.2	Acoplamiento receptor-efector y factor de conformación.....	31
4.1.3.3	Relación entre intensidad y curso temporal de los efectos de un fármaco...	35
4.1.4	Agonistas y antagonistas a los receptores de los fármacos.....	37
4.2	Transducción de señales	39
4.3	Proteínas G.....	44
4.3.1	Efectores de proteínas G	45
4.4	Características generales de los Receptores acoplados a proteínas G	52
4.4.1	Ligandos de los GPCRs.....	54
4.4.2	Cascadas de señalización a través de GPCRs.....	55
4.4.3	Estructura de los GPCRs.....	58
4.4.4	Nomenclatura.....	60
4.4.5	Vías de señalización.....	61
4.4.5.1	Activación.....	63
4.4.5.2	Desensibilización.....	65
4.4.5.3	Fosforilación y Arrestinas.....	66
4.4.5.4	Internalización.....	67
5.	DIMERIZACIÓN DE RECEPTORES.....	69
5.1	Heterodimerización de receptores y descubrimiento de fármacos.....	71
5.1.1	Interacciones receptor-receptor.....	71
5.2	Heterodímeros y Homodímeros de GPCR: nuevas propiedades de los receptores.....	74
5.2.1	Cambios en la farmacología del receptor	76
5.2.2	Cambios en la señalización del receptor	76
5.3	Fisiopatología de los heterodímeros GPCR.....	78
5.4	Blancos de los heterodímeros de los GPCR....	79
5.4.1	Ligandos específicos de los heterodímeros.....	79

5.4.2 Ligandos bivalentes.....	80
5.4.3 Ligandos múltiples.....	80
5.4.4 Moduladores alostéricos.....	82
5.5 Importancia terapéutica en la industria farmacéutica	85
5.6 Funciones de la homo- y heterodimerización de GPCR	87
5.7 Heterodímeros del receptor de adenosina y dopamina	91
5.8 Heterodímeros de GPCR y descubrimiento de fármacos.....	96
5.8.1 Dimerización entre receptores en sistema cardiovascular.....	97
5.9 Objetivos de fármacos específicos para heterodímeros de GPCR.....	101
6. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA HOMO- Y HETERODIMERIZACIÓN DE GPCR.....	102
7. CONCLUSIONES	110
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	111
9. REFERENCIAS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuerzas de Vander Walls.....	9
Figura 2. Uniones iónicas.....	10
Figura 3. Enlaces químicos covalentes.....	11
Figura 4. Vías de transducción de señales generadas por la unión del ligando a sus receptores.....	12
Figura 5. Curvas de saturación.....	16
Figura 6. Análisis de Scatchard del equilibrio de las interacciones ligando-receptor.....	18
Figura 7. Dependencia del tiempo de las interacciones ligando-receptor.....	19
Figura 8. Disociación ligando-receptor.....	21
Figura 9. Curso temporal de asociación de ligandos y receptores.....	22
Figura 10. Velocidad de asociación observada.....	23
Figura 11. Dependencia de la concentración de las respuestas.....	26
Figura 12. Potencia y eficacia.....	27
Figura 13. Dinámica del receptor acoplado a proteína G.....	31
Figura 14. Receptores de reserva.....	33
Figura 15. Impacto de los receptores de reserva sobre la relación dosis-respuesta.....	33
Figura 16. Curvas de concentración-respuesta.....	34
Figura 17. Factor de configuración del trazo.....	34
Figura 18. Curso temporal de la eliminación de los fármacos la circulación.....	36
Figura 19. Intensidad y curso temporal de los efectos de los fármacos.....	36

Figura 20. Agonistas y antagonistas.....	38
Figura 21. Comunicación intracelular.....	39
Figura 22. Comunicación Endocrina.....	40
Figura 23. Señalización Paracrina.....	40
Figura 24. Comunicación Autócrina.....	41
Figura 25. Comunicación Nerviosa.....	41
Figura 26. Comunicación Yuxtacrina.....	42
Figura 27. Activación de la subunidad G alfa de un receptor de la proteína G acoplada....	41
Figura 28. Cascadas de señalización dentro de una célula Las relaciones de las proteínas G a la membrana plasmática.....	46
Figura 29. Sistema del AMP cíclico.....	48
Figura 30. Representación esquemática de la liberación de trifosfato de inositol(IP) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros.....	50
Figura 31. Activación de Proteinkinasa.....	51
Figura 32. Unión de ligando agonista a un GPCR y activación de mecanismos de señalización celular responsables de las funciones biológicas.....	53
Figura 33. Representación esquemática general de la activación de un GPCR.....	55
Figura 34. Estructura de GPCR's.....	58
Figura 35. Representación de las tres principales familias de GPCR.....	60
Figura 36. Representación de algunas de las vías que enlazan los GPCR con la vía MAPK....	61
Figura 37. Representación de las β -arrestinas regulando la función y localización subcelular de otras proteínas.....	63

Figura 38. Mecanismo de activación de un GPCR.....	65
Figura 39. Ejemplo de un modelo de desensibilización, internalización y degradación de los GPCR.....	66
Figura 40. Heterodimerización de los GPCR's.....	68
Figura 41. Dimerización mediada por un ligando.....	69
Figura 42. Dimerización mediada por un receptor.....	70
Figura 43. Esquema de formación de un homodímero de dos receptores.....	72
Figura 44. Esquema de la formación de un heterodímero de dos receptores.....	72
Figura 45. La modulación de la función del receptor por heterodimerización.....	75
Figura 46. Modos de acción de los moduladores alostéricos.....	83
Figura 47. Representación esquemática del fenómeno de alosterismo.....	84
Figura 48. Representación esquemática del fenómeno de agonismo sesgado.....	86
Figura 49. Posibles papeles de la oligomerización de GPCRs.....	88
Figura 50. Funciones de la heterodimerización de GPCR.....	91
Figura 51. Cross-talk entre el glutamato mGluR2 y la serotonina Receptores Antagonistas de 5HT2 resultante de su heterodimerización.....	96
Figura 52. Objetivos de fármacos específicos para heterómeros GPCR.....	102
Figura 53. Representación esquemática del fenómeno de FRET.....	105
Figura 54. Representación esquemática del fenómeno de BRET.....	106
Figura 55. Representación de la técnica 'In Situ Proximity Ligation Assay' (PLA) utilizada para la detección de interacciones entre receptores.....	108

Figura 56. Ligandos que interaccionan específicamente con heterodímeros.....109

Figura 57 .Técnicas emergentes para detectar heterodímeros112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cascadas más comunes de señalización inducidas por la activación de los GPCR's.....	56
Tabla 2. Ligandos extracelulares que se unen y activan GPCR específicos.....	59
Tabla 3. Ejemplos de homodímeros.....	73
Tabla 4. Ejemplos de heterodímeros.....	73
Tabla 5. Algunos de los fármacos más vendidos de GPCR.....	85
Tabla 6. Ventajas e inconvenientes del desarrollo de ligandos bivalentes y selectivos de heterodímeros.....	106

1. INTRODUCCIÓN

Las células de organismos pluricelulares están en permanente intercomunicación a través de señales de todo tipo (hormonas, citocinas, factores de crecimiento, pequeños péptidos, entre otros) que regulan la proliferación, diferenciación, el metabolismo, el comportamiento celular, e incluso la muerte celular programada (apoptosis). Cuando estas señales llegan a las células blanco, interaccionan con sus respectivos receptores y se produce la activación de vías específicas de transducción de señales. Posteriormente, las señales son transmitidas hacia el interior de la célula, hasta los puntos en que se regula el metabolismo, la transcripción y traducción de genes para generar la respuesta adecuada. Cada señal extracelular es traducida a través de múltiples vías o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante diversas modificaciones tales como fosforilación, desfosforilación y translocación intracelular. Algunos estudios nos indican que las células han diseñado un complejo entrelazado de vías de señalización donde diversas vías pueden ser activadas por distintas hormonas en un mismo contexto celular. Por lo tanto, las distintas respuestas celulares dependerán en gran medida del conjunto de vías, iguales o distintas, presentes en las células blanco, que cada señal extracelular sea capaz de estimular¹.

La regulación de los procesos de señalización se puede dar a distintos niveles. La existencia de redes de señalización intracelular ofrece, por lo tanto, grandes posibilidades de modulación de las respuestas celulares con base a la regulación cualitativa, cuantitativa o temporal de los diversos componentes de la red en cada tipo celular. Por ejemplo, en una célula, pequeñas variaciones en los niveles locales de un factor de crecimiento puede que module las señales resultantes o incline a la célula hacia la división en vez de conducirse a otros tipos de respuestas². Por tal motivo es importante revisar los conceptos básicos de respuesta a los fármacos, considerando el término receptores, las propiedades de los receptores que regulan los efectos de sus ligandos, los mecanismos efectoros como la transducción de señales, la concentración de los receptores, la teoría cuantitativa de los receptores, la relación entre la unión ligando-receptor y el tiempo, la terapéutica y relación

dosis-respuesta, dinámica de los receptores y la relación concentración-respuesta, acoplamiento receptor-efector, relación entre intensidad y curso temporal de los efectos de un fármaco, agonistas y antagonistas a los receptores de los fármacos, transactivación y transrepresión, transducción de señales, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), proteínas G, su estructura y sus efectores, dimerización de los receptores acoplados a proteínas G y su desensibilización, heterodimerización y modulación de los GPCR, cambios en la farmacología y en la señalización del receptor, fisiopatología de los heterómeros de los receptores acoplados a proteínas G, blancos de los heterodímeros de los receptores acoplados a proteínas G.

Es importante la identificación de estructuras a corto plazo, lo que ayudará a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de activación e inhibición de estos receptores, especialmente en el entorno extremadamente complejo en el que ahora nos encontramos: multiplicidad de centros de unión (centros alostéricos cuya ocupación modula positiva o negativamente la actividad del centro ortostérico), multiplicidad de vías de señalización para un mismo receptor y homo- y heterodimerización entre los receptores. Por su complejidad y presencia en múltiples procesos fisiológicos, los GPCRs constituyen un sistema ideal para la investigación básica en biología, química computacional, farmacología e investigación aplicada a través de la búsqueda de fármacos más potentes y seguros³.

Un amplio espectro de enfermedades -inmunológicas, cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas, psiquiátricas y oncológicas- está relacionado con el funcionamiento anómalo de estos receptores, lo que los convierte en la familia de blancos terapéuticos más importante de la industria farmacéutica³. Por lo que el objetivo de este trabajo es recopilar la información bibliohemerográfica-electrónica de los procesos de homodimerización y heterodimerización de receptores acoplados a proteínas G para determinar su utilidad como una estrategia farmacológica y terapéutica.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Integrar la información de los procesos de homodimerización y heterodimerización de Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCR) llevando a cabo una revisión bibliohemerográfica-electrónica con la finalidad de determinar su utilidad como una estrategia farmacológica y terapéutica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar los conceptos básicos de la respuesta a los fármacos, mediante la información consultada para definir: fármaco, receptor y sus propiedades, unión fármaco-receptor, dinámica de los receptores, agonista, antagonista y teoría cuantitativa de los receptores para relacionarlo con la respuesta farmacológica y el efecto farmacológico.
- 2) Conocer los diferentes eventos del acoplamiento entre el receptor acoplado a una proteína G (GPCR) y el fármaco mediante la información consultada para determinar su dinámica mediante los mecanismos bioquímicos que se desencadenan y dan como resultado los procesos de activación, inhibición, desensibilización, fosforilación e internalización de receptores.
- 3) Analizar el proceso de transducción de señales de acuerdo a la concentración del fármaco y ocupación de receptores mediante su cuantificación, afinidad y actividad intrínseca de la unión fármaco-receptor relacionado con el tiempo, respuesta y terapéutica, asimismo entender la dinámica de los GPCRs.
- 4) Conocer la dimerización de receptores mediante la búsqueda de información sobre los procesos de homodimerización y heterodimerización de GPCRs para determinar la consecuencia bioquímica entre éstos, dando como resultado un efecto farmacológico disminuido o aumentado.

5) Determinar la importancia de los procesos de homodimerización y heterodimerización de GPCRs, mediante el análisis de las vías de señalización implicadas en cada respuesta farmacológica para comprender las ventajas como una nueva estrategia farmacológica y terapéutica.

3. METODOLOGÍA.

3.1 En el presente trabajo se realizó una búsqueda de fuentes documentales disponibles en la FES Cuautitlán, en la biblioteca interna del laboratorio de Farmacología del Miocardio y mediante libros digitales, artículos disponibles en la hemeroteca de la Facultad y a través de la base de datos de Pubmed y Google académico



3.2 Se realizó la búsqueda bibliográfica o Consulta de bases de datos y fuentes documentales. Estableciendo una estrategia de búsqueda, especificando los criterios de selección de documentos para organizar la información.



3.3 Se identificó y se redactó la información necesaria para entender los temas relacionados con receptores, vías de señalización, receptores acoplados a proteínas G y los procesos de homodimerización y heterodimerización.



3.4 Se resumió la información acerca de los procesos de homodimerización y heterodimerización y se identificaron los aspectos relevantes para tener el conocimiento sobre el tema y proporcionar el material útil para su entendimiento.



3.5 Se determinó la importancia de los procesos de homodimerización y heterodimerización como blancos de respuesta farmacológica y terapéutica



3.6 Se finalizó con la redacción de la tesis

4. MARCO TEÓRICO

4.1 RESPUESTA A LOS FÁRMACOS^{4, 5, 6, 7, 8.}

La dosis es la cantidad especificada del agente terapéutico que se aplica al paciente, de manera independiente a la vía de administración (oral, intravenosa, subcutánea e inhalada, entre otras). Las dosis suelen expresarse en cantidades (p.ej., mg., ml) la concentración (molaridad) que alcanza en el sitio de acción es la medida que nos define los efectos biológicos y fisiológicos de los fármacos. Existen tres parámetros que definen la respuesta de un paciente a un fármaco, la correspondencia entre la cantidad de fármaco que recibe, su dosis y la magnitud de la respuesta a esto se le conoce como relación dosis-respuesta.

La farmacocinética estudia el curso temporal de las concentraciones de los fármacos en el organismo y construye modelos para interpretar estos datos y por tanto para valorar o predecir la acción terapéutica o tóxica de un fármaco.

La farmacocinética es la descripción cuantitativa de la rapidez con que avanzan los diversos pasos en la disposición del fármaco; estos son: 1. Absorción de fármacos que les permite llegar al sistema circulatorio general; 2. Distribución a diversos órganos y tejidos del cuerpo, y 3. Eliminación por biotransformación y excreción. La velocidad de estos procesos sirve para dos objetivos. En primer lugar, determinan con cierta precisión el destino de los medicamentos en el cuerpo y, de esa manera, posibilitan el estudio de los factores que lo condicionan. En segundo lugar, se usan para calcular y seleccionar vías, dosis y frecuencias de administración de fármacos.

A la rama de la farmacología que estudia los mecanismos moleculares de la acción de los fármacos y las consecuencias de su interacción con los sistemas biológicos se le denomina farmacodinamia.

4.1.1 RECEPTORES^{4,9,10}.

Todas las células tienen receptores, estos son estructuras macromoleculares de naturaleza proteica que se encuentran en las membranas celulares, en el citoplasma y en el núcleo. Los receptores tienen dos funciones esenciales: reconocer al ligando y propagar el mensaje. Esto se hace por dos dominios diferentes, un dominio de unión que actúa como sitio de unión del ligando. La unión del ligando al receptor depende de la especificidad y la afinidad. La especificidad de un receptor se refiere a la capacidad de fijar un ligando con preferencia a otro. La afinidad se refiere a la fuerza de unión entre el receptor y el ligando medida por la constante de equilibrio K_{eq} o por la constante de disociación K_D .

Los receptores son generalmente proteínas transmembrana, que se unen a moléculas de señalización fuera de la célula y, posteriormente, transmiten la señal a través de una secuencia de interruptores moleculares para vías de señalización interna. Habitualmente, la señal de entrada se produce en forma de impulso nervioso o señales químicas. Una de las interacciones con los receptores es la que se lleva a cabo cuando se introduce un fármaco al organismo, este suceso fundamental de interacción Fármaco-Receptor inicia la comunicación a través de las moléculas de señalización a las cuales se les llama primer mensajero estas moléculas cuentan con gran diversidad funcional y estructural, con receptores acoplados a canales iónicos, a proteína G, catalíticos o reguladores de transcripción del ADN, así como la ayuda integrada de segundos mensajeros. El fármaco se une al receptor para iniciar sus efectos; un grupo importante de estos receptores está compuesto por proteínas que normalmente actúan como receptores para ligandos endógenos, como son: hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento.

4.1.1.1 PROPIEDADES DE LOS RECEPTORES QUE REGULAN LOS EFECTOS DE SUS LIGANDOS^{4,7,9}.

Gran parte de los fármacos actúan sobre receptores de mediadores endógenos, actúan también estabilizando una determinada conformación del receptor ya sea activa, inactiva

o intermedia, es así como surge el concepto de agonista y antagonista [Cell Signalling]. Los receptores poseen dos actividades afines: **unión** de ligandos (fármacos) y activación de mecanismos efectores o **agonismo**. Cabe señalar que la unión de los ligandos puede presentarse en ausencia de agonismo, base para el desarrollo de **antagonistas** terapéuticos que bloquean la capacidad de receptores específicos para producir señales fisiopatológicas dañinas.

En la relación dosis/concentración-respuesta se sugiere que la magnitud de los efectos farmacológicos distales inducidos por los ligandos es proporcional a la fracción de ocupación de los receptores. Para ello se ocupan dos parámetros fundamentales: afinidad y especificidad. La primera es la capacidad que posee un fármaco para unirse con el receptor específico y formar el complejo fármaco-receptor y se refiere a que tan “atractivo” es el ligando para el receptor, es decir la intensidad de las interacciones ligando-receptor. La segunda refleja la complementariedad alta que define a las interacciones ligando-receptor, se refiere a la capacidad de este para discriminar entre una molécula de ligando de otro pese a que estas puedan ser muy similares y que se asemeja a la complementariedad entre cerrojo y llave.

La estructura química del ligando y su sitio de unión complementario en el receptor contienen la información que codifica la afinidad y la especificidad. Se ha revelado que muchos fármacos muestran una correlación muy intensa entre estructura, afinidad y especificidad para producir los efectos farmacológicos. Es así que la estructura del ligando tiene un efecto profundo sobre su actividad (relación estructura-actividad y su sitio de unión). Experimentalmente se ha observado que los fármacos interactúan con receptores proteicos que contienen conformaciones tridimensionales específicas, y que por lo general requieren un mínimo de tres puntos de contacto para permitir la unión. Cambios ligeros de estructura o composición del fármaco pueden alterar de manera notable su afinidad y especificidad.

Para poder interactuar con un receptor fisiológico, la molécula del fármaco debe tener tamaño, carga eléctrica, forma y composición atómica apropiados; cumplidos los requisitos específicos, se combina de manera reversible (en la mayoría de los casos) o irreversible (muy pocos casos), con la molécula receptora.

Las fuerzas que disminuyen la estabilidad de las interacciones fármaco-receptor incluyen la repulsión electrostática de cargas iguales y las limitaciones estéricas que derivan de las características tridimensionales, que incluyen nubes de repulsión de electrones, enlaces químicos

inflexibles y cadenas laterales orgánicas voluminosas. Por último las uniones covalentes se forman cuando dos átomos comparten un par de electrones, estas uniones son muy fuertes y habitualmente irreversibles, por lo que el complejo fármaco-receptor que se forma es prácticamente permanente y genera efectos de muy larga duración.

La reversibilidad permite la inducción de eventos de señalización distales una vez que ocurre la asociación ligando-receptor y la ocupación de los receptores, no obstante, esos eventos terminan cuando se produce la disociación ligando-receptor.

Las fuerzas que gobiernan la interacción entre los átomos y entre las moléculas son la base de las interacciones entre los fármacos y sus receptores; así se describe cuatro tipos de enlace:

4.1.1.1.1 Fuerzas de Van der Waals¹²

Son fuerzas débiles de enlace, presentes en innumerables compuestos y que actúan entre todos los átomos que están en cercanía mutuamente. La fuerza de atracción de estas uniones es inversamente proporcional a la séptima potencia de la distancia de separación entre átomos o moléculas.

Cuando el fármaco y su receptor pueden estar en estado común, esas fuerzas adquieren enorme importancia. Cuanto más específica es la molécula, mayor es la contribución de estas fuerzas.

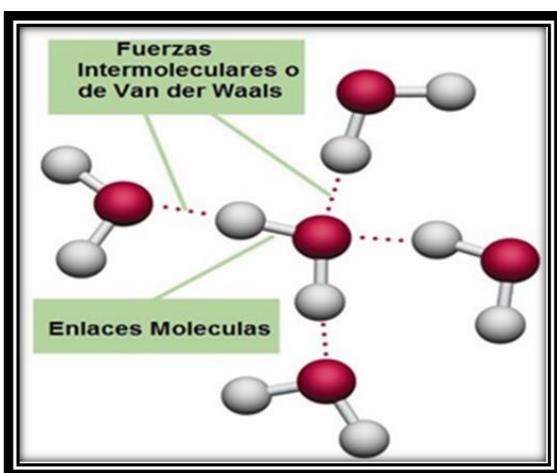


Figura 1. Las fuerzas de van der Waals son fuerzas de estabilización molecular (dan estabilidad a la unión entre varias moléculas), también conocidas como atracciones intermoleculares o de largo alcance y son las fuerzas entre moléculas (fuerzas entre molécula-molécula).

Son fuerzas más débiles que las internas que unen la molécula ya que dependen exclusivamente del tamaño y forma de la molécula pudiendo ser de atracción o de repulsión. Son tan débiles que no se las puede considerar un enlace, como el enlace covalente o iónico, solo se las considera una atracción. Recuperado de Ciencias Naturales(2015): goo.gl/EBrdko

Las fuerzas de Van der Waals son las fuerzas atractivas o repulsivas entre moléculas (o entre partes de una misma molécula) distintas a aquellas debidas a un enlace (covalente, iónico o metálico). Incluyen a atracciones entre átomos, moléculas y superficies fuera de los enlaces normales.

4.1.1.1.2 Uniones de hidrógeno ¹³

Muchos átomos de hidrógeno poseen una carga positiva parcial en la superficie, y forman enlaces con átomos de oxígeno y de nitrógeno cargados negativamente. Al actuar a mayores distancias que las fuerzas de Van der Waals no es importante un acercamiento de las moléculas para lograr su efecto.

Estos enlaces junto con las fuerzas de Van der Waals, constituyen la masa de casi todas las interacciones entre fármaco y receptor.

4.1.1.1.3 Uniones iónicas.¹³

Los enlaces de este tipo se forman entre iones con carga opuesta, por ejemplo acetilcolina positivo y cloruro negativo. Su importancia puede apreciarse claramente en el caso de los agentes bloqueadores neuromusculares de enlaces iónicos que actúan a una velocidad muy grande. Estos tipos de enlace se disocian reversiblemente a temperatura del cuerpo.

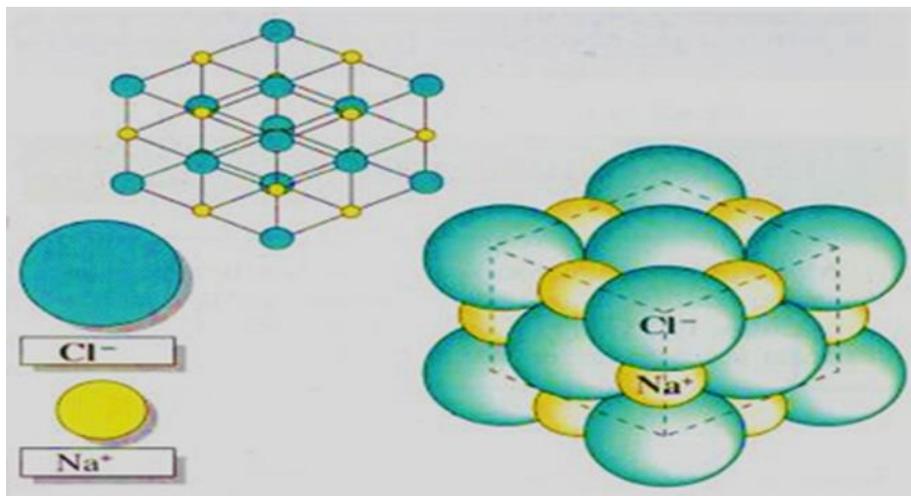


Figura 2. Uniones iónicas. El enlace iónico involucra la formación de un sólido cristalino ordenado, en el que se distribuyen espacialmente los cationes y los aniones siguiendo un patrón similar al de un papel mural, pero dispuestos de manera tridimensional. Tomado de <https://goo.gl/PW1C56>

4.1.1.1.4 Uniones covalentes ¹³

Estos enlaces se forman cuando un mismo par de electrones es compartido por átomos adyacentes y de ellos depende la cohesión de las moléculas orgánicas. Esto no es común en farmacología. Debido a su fuerza y a la dificultad de reversión o de ruptura que los caracteriza, los fármacos con este tipo de mecanismos poseen efecto prolongado. La cloroquina, la dibencilina, los anticolinesterásicos, organofosforados, son ejemplos de sustancias que forman estos enlaces. Estos compuestos tienden a ser tóxicos.

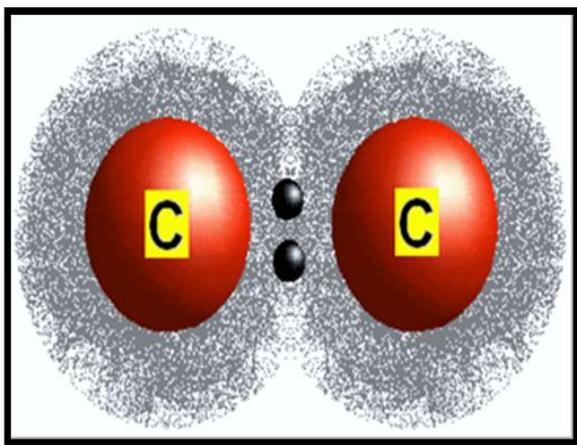


Figura 3. Enlaces químicos covalentes. En este tipo de unión hay un equilibrio estable entre las fuerzas de atracción y repulsión de los átomos, ya que comparten un electrón.

Tomado de <https://goo.gl/N2g6nc>

La localización del lugar de acción de los fármacos, lo que significa en muchos casos la ubicación del receptor sobre el que ejercen su acción, viene determinada por las propiedades físico químicas de la sustancia biológicamente activa. Es fácil comprender que sustancias polares e hidrosolubles, que no pueden atravesar las barreras lipídicas celulares, ejercerán su efecto con mayor probabilidad sobre receptores situados sobre la membrana celular (sustancias endógenas como catecolaminas, acetilcolina y las hormonas peptídicas). Por el contrario, fármacos liposolubles que atraviesan las membranas celulares, tienen su acción en un lugar intracelular (vesículas de secreción, mitocondrias, enzimas solubles) o también en el núcleo o sus ácidos nucleicos.

4.1.1.2 MECANISMOS EFECTORES: TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.^{4,9,13} Una vez unido, un ligando induce una alteración del receptor que propaga la señal al interior de la célula de manera que modifican (inhiben, aumentan) su actividad particular. Los mecanismos efectores permiten que la información que contiene el ligando se traduzca en una respuesta celular. Esta información se denomina transducción de señales y toma muchas formas al interior de la célula.

Los eventos generados por el receptor activado estimulan la actividad catalítica de proteínas destinatarias del citoplasma. Estas proteínas pueden ser activadas directamente por la señal originada en el receptor a través de un efector cuyo producto es una pequeña molécula conocida como segundo mensajero (Figura 4). La actividad de las proteínas destinatarias, estimulada por la unión del ligando o por el segundo mensajero, es alterada por modificaciones covalentes y por cambios posteriores de conformación o número de subunidades.

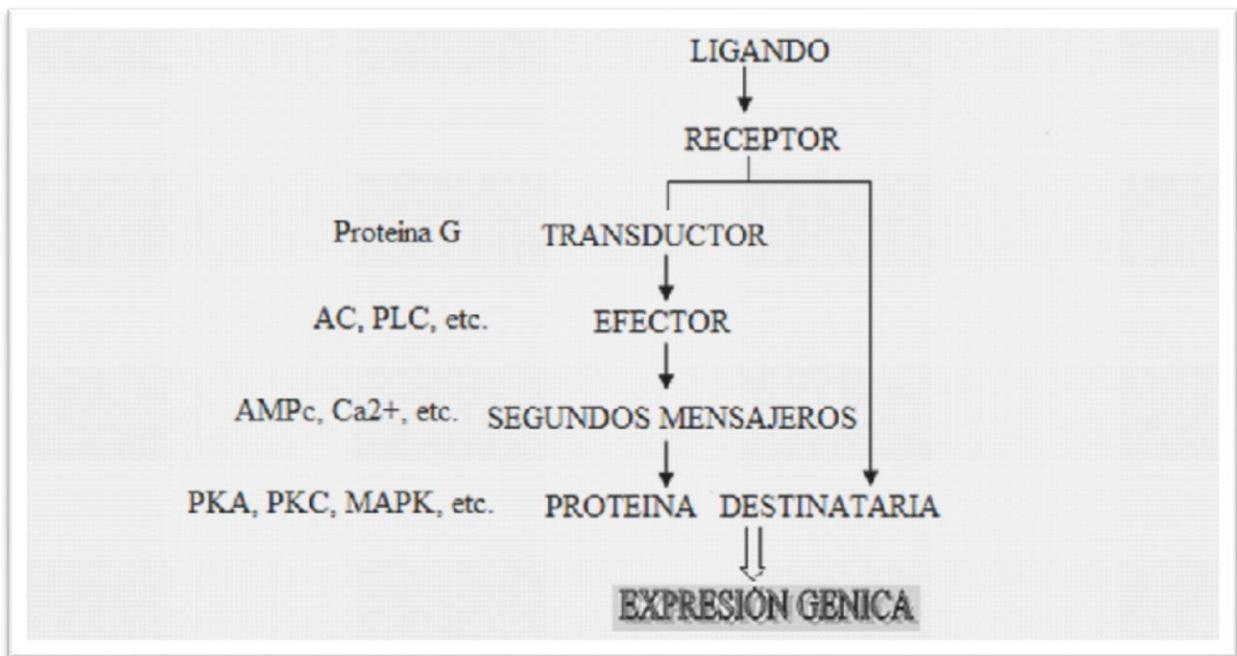


Figura 4. Vías de transducción de señales generadas por la unión del ligando a sus receptores. Tomado de Taleisnik, S. (2006) Receptores celulares y la transducción de señales. Córdoba: Encuentro Grupo Editorial.

4.1.1.3 CONCENTRACIÓN Y OCUPACIÓN DE RECEPTORES.⁴

Las respuestas integradas de células, tejidos y organismos a los ligandos guardan proporción directa con el número de receptores que se ocupa. Así, a mayor el número de receptores ocupados, mayor la respuesta al ligando, hasta el punto en el cual se saturan los mecanismos de señalización celular y no pueden desencadenar acciones adicionales. La probabilidad de que un receptor se ocupe tiene relación directa con su afinidad por el ligando. La concentración del ligando en su sitio de acción controla la ocupación de los receptores y, por último, el efecto que resulta. La dependencia que tienen la ocupación del receptor y las respuestas a la concentración del ligando conforman la base de la relación concentración-respuesta, uno de los principios centrales de la farmacología que fundamenta la actividad de los fármacos.

Las interacciones fármaco-receptor dependen tanto de la concentración como del tiempo y aquí las respuestas se consideran una vez que el sistema alcanzó el equilibrio y la ocupación del receptor es independiente del tiempo. Estas interacciones dependen de la concentración y los incrementos de la concentración del ligando e inducen aumentos en la ocupación del receptor. No sólo eso, sino que la ocupación del receptor es gradual, e incrementos pequeños de la concentración del ligando desencadenan aumentos pequeños de la unión, en tanto los cambios intensos de la concentración producen aumentos significativos en la unión. Por otra parte, la ocupación de los receptores es saturable.

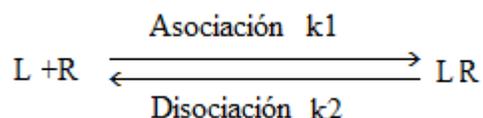
La relación entre afinidad, concentración de fármaco y ocupación de los receptores puede expresarse a través de la constante de disociación en equilibrio (K_d), la concentración del ligando que permite la ocupación de 50% de los receptores en condiciones de equilibrio. La K_d es la expresión directa de la afinidad del complejo ligando-receptor. Cuando la afinidad del complejo ligando-receptor es alta, se requieren concentraciones bajas de ligando para producir ocupación del receptor, y la K_d es baja. Por el contrario, cuando la afinidad del complejo ligando-receptor es baja, se requieren concentraciones altas de ligando para lograr la ocupación del receptor, y la K_d es alta. La K_d es un parámetro único

para cada complejo ligando-receptor. Además, la K_d representa la ocupación de 50% de los receptores.

4.1.2 TEORÍA CUANTITATIVA DE LOS RECEPTORES Y ANÁLISIS DE SCATCHARD.^{14,15}

Clark (1885-1941) aplicó al estudio cuantitativo de la interacción fármaco-receptor y su manifestación mensurable, el efecto farmacológico, la ley de acción de masas, fundando la llamada teoría de la ocupación de los receptores. En ella, la combinación del fármaco con su receptor y su consecuencia, el efecto biológico, son analizados en base al modelo de cinética enzimática desarrollado por Michaelis-Menten, de manera parecida a la unión de un sustrato con la enzima para producir un producto. Así, para el caso de la interacción fármaco-receptor, a mayor el número de receptores ocupados, mayor la respuesta al ligando, hasta el punto en el cual se saturan los mecanismos de señalización celular y no pueden desencadenar acciones adicionales. La probabilidad de que un receptor se ocupe tiene relación directa con su afinidad por el ligando.

Así, si un ligando L se combina con un receptor R:



Donde L es el número de moléculas del ligando, R el número de moléculas del receptor, y LR es el número de receptores ocupados. k_1 indica la constante de velocidad de asociación del complejo ligando-receptor y k_2 , la constante de velocidad de disociación del mismo y en equilibrio estas son iguales.

Para un sistema ligando-receptor que se mueve hacia el equilibrio:



Donde k_1 y k_2 son las constantes de las velocidades de asociación y disminución del complejo respectivamente, y [L] y [R] las concentraciones de ligando y de receptor libres.

Una interacción de alta afinidad significa el predominio de LR es decir que el equilibrio es hacia la derecha o que la constante de equilibrio K es grande, donde

$$K = \frac{[LR]}{[L][R]} = \frac{k_1}{k_2}$$

Y k_1 es más grande que k_2 . En vez de una constante de equilibrio de asociación, la expresión puede ser invertida

$$K_D = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{k_2}{k_1} \quad [1]$$

K_D es la constante de disociación. También es la concentración del ligando que, en equilibrio, produce la ocupación del 50% de los receptores. Si el número total de la concentración de receptores es R_t tendremos que

$$[R] = [R_t] - [RL]$$

Sustituyendo $[R]$ en la ecuación [1] tendremos

$$\frac{[LR]}{[R_t]} = \frac{[L]}{[L] + K_D} \quad \circ$$

$$[LR] = \frac{[R_t] [L]}{[L] + K_D} \quad \circ \quad [LR] = [R_t] \frac{[L]}{[L] + K_D}$$

Graficando esta ecuación se obtiene una hipérbola cuando el eje de ordenadas es $[LR]$ y el de las abscisas $[L]$. (Figura 5 A). Por la representación de Scatchard (Figura 5 B) se puede cuantificar el número de receptores disponibles por la intersección de la recta con el eje de las abscisas $[R]$.

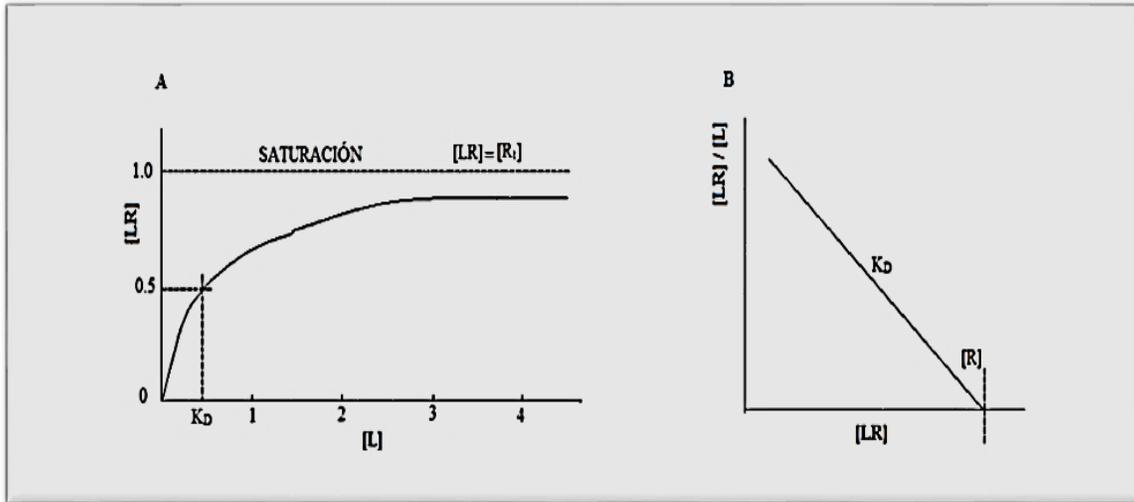


Figura 5. Curvas de saturación. A. concentración del complejo ligando-receptor relativa a la concentración de ligando libre. B. representación de Scatchard. Tomado de Taleisnik, S. (2006) Receptores celulares y la transducción de señales. Córdoba: Encuentro Grupo Editorial.

En estudios realizados sobre receptores, las concentraciones de ligando y las del complejo ligando-receptor pueden cuantificarse, mas no así la concentración total de receptores debido a que los que no presentan unión y se encuentran libres (sin ligandos) se mantienen silentes en el sistema. De ahí que se utilice una extrapolación de las ecuaciones mostradas antes, derivadas por Scatchard, para cuantificar las afinidades entre ligandos y receptores y las densidades de receptores.¹²

Si $\frac{[L][R_T - LR]}{[LR]} = K_D$, entonces

$$\frac{[L][R_T - LR]}{K_D} = [LR]$$

y, después del despeje:

$$\frac{[LR]}{[L]} = \left(\frac{-1}{K_D} \right) [LR] + \frac{RT}{K_D}$$

En su forma más simple una gráfica en que se describa el ligando unido/libre ($[LR]/[L]$) contra el ligando unido ($[LR]$) produce una isoterma lineal con una pendiente negativa de $(-1/K_D)$ y la intersección de X en los valores RT o $U_{m\acute{a}x}$ (figura 6). Debe ser evidente que los complejos ligando-receptor con afinidades altas relacionados ahora con los K_D bajos producen gráficas de Scatchard con pendientes en declive. Por el contrario, los complejos ligando-receptor con afinidades bajas relacionados con K_D elevados producen curvas con pendientes poco marcadas. Por otra parte, la intersección en el eje de las X representa el número máximo de sitios de unión (RT , $U_{m\acute{a}x}$) debido a que se trata del punto teórico en el cual se presenta unión en concentraciones infinitas del ligando, en el cual todos los receptores disponibles deben estar saturados. En condiciones más complejas, los ligandos podrían unirse a más de un receptor o a receptores con más de una condición de afinidad, lo cual produciría gráficas curvilíneas, con pendientes e intersecciones asociadas que representan las interacciones ligando-receptor diversas que las constituyen. El análisis de Scatchard es uno de los métodos estándares para analizar los datos experimentales de unión de receptores, con el objetivo de cuantificar la afinidad de los ligandos y el número de receptores.

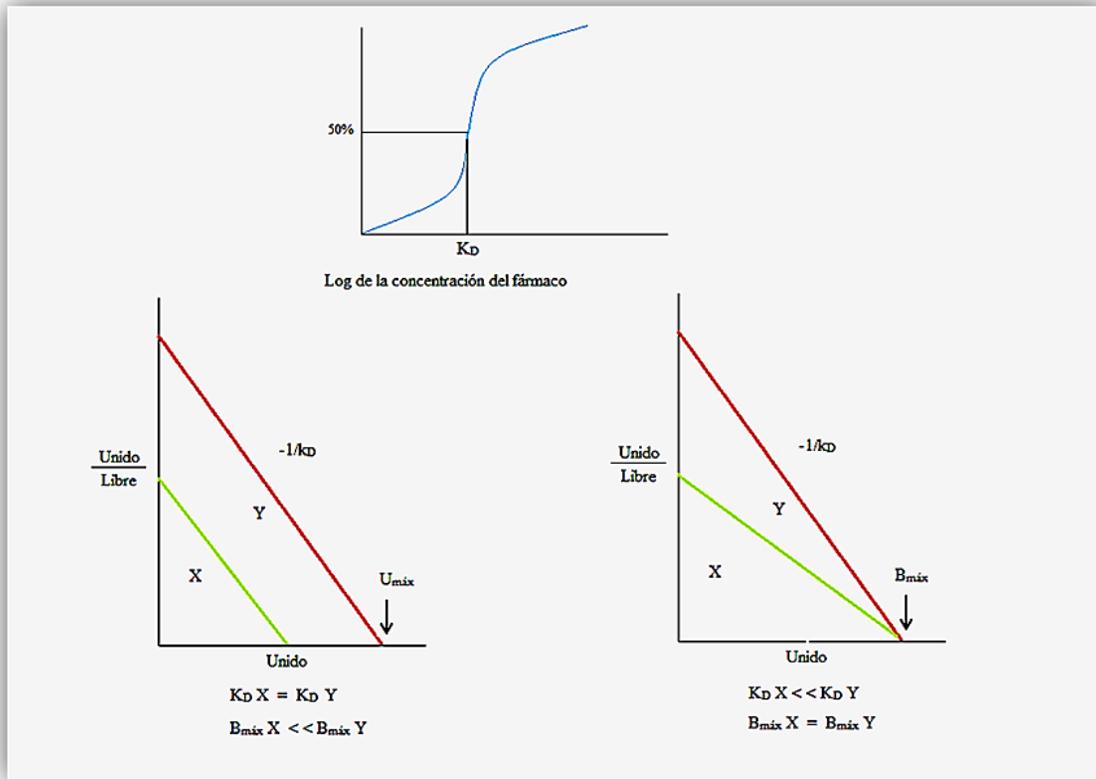


Figura 6. Análisis de Scatchard del equilibrio de las interacciones ligando-receptor. La ocupación del receptor que se cuantifica con concentraciones distintas de ligando, que de manera característica se utiliza para generar trazos concentración-unión (arriba), se aplica para calcular el valor ligando unido/libre (eje Y) que luego se grafica contra ligando libre (eje X). Los trazos que se obtienen tienen una pendiente característica que corresponde a $-1/K_D$, y una intersección en X en el punto $U_{m\acute{a}x}$ o RT. Los ligandos con afinidades idénticas por sus receptores, pero con capacidad de unión máxima distinta, muestran pendientes paralelas (izquierda). Los ligandos que tiene afinidad distinta por sus receptores, pero capacidad de unión máxima idéntica divergen desde una intersección común en el eje de las X (derecha). En el último ejemplo, el ligando Y tiene afinidad mayor por sus receptores respecto del ligando X, lo cual se refleja en una pendiente con inclinación mayor debida a una K_D menor. Tomado de Waldman, S. (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA UNIÓN LIGANDO-RECEPTOR Y EL TIEMPO: CINÉTICA. ^{4,14,15}

La interacción ligando-receptor depende no sólo de las concentraciones de los reactivos, sino también del tiempo (Figura 7). Desde punto de vista cuantitativo, en el momento en que los ligandos y los receptores se mezclan (tiempo 0), todas las moléculas se encuentran libres y no existen complejos. Al transcurrir el tiempo, los ligandos y los receptores se asocian a una velocidad de unión que resulta proporcional a su afinidad y a sus concentraciones respectivas, lo cual refleja las leyes de acción de masas. Al transcurrir un

periodo mayor se acumulan concentraciones de complejo ligando-receptor suficientes para inducir la reacción inversa de disociación. Así, la ocupación de los receptores es la integración en el tiempo de las reacciones de asociación hacia adelante y la disociación hacia atrás. La formación neta de complejos ligando-receptor adquiere su velocidad máxima en los puntos del tiempo más tempranos, cuando la concentración de receptores libres es mayor para permitir la reacción bimolecular en sentido ordinario, pero se vuelve más lenta al transcurrir el tiempo, lo cual refleja la conversión neta de receptores libres en complejos ligando-receptor que inducen la reacción unimolecular opuesta en sentido inverso. Existe un punto en el tiempo en el cual las velocidades de las reacciones en sentido ordinario e inverso son equivalentes, el punto del equilibrio que se describió. En el equilibrio, no existe formación neta de productos o reactivos; no obstante, se trata de un proceso dinámico y las moléculas de ligando y receptor mantienen un intercambio continuo en el estado de equilibrio. En el equilibrio, la ocupación de los receptores es independiente del tiempo.

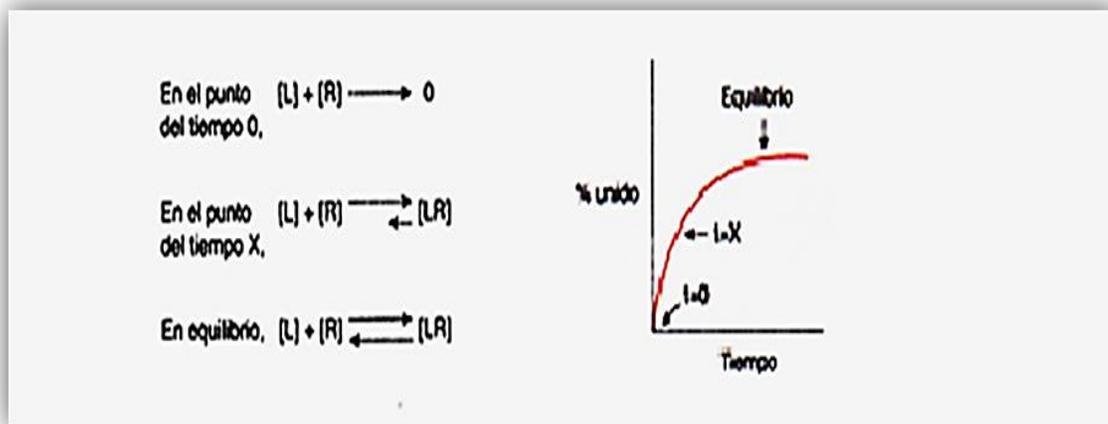


Figura 7. Dependencia del tiempo de las interacciones ligando-receptor. La ocupación de los receptores por el ligando en un fenómeno que depende del tiempo y obedece a las leyes de acción de masas. En el tiempo cero, todas las moléculas de ligando ([L]) y el receptor ([R]) se encuentran libres y predomina la reacción de asociación, lo cual refleja las concentraciones máximas de ambos reactivos. Al tiempo que la reacción avanza (tiempo X), las concentraciones de ligandos y receptores se reducen, lo cual refleja la formación del producto, que son los complejos ligando-receptor ([LR]). La reacción de asociación se vuelve más lenta, lo cual corresponde a una reducción de las concentraciones de los reactivos. Además, existe una velocidad de disociación que corresponde a la acumulación de los receptores unidos, que desencadena la reacción en sentido inverso. Llega un punto en el que no existen más cambios en cuanto a [L], [R] o [LR], lo que representa el equilibrio. Tomado de Waldman, S. (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.2.1.1 Disociación.⁴ Se trata de una reacción unimolecular, que depende sólo de la concentración del complejo ligando-receptor. Es decir, la disociación es un fenómeno de primer orden en el cual la velocidad de pérdida de complejos ligando-receptor depende sólo de su concentración. La representación gráfica lineal revela a un trazo directo de la pérdida de complejos ligando-receptor en el sistema al transcurrir el tiempo. La curva disminuye en forma exponencial y se obtiene un trazo lineal semilogarítmico, característico de un sistema en el que la fracción de la velocidad de pérdida es constante. Esto quiere decir que al pasar el tiempo y presentarse disociación y pérdida de complejos ligando-receptor en el sistema, la velocidad de pérdida de tales complejos se hace más lenta, lo cual refleja que la reacción de disociación depende sólo de la concentración de los complejos ligando-receptor. Mientras la pérdida de complejos se vuelve más lenta al transcurrir el tiempo, la fracción de velocidad de pérdida de los complejos es una constante. Las reacciones de primer orden se caracterizan por una vida media, momento en el cual se pierde 50% de los reactivos de manera independiente al número de complejos que exista. Por ejemplo, si la vida media de éstos es de 5 min, y el número inicial es 100, entonces después de 5 min siguen existiendo 50 complejos, tras 10 min sólo quedan 25, después de 15 min quedan 12.5 complejos, y así, sucesivamente. Sin embargo, si el número inicial de complejos es de 1 000, entonces después de 5 min quedan 500, después de 10 min quedan 250 complejos, y así en lo sucesivo. De esta manera, para cualquier complejo ligando-receptor existe una familia de gráficas lineales logarítmicas paralelas de disociación, con pendientes idénticas. Éstas constituyen el marco característico de la reacción de primer orden (que depende sólo de la concentración de un componente) en tanto la pendiente del trazo semilogarítmico es una medida directa de la constante de la velocidad de disociación (K_D o K_{apag}), y sus unidades de expresión son min^{-1} (Figura 8).

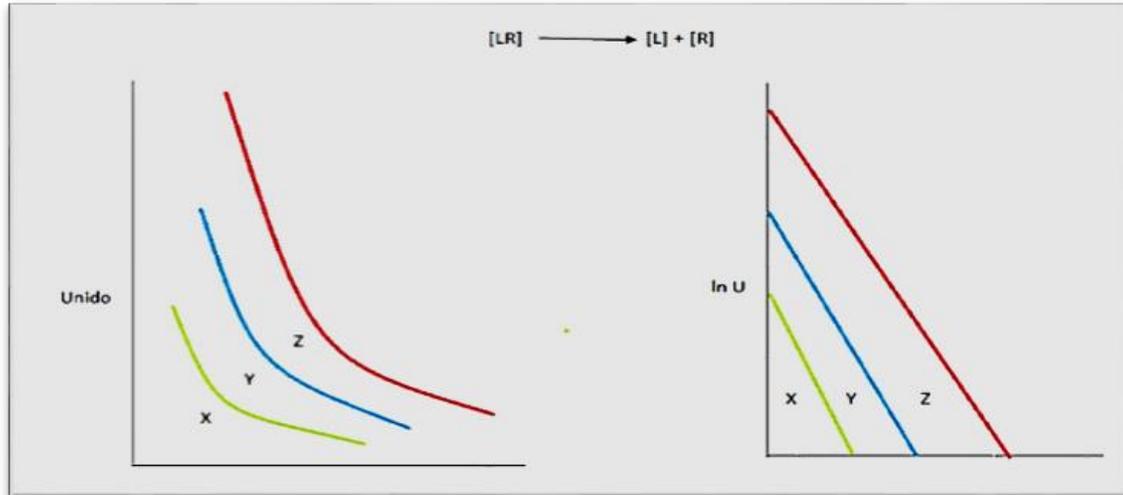


Figura 8. Disociación ligando-receptor. La disociación del complejo ligando-receptor (arriba) es un fenómeno de primer orden, que sólo depende de la concentración del complejo. El curso temporal de la disociación avanza a una velocidad constante de pérdida fraccional con proporción directa a la constante de la velocidad de disociación de primer orden, que se expresa en unidades de min^{-1} . Esto produce isothermas curvilíneas de pérdida de receptores unidos en el sistema al pasar el tiempo (izquierda), que se vuelven lineales cuando se lleva a cabo una transformación logarítmica (derecha). Las pendientes de los trazos lineales logarítmicos representan $-1/K_D$, y una familia de isothermas paralelas a las reacciones de disociación que se inician con distintas concentraciones de complejos ligando-receptor, todas con constantes de velocidad de disociación idénticas. Tomado de Waldman, S. (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.2.1.2 Asociación.⁴

La reacción de asociación es bimolecular, depende de la concentración del ligandos y receptores libres, y como tal corresponde a una reacción de segundo orden. Existe un fenómeno de segundo orden y los cambios de la concentración del ligando alteran la velocidad aparente de asociación. Esto da por resultado una familia de isothermas de asociación, que reflejan la formación creciente de complejos ligando-receptor ante diferentes concentraciones del ligando (Figura 9 izquierda). Todas estas curvas alcanzan una meseta después de transcurrido un tiempo del cual ya no se presenta ocupación adicional de receptores, lo cual refleja el equilibrio para esa concentración específica de ligandos. Es importante entender que la ocupación de los receptores que se representa por medio de la meseta de estas curvas para cada concentración del ligando, representa la ocupación de los receptores específica para esa concentración de ligando sobre las curvas concentración-unión en equilibrio que se analizan antes (Figura 9 derecha). Por ejemplo, el curso temporal de asociación que se obtiene a partir de la concentración K_D de ligandos define una meseta que representa la ocupación de 50% de los receptores. De manera similar, el curso temporal

de asociación con una concentración del ligando que es 100 veces mayor que la K_D produce una meseta que representa una ocupación cercana a 100% o la saturación. Las reacciones pueden expresarse de manera gráfica como la velocidad de formación de receptores ocupados, o la pérdida de receptores libres al transcurrir el tiempo (Figura 10). Aquí, la pérdida de receptores libres se calcula mediante la sustracción del número de receptores ocupados en un momento específico a partir del número máximo de receptores que pueden ocuparse cuando existe equilibrio con esa concentración específica de ligando ($[U_e - U]$). Las reacciones de asociación se llevan a cabo con concentraciones crecientes de ligando producen registros con pendientes cada vez mayores, que reflejan la naturaleza de segundo orden de estas reacciones.

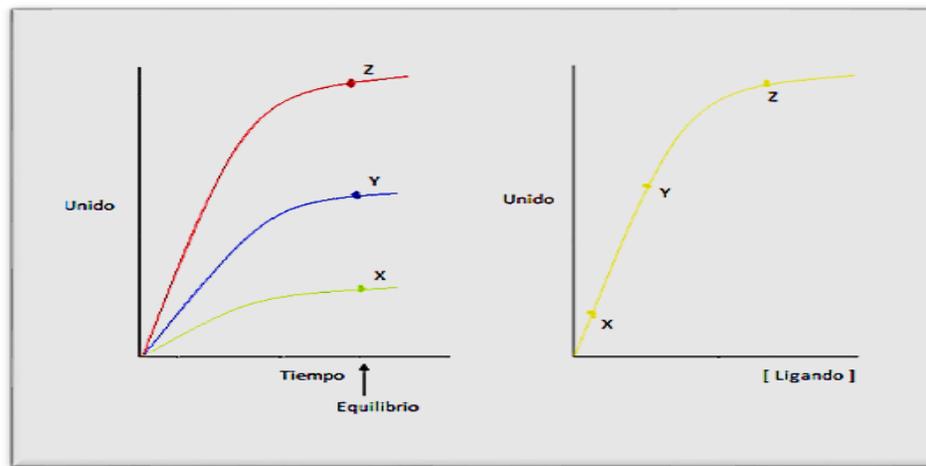


Figura 9.Curso temporal de la asociación de ligandos y receptores. La reacción de asociación es bimolecular, depende de la concentración del ligandos y receptores libres, y como tal corresponde a una reacción de segundo orden. Debido a que el ligando de ordinario se encuentra en exceso franco respecto de los receptores, la unión no influye sobre las concentraciones del primero y, en consecuencia, estas reacciones son de seudoprimer orden respecto de la concentración de los receptores. Por otra parte, la velocidad de asociación que se observa refleja la integración de las reacciones hacia adelante e inversa. Cada concentración inicial de ligando establece un curso temporal de asociación específico, con una velocidad proporcional a la concentración del ligando, una meseta que representa el equilibrio específico para esa concentración de ligando (izquierda), Las concentraciones de ligando menores a la K_d (X) tienen como consecuencia un curso temporal más lento de asociación que alcanza el equilibrio cuando la ocupación de los receptores es menor de 50%. Si esta reacción se inicia con la concentración de K_d del ligando (Y), entonces la velocidad de asociación es mayor y en el equilibrio se encuentran ocupados 50% de los receptores. Si la reacción se inicia con una concentración de ligando que excede la K_d , entonces la velocidad de asociación es máxima y en el equilibrio todos los receptores se saturan ($U_{máx}$). Es importante reconocer aquí que las reglas de meseta de los cursos temporales para las reacciones de asociación representan el equilibrio, momento en que la ocupación de los receptores se vuelve independiente del tiempo, éstas representan puntos independientes que definen la curva concentración-unión (derecha). Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

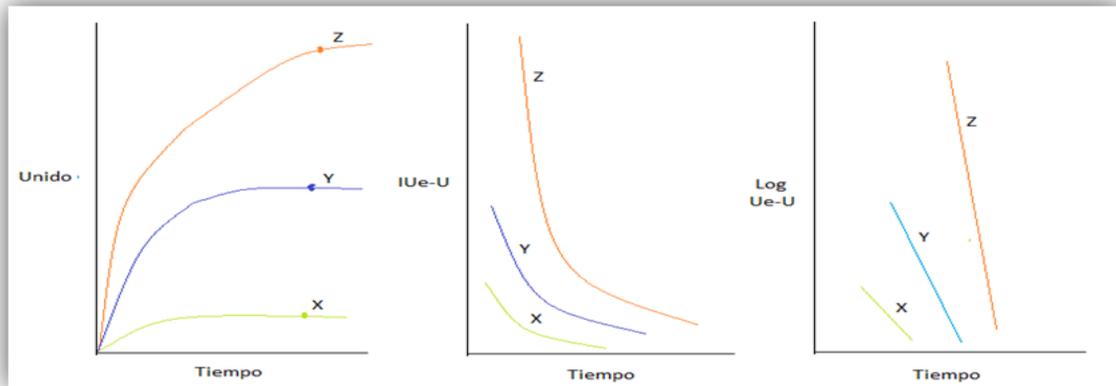


Figura 10. Velocidad de asociación observada. Curso temporal de la formación de complejos ligando-receptor con tres concentraciones distintas de ligando que se llevan hasta el equilibrio (izquierda). La asociación puede cuantificarse como la pérdida de receptores libres en el sistema ($U_e - U$), en donde U_e corresponde a la ocupación de los receptores en el equilibrio con una concentración específica del ligando y U representa la fracción de receptores unidos en un momento específico. La asociación ante concentraciones distintas de ligando produce trazos independientes de pérdida de receptores libres (centro), que una vez transformados en valores logarítmicos producen trazos lineales con pendientes distintas (derecha), que reflejan la dependencia de la concentración y la naturaleza de segundo orden de la reacción. Por otra parte, la asociación es una reacción híbrida, que integra las contribuciones tanto de las reacciones en sentido ordinario como aquellas en sentido inverso. Así, las pendientes de los trazos logarítmicos lineales representan la constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) de pseudoprimer orden específica de la concentración, más que la de constante de velocidad de segundo orden verdadera (k_{aso}). Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.2.1.3 Cuantificación de la asociación.⁴

La pendiente de un trazo semilogarítmico de asociación constituye una medida de la velocidad de formación del producto ($[U]$) o la desaparición del reactivo ($[U_e - U]$). Se trata de una relación lineal debido a que cuando existe una concentración fija del ligando, la velocidad de formación de los complejos ligando-receptor depende de la cantidad de receptores libres que siguen existiendo. Así, esta reacción es una de pseudo primer orden. A diferencia de las reacciones de disociación, la pendiente en este caso no es equivalente a la constante de la velocidad de asociación. Esto es así debido a que la constante verdadera de la velocidad de asociación es independiente de la concentración del ligando; no obstante, la velocidad de asociación en el sistema depende de la concentración del ligando. La unión con tres concentraciones distintas del ligando da como resultado trazos semilogarítmicos con tres pendientes distintas. La velocidad de formación del producto en

este sistema no sólo refleja la asociación. Al tiempo que progresa la reacción y se acumula el producto existe una cantidad mensurable de disociación, que influye sobre la cantidad de producto que se forma. Así, la pendiente de una gráfica semilogarítmica de asociación corresponde a K_{obs} , que se expresa como min^{-1} . La relación de esta constante con la constante de la velocidad de asociación es

$$K_{obs} = [L]K_{aso} + K_{diso}$$

Ésta es la ecuación que describe la velocidad híbrida de asociación. Incluye tanto las velocidades de reacción hacia adelante como hacia atrás.

Relación entre la ocupación cinética y en equilibrio del receptor. ^{4,14,15}

Las constantes de velocidad de asociación y disociación son medidas de la afinidad de los ligandos y sus receptores. Así, una K_{aso} elevada refleja una obtención acelerada de receptores unidos, en tanto una K_{diso} baja refleja a una disociación pobre de receptores unidos, lo cual sugiere una afinidad alta. Por el contrario, una K_{aso} baja refleja una obtención deficiente de receptores unidos, en tanto una k_{diso} alta corresponde a la disociación rápida de los complejos ligando-receptor, y sugieren afinidad baja. Estas constantes cinéticas se relacionan con la medición en equilibrio de la afinidad (K_D) de la manera siguiente:

$$K_D = \frac{k_{diso}}{k_{aso}}$$

4.1.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA OCUPACIÓN DEL RECEPTOR EN EL TIEMPO^{14,15}

El número de receptores ocupados tiene relación directa con los efectos que se producen, tanto terapéutico deseable como adverso e indeseable. Se mostró la forma en que se determina la proporción o número de receptores ocupados dada una concentración específica de ligando en equilibrio. Es más frecuente que ocurran interacciones ligando-receptor bajo condiciones distintas al equilibrio. ¿Cómo se calcula el número o proporción

de receptores ocupados cuando las condiciones no son de equilibrio? Esto se determina con la relación que se demostró antes para la velocidad observada de formación de complejos ligando-receptor. Como se describe, se trata de un fenómeno exponencial, que considera tanto las reacciones hacia adelante e inversa como la concentración del ligando y el momento en el cual se hace la observación. Así, el número de receptores unidos o la proporción de receptores unidos totales en el momento t es:

$$\text{Unidos} = U_{\text{equilibrio}} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t})$$

$$\text{Fracción de ocupación} = \frac{\text{Unidos}}{U_{\text{max}}} = \frac{U_{\text{equilibrio}} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t})}{U_{\text{max}}}$$

$U_{\text{equilibrio}}$ se calcula con la ecuación de unión de equilibrio. U_{max} se determina a partir del análisis de unión en equilibrio con el método de Scatchard.

4.1.3 TERAPÉUTICA Y RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA.⁴

Las relaciones cuantitativas y cualitativas del comportamiento de los receptores respecto de la concentración del ligando y el tiempo son los principios que fundamentan la conducta de los fármacos en el ser humano. Los efectos de los fármacos guardan relación directa con la ocupación de los receptores. Así, en el equilibrio, la intensidad de los efectos de éstos puede representarse mediante gráficas como en la Figura 11. En ella, la concentración del fármaco que produce 50% de la respuesta máxima corresponde a la concentración efectiva 50 (CE_{50}) que es análoga a la K_D . La respuesta máxima que se produce con la saturación por la ocupación de 100% de los receptores ($U_{\text{máx}}$) corresponde al efecto máximo o $E_{\text{máx}}$. A partir de una analogía con la relación concentración-unión, la intensidad de los efectos de un fármaco pueden cuantificarse como:

$$\text{Intensidad del efecto} = \frac{[\text{fármaco}] [E_{\text{máx}}]}{CE_{50} + [\text{fármaco}]}$$

Éste es el modelo de $E_{m\acute{a}x}$, que relaciona la concentración de un fármaco con un efecto farmacológico y cuenta con todos los atributos clásicos del modelo ligando-receptor, que incluyen la dependencia de la concentración o la dosis, así como ser graduales y saturables.

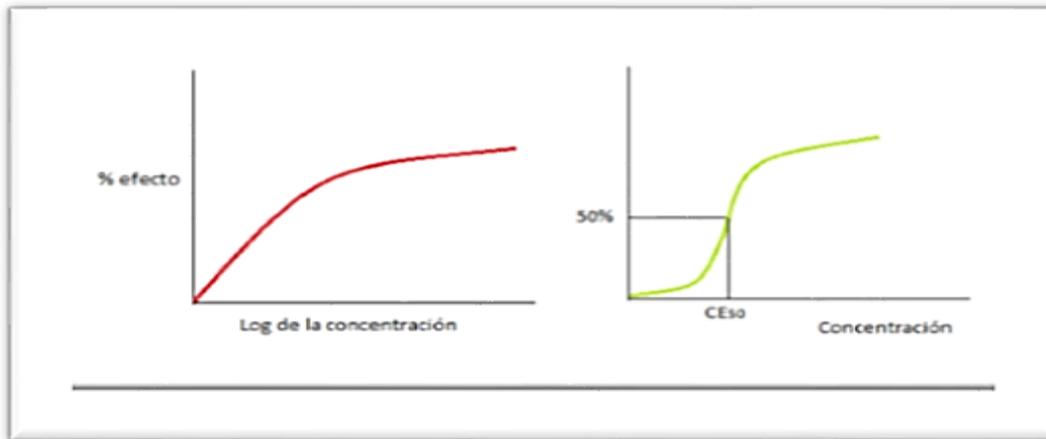


Figura 11. Dependencia de la concentración de las respuestas a fármacos. La dependencia de la concentración de las respuestas a los fármacos en parte refleja la ocupación de receptores afines. Así, la relación concentración-respuesta muestra características análogas a las que tienen las interacciones ligando-receptor. De hecho, las respuestas a fármacos dependen de la concentración, son graduales y saturables ($E_{m\acute{a}x}$), lo cual refleja la ocupación de todos los receptores disponibles. Estas relaciones pueden esquematizarse en una gráfica de Michaelis-Menten (derecha) o como una gráfica línea logarítmica (izquierda). La concentración de un fármaco que produce la mitad de la respuesta máxima se denomina CE_{50} . Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA RELACIÓN CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LOS FÁRMACOS.⁴

Los efectos que produce un fármaco dependen de su capacidad para unirse al receptor y activar los mecanismos efectores.



En cuanto a la categoría general de las interacciones ligando-receptor, los dominios estructurales del fármaco y el receptor que median la inducción de los mecanismos efectores pueden separarse y diferir de los que median la unión (de nuevo, la importancia de la estructura en cuanto a la actividad). Así, es posible concebir fármacos que tienen buena unión con sus receptores, pero que activan de manera deficiente a los mecanismos

efectores o no lo hacen en absoluto. Esta capacidad de unirse a su receptor para activar de manera diferencial un mecanismo efector distal corresponde a la actividad intrínseca. La actividad intrínseca corresponde a la propiedad de un fármaco que determina el grado de efecto biológico que produce cada complejo fármaco-receptor que se forma. Dos agentes que se combinan con grupos equivalentes de receptores podrían no inducir grados idénticos de efecto, incluso si los se administran en sus dosis máximas eficaces; los agentes difieren en cuanto a la actividad intrínseca, y el que produce el efecto máximo más intenso posee la actividad intrínseca mayor. Al igual que para la afinidad, la actividad intrínseca depende de las características fisicoquímicas tanto del fármaco como del receptor, pero actividad intrínseca y afinidad pueden variar por los cambios que sufre la molécula del fármaco.

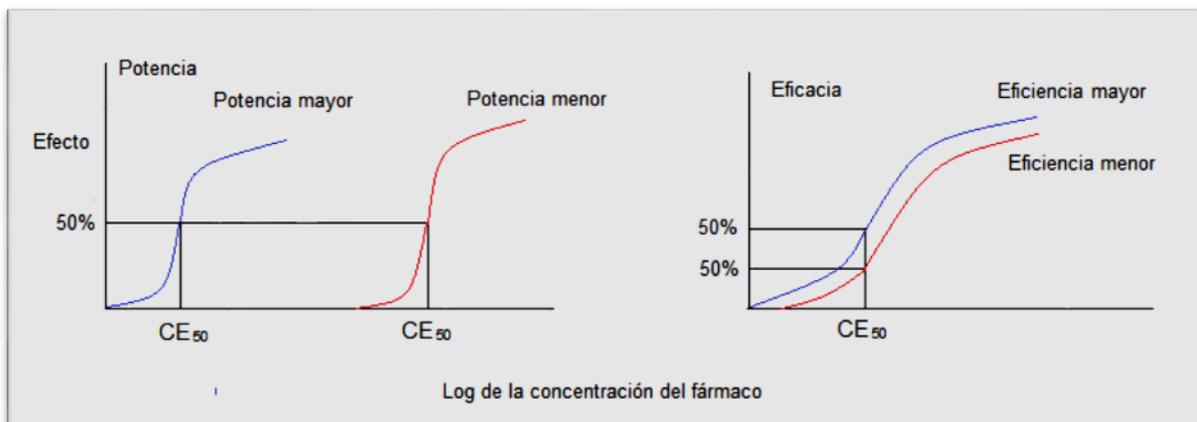


Figura 12. Potencia y eficacia. Los fármacos inducen sus respuestas de una manera dependiente de la concentración, gradual y saturable. El término potencia se refiere a las concentraciones de ligando que se requieren para dar un efecto. Se necesitan concentraciones menores de los ligandos con más potencia para producir los mismos efectos que los ligandos con menos potencia. Esta característica guarda relación con la afinidad del ligando por su sitio de unión en el receptor. La eficacia se refiere a la capacidad cuantitativa de un fármaco para producir un efecto biológico. Los fármacos más eficaces producen efectos biológicos mayores que aquéllos con menos eficacia que se unen al mismo receptor. Esta característica se relaciona con la actividad intrínseca de la sustancia y su capacidad para activar los mecanismos efectores una vez que se une a su receptor. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

Potencia se refiere a las concentraciones del ligando que se requieren para desencadenar un efecto. Se necesitan concentraciones menores de los ligandos con potencia mayor para obtener el mismo efecto que producen otros con menos potencia. Esta característica tiene

afinidad del ligando por el sitio de unión en su receptor. Eficacia se refiere a la capacidad cuantitativa de un fármaco para producir un efecto biológico. Los fármacos más eficaces producen efectos biológicos mayores que los que tienen menos eficacia y que se unen al mismo receptor, esta característica se vincula con la actividad intrínseca de la sustancia y su capacidad para activar los mecanismos efectores una vez que se une al receptor. Potencia y eficacia son parámetros independientes, y los fármacos pueden tener eficacia máxima, pero mostrar potencia baja. Si se conjuntan estos conceptos, la capacidad de un fármaco para producir un efecto puede definirse utilizando el modelo $E_{m\acute{a}x}$:

$$\text{Intensidad del efecto} = \frac{(e) [\text{Fármaco}] [E_{m\acute{a}x}]}{CE_{50} + [\text{Fármaco}]}$$

donde el término e se incorpora para expresar la actividad intrínseca del fármaco unido al receptor. En este modelo potenciado de acción farmacológica, la capacidad de un fármaco para inducir un efecto fisiológico depende de la ocupación de su receptor, que corresponde a $[\text{fármaco}]$ y K_D , y la capacidad intrínseca de esa sustancia para activar los receptores una vez que se une (e).

4.1.3.2 DINÁMICA DE LOS RECEPTORES Y RELACIÓN CONCENTRACIÓN-RESPUESTA.⁴ Hasta este punto, la relación entre ocupación de los receptores y respuesta sea considera algo simple: una molécula del ligando ocupa un receptor, que produce una respuesta proporcional al número total de receptores ocupados. En ese modelo, una ocupación de 50% de los receptores produce 50% de la respuesta máxima. Sin embargo, en el mundo real la relación concentración-respuesta en pocas ocasiones es tan directa. Más bien, la respuesta que induce un ligando a una concentración específica, refleja las dinámicas del receptor y las características complejas del acoplamiento de los receptores con sus efectores distales.

4.1.3.2.1 Dinámica de los receptores.^{16,17,18}

Las células tienen la habilidad para responder a su medio ambiente mediante la regulación dinámica del número de receptores disponibles para los ligandos. Por ejemplo, en la insuficiencia cardíaca, situación que se relaciona con un estado hiperadrenérgico para mantener el gasto cardíaco, los cardiomiocitos responden en forma dinámica a la sobreestimulación que ejercen los ligandos adrenérgicos, mediante una regulación negativa de sus receptores β -adrenérgicos. La regulación negativa tiene mecanismos moleculares que median la desensibilización y la internalización de los receptores (Figura 13). La fosforilación por acción de la cinasa de receptores β -adrenérgicos estimulados por ligandos determina su desensibilización; esa enzima pertenece a la familia de las cinasas de receptores acoplados a proteína G. La fosforilación de los receptores β -adrenérgicos induce la unión de la β -arrestina a los residuos fosforilados, con lo que bloquea su capacidad para tener interacción productiva con las proteínas G heterotriméricas y activarlas, lo que en esencia hace que estos receptores se inactiven (se desensibilicen). La unión de β -arrestina desencadena la endocitosis y el secuestro de los receptores fosforilados, que los elimina de la superficie celular y les hace inaccesibles. El resultado neto de esta regulación dinámica es la reducción del número de receptores disponibles para interactuar con agonistas adrenérgicos en cada cardiomiocito. La regulación negativa disminuye la respuesta máxima que se produce por efecto de ligandos adrenérgicos en esas células, lo que corresponde a la reducción del número de unidades de respuesta, y hace a las células insensibles a la estimulación adrenérgica (Figura 13). Estos efectos de desensibilización de los receptores β -adrenérgicos, que interfiere con los efectos inotrópicos positivos de las catecolaminas endógenas que pueden ser benéficas en la insuficiencia cardíaca, se revierten mediante el tratamiento con antagonistas de los mismos receptores, que bloquean su desensibilización por ligandos endógenos. Por el contrario, las células pueden inducir una regulación positiva dinámica de su complemento de receptores específicos, para aumentar su sensibilidad a los ligandos. Las células crean receptores de reserva, de los que se requiere la participación de cierta parte de las unidades disponibles para la lograr una respuesta máxima. Los receptores de reserva modifican la potencia aparente del ligando sin alterar su eficacia

máxima (Figura 14). Si se requieren 100 receptores para inducir la participación máxima de los efectores distales, entonces las concentraciones K_D del ligando producen 50% del efecto máximo al ocupar 50 receptores (Figura 15). Sin embargo, si la célula produce 400 receptores de reserva, de tal manera que ahora se dispone de 500 para ser ocupados, entonces concentraciones de ligando 10 veces menores que la K_D permiten la ocupación de 50 receptores e inducen 50% de la respuesta máxima, una ganancia de 10 veces en sensibilidad. Por otra parte, si la célula produce 4 900 receptores de reserva, de tal manera que dispone de 5 000 receptores para ser ocupados, las concentraciones de ligando cercanas a 1/100 de la K_D permiten la ocupación de 50 receptores y producen 50% de la respuesta máxima, una ganancia de 100 veces en sensibilidad. Estas consideraciones resaltan el concepto de que las células no son receptoras pasivas de las señales que aportan los ligandos. Más bien se trata de unidades dinámicas que reaccionan a su medio para ajustar su sensibilidad y respuestas a las señales externas. El modelo que describe la capacidad de un fármaco para producir un efecto puede refinarse aún más:

$$\text{Intensidad del efecto} = \frac{(f) (e) [\text{Fármaco}] [E_{\text{máx}}]}{CE_{50} + [\text{Fármaco}]}$$

donde f se incorpora para reflejar la amplificación de la potencia obtenida mediante receptores de reserva.

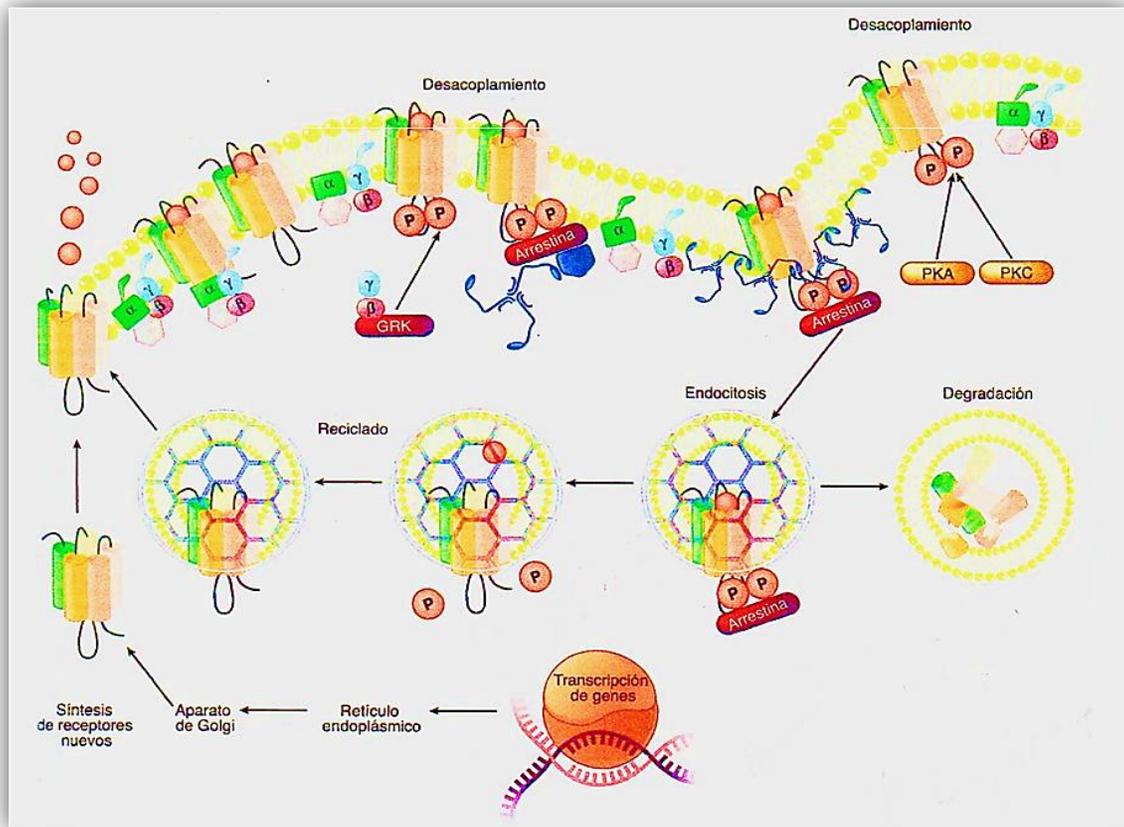


Figura 13. Dinámicas del receptor acoplado a proteínas g. La regulación de la señalización mediada por el receptor acoplado a proteínas G depende de mecanismos que establecen el número y la capacidad de respuesta de los receptores en la superficie celular. Así, el desacoplamiento de los receptores es un resultado de la fosforilación del receptor ocupado por un agonista, mediada por la cinasa de receptores acoplados a proteínas G (GRK), que promueve la unión de la arrestina al receptor fosforilado e inhibe las interacciones receptor-proteína G. La unión de la arrestina al receptor también inicia la internalización de los receptores hacia foseetas cubiertas con clatrina, después de lo cual los receptores pueden desplazarse hacia los lisosomas para degradarse, o desfosforilarse y reciclarse una vez más hacia la membrana plasmática. (Tomado de Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res* 2003; 4:2.)

4.1.3.2.2 Acoplamiento receptor-efector y factor de conformación.⁴ Más allá del número de receptores funcionales de que se dispone, las respuestas al ligando reflejan la suma de diversas reacciones en serie y paralelo que se desencadenan a partir de las interacciones ligando-receptor en muchos tejidos del organismo. En un sistema de respuesta que muestra relación lineal entre ocupación y respuesta fisiológica, existe una proporcionalidad directa entre grado de activación del receptor y generación de segundos mensajeros. Esto

puede conceptualizarse como la ocupación baja del receptor que estimula incremento ligero de la concentración de segundo mensajero, que induce incremento leve de respuesta fisiológica. En realidad, un grado bajo de ocupación de receptores genera incrementos grandes de la concentración de segundos mensajeros que, a su vez, generan respuestas fisiológicas mayores. Las señales amplifican en cada paso, de manera que transforman una ocupación modesta de los receptores en una respuesta fisiológica magnificada. Debido a que la respuesta general es la suma e integración de las reacciones amplificadas, el perfil de la curva concentración-respuesta puede variar para reflejar su desviación de los modelos de efecto lineales de ocupación de receptores hacia modelos no lineales receptor-efector. Los segmentos de la curva concentración-respuesta incluyen la fase lineal inicial, la fase lineal logarítmica de 20 a 80%, y la fase de meseta (Figura 16). En la fase inicial, existe un incremento lineal de la respuesta al tiempo que la concentración del fármaco se incrementa. En la fase lineal logarítmica, que comprende los valores intermedios a 20 y 80%, existe una relación directa entre logaritmo de concentración del fármaco y efecto. En la fase de meseta existe poca modificación del efecto ante cambios intensos de la concentración del fármaco, lo cual corresponde a la saturación de los receptores del sistema. La fase media de la curva concentración-respuesta, ubicada entre 20 y 80% se mantiene lineal en un intervalo de incrementos de la concentración de hasta 16 veces. A pesar de esto, la respuesta integrada a un fármaco puede ser más “rápida”, así las respuestas muestran aumentos mayores por modificación de la concentración del fármaco (factor de conformación mayor; Figura 17). Las respuestas pueden ser “más lentas”, de tal manera que muestran incrementos menores por grado de modificación de la concentración del fármaco (factor de conformación menor). La mayor parte de los fármacos tiene un factor de conformación de entre 1 y 3. Cuando el factor de conformación (γ) = 1, entonces la relación semilogarítmica es lineal entre 20 y 80% en un intervalo de 16 aumentos de la concentración.

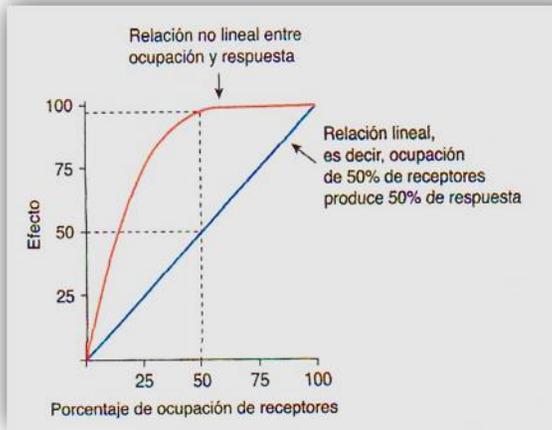
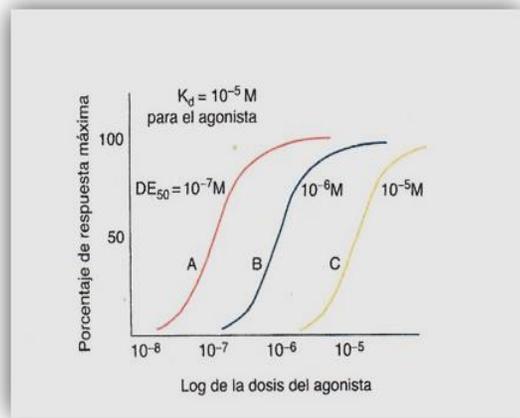


Figura 14. Receptores de reserva. En la mayor parte de los sistemas, la relación entre ocupación del receptor y respuesta no es lineal, sino una función de la ocupación de los receptores. Esta función se representa como una curva hiperbólica, que demuestra que sólo una fracción, aquí 50% de los receptores requiere ser ocupada para producir una respuesta máxima. Esta relación hiperbólica entre ocupación y respuesta sugiere que una fracción de receptores es de reserva, y se encuentran en exceso de los requeridos para obtener una respuesta completa. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno

Figura 15. Impacto de los receptores de reserva sobre la relación dosis-respuesta. a. Una correspondencia uno a uno entre la ocupación de los receptores y la respuesta indica que existen pocos receptores de reserva. b. Un incremento de cinco veces el número de receptores en el sistema produce un aumento de 10 veces en la respuesta a esa dosis. c. Un incremento de 50 veces los receptores produce un aumento de 100 veces en la respuesta a esa dosis. DE50, dosis del agonista que produce 50% de las respuestas máximas. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno



Cuando $\gamma = 2$, entonces la relación semilogarítmica es lineal entre 20 y 80% en un intervalo de cuatro aumentos de la concentración. Cuando $\gamma = 0.5$, entonces la relación semilogarítmica es lineal entre 20 y 80% en un intervalo de 256 aumentos de la concentración.

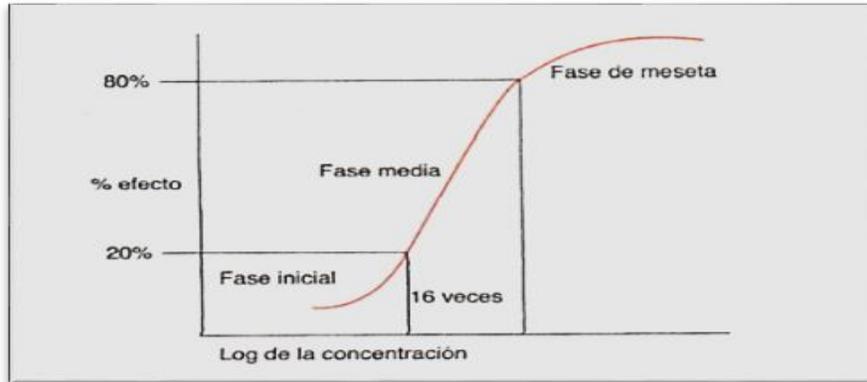


Figura 16. Curvas concentración-respuesta. Los segmentos de una curva concentración-respuesta incluyen una fase lineal inicial, la fase logarítmica lineal ubicada entre 20 y 80%, y la fase de meseta. En la fase inicial, existe incremento lineal de la respuesta al tiempo que la concentración del fármaco aumenta. En la fase lineal logarítmica, que incluye los valores ubicados entre 20 y 80%, hay relación directa entre el logaritmo de la concentración del fármaco y su efecto. En la fase de meseta existe poco cambio del efecto a pesar de modificaciones intensas de la concentración del fármaco, lo cual refleja la saturación de los receptores del sistema. De manera característica, la fase intermedia de la curva concentración-respuesta, entre los valores 20 y 80%, mantiene un trazo lineal; no obstante, las concentraciones aumenten 16 veces. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

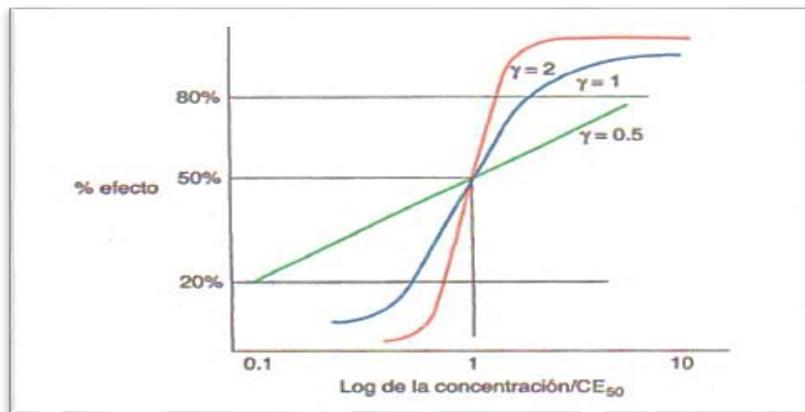


Figura 17. Factor de configuración del trazo. La respuesta integrada a un fármaco puede ser “rápida”, y reflejar una amplificación intensa del acoplamiento receptor-efector, que produce respuestas con aumentos grandes por cada cambio de la concentración de la sustancia (factor de configuración mayor). De manera alternativa, las respuestas pueden ser “más lentas” y reflejar un acoplamiento ineficiente receptor-efector o una amplificación baja de las señales distales, que produce respuestas que muestran incrementos menores por cada cambio en la concentración del fármaco (factor de configuración menor). Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno.

4.1.3.3 RELACIÓN ENTRE INTENSIDAD Y CURSO TEMPORAL DE LOS EFECTOS DE UN FÁRMACO.⁴

La intensidad del efecto en cualquier momento corresponde al número de receptores ocupados, lo cual es una función de la concentración de fármaco a la que los receptores se encuentran expuestos y del tiempo de exposición. Sin embargo, la concentración de éste en el suero es una función de varios mecanismos farmacocinéticos, que incluyen absorción, distribución, metabolismo y excreción. Después de que se alcanzan las concentraciones máximas de un fármaco su concentración en suero disminuye con un curso temporal exponencial clásico. Esta declinación caracteriza a los fenómenos de primer orden, como la disminución de la concentración del fármaco en suero a una fracción constante por unidad de tiempo. La gráfica semilogarítmica para este fenómeno produce un trazo lineal con una pendiente que corresponde a la constante de la velocidad de eliminación (K_{elim} ; Figura 18). Esta constante se vincula con la vida media del fármaco a partir de esta relación: $K_{elim} = 0.693/t_{1/2}$ Así, el curso temporal de la intensidad del efecto de un fármaco depende de la velocidad de disminución del mismo en el sistema (K_{elim} ; $t_{1/2}$), y de las características de unión de la sustancia y su receptor (Figura 19). Si la concentración del fármaco se ubica en la región 3 (Figura 19), los receptores se encuentran saturados y cambios discretos de la concentración del fármaco ejercen efectos mínimos sobre la intensidad del efecto. Si la concentración del fármaco está en la región 2, la intensidad del efecto es proporcional al logaritmo de la concentración. Si la concentración del fármaco se ubica en la región 1, entonces la intensidad del efecto guarda proporción directa con la concentración de la sustancia.

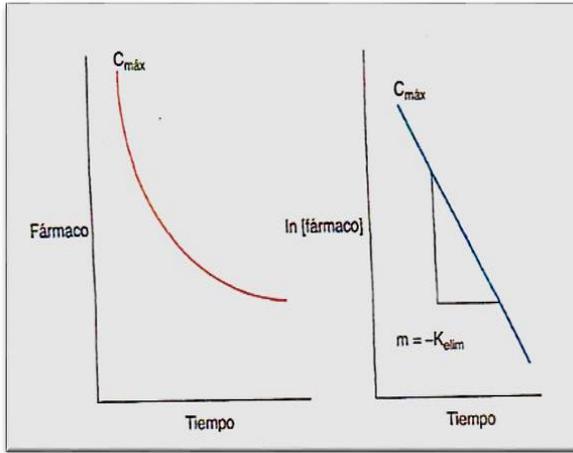


Figura 18. Curso temporal de la eliminación de los fármacos de la circulación. La concentración de un

fármaco en el suero refleja los mecanismos farmacocinéticos, que incluyen absorción, distribución, metabolismo y excreción. Después de que se alcanzan las concentraciones máximas de un fármaco, su valor en el suero declina de manera exponencial al avanzar el tiempo (izquierda): esta reducción es de primer orden y la concentración del fármaco en el suero disminuye como una fracción constante por unidad de tiempo. La gráfica semilogarítmica que muestra este fenómeno (derecha) permite obtener un trazo lineal con una pendiente que corresponde a la constante de velocidad de eliminación (K_{elim}). Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno

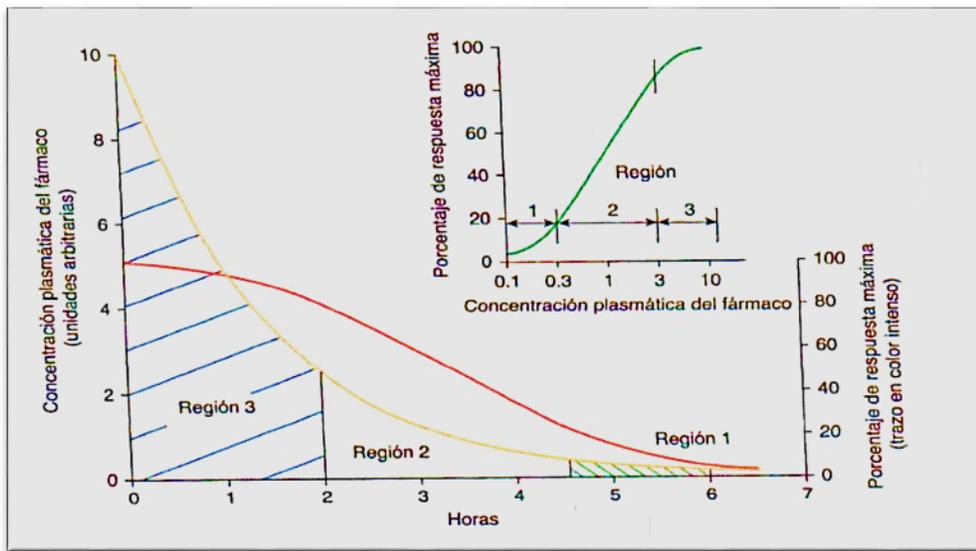


Figura 19. Intensidad y curso temporal de los efectos de los fármacos. La declinación de la intensidad de un efecto farmacológico al transcurrir el tiempo después de la administración de una dosis alta, tiene tres partes que corresponden a tres regiones de la curva concentración sigue siendo casi máxima no obstante una disminución de 75% de la concentración del fármaco, lo cual se debe a la saturación de los receptores en esas concentraciones y el carácter de orden cero del fenómeno. En la región Z, la intensidad de la respuesta disminuye de manera lineal al transcurrir el tiempo por su declinación lineal logarítmica en el suero, así como a la relación lineal logarítmica de las respuestas y la concentración del fármaco en esta región. En la región 1, las respuestas son paralelas a la disminución de la concentración del fármaco en el suero, lo cual refleja la relación lineal entre la concentración de la sustancia y las respuestas a esas concentraciones. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno

4.1.4 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS A LOS RECEPTORES DE LOS FÁRMACOS^{9,17,19}

Los agonistas son agentes que se unen a los receptores simulando la función de los ligandos naturales, ocupan los receptores y activan mecanismos efectores distales, con lo que inducen una respuesta. Los agonistas convencionales incrementan la proporción de receptores activados, al tiempo que los agonistas inversos estabilizan los receptores en una conformación inactiva y actúan de manera similar a los antagonistas competitivos. Los agonistas pueden clasificarse como totales o parciales. Los agonistas totales producen una respuesta biológica máxima y tienen eficacia máxima, lo cual es independiente de su potencia. Los agonistas parciales producen menos de 100% de la respuesta biológica máxima incluso cuando existe una ocupación total de los receptores, estos tienen actividad biológica similar a la de los ligandos naturales (agonistas completos). Los antagonistas ocupan a los receptores sin activar los mecanismos efectores distales, lo cual refleja su carencia de actividad intrínseca, pueden bloquear la respuesta por varios mecanismos. Los antagonistas se clasifican en reversibles o irreversibles. Los reversibles se disocian con facilidad de su receptor, en tanto los antagonistas irreversibles forman un enlace covalente estable con su receptor. En el caso del antagonismo competitivo (reversible), la unión del antagonista impide la unión del agonista a sus receptores. En el antagonismo no competitivo (irreversible) el agonista y el antagonista pueden unirse a los receptores de manera simultánea, pero la unión de antagonistas reduce o impide la acción del agonista. En el antagonismo competitivo, ocurre un estado estable entre agonista, antagonista y receptor, que puede rebasarse (tener competencia) al incrementar la concentración del agonista. En contraste, la modificación covalente que caracteriza a los antagonistas no competitivos inactiva a permanencia a los receptores, lo cual les elimina del complemento disponible para desencadenar respuestas. Los agonistas y los antagonistas producen alteraciones cuantitativas características de la relación dosis-respuesta que resultan diagnósticas (Figura 20). Los agonistas producen una respuesta en el sistema que se caracteriza CE_{50} y eficacia completa o parcial ($E_{máx}$). Los antagonistas no producen respuesta; más bien, sus efectos se revelan a partir de la presencia de agonistas. Los antagonistas competitivos desplazan la curva dosis-respuesta de los agonistas hacia la

derecha, lo cual es característico de una disminución aparente de la potencia que refleja la reversibilidad del antagonismo, sin modificación de la eficacia. En contraste, los antagonistas no competitivos modifican mediante enlace covalente a los receptores antagonistas y tienen efecto irreversible, lo cual causa pérdida de las unidades receptoras del sistema y reduce la eficacia máxima de los agonistas. Sin embargo, las unidades receptoras remanentes poseen la misma afinidad para los fármacos, y la potencia de los agonistas no se afecta por efecto de los antagonistas no competitivos.

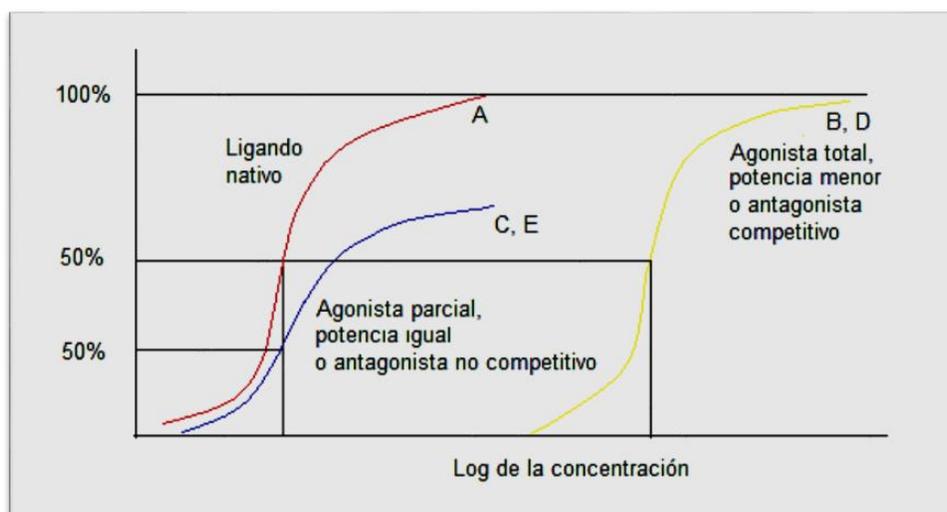


Figura 20. Agonistas y antagonistas. Tomado de Waldman, S (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual

4.2 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES^{4, 5, 8, 9,21,22,24}

El reconocimiento de la señal extracelular por su receptor es el comienzo de una serie de eventos que llevan la información desde el exterior de la célula hacia su interior, hasta generar una respuesta. La transferencia de la información hacia el interior de la célula se conoce como mecanismo de transducción de señales. La vía típica de la transducción de señales se inicia por efecto de una molécula pequeña que se une a un receptor en la superficie externa de una célula. La interacción ligando-receptor promueve cambios en el segundo que permiten que interactúe con proteínas intracelulares o que genere moléculas pequeñas específicas conocidas como segundos mensajeros. La unión de un ligando al receptor puede iniciar la transducción de señales, que conduce a cambios rápidos de la función celular como regulación del flujo de iones, metabolismo y morfología celular.

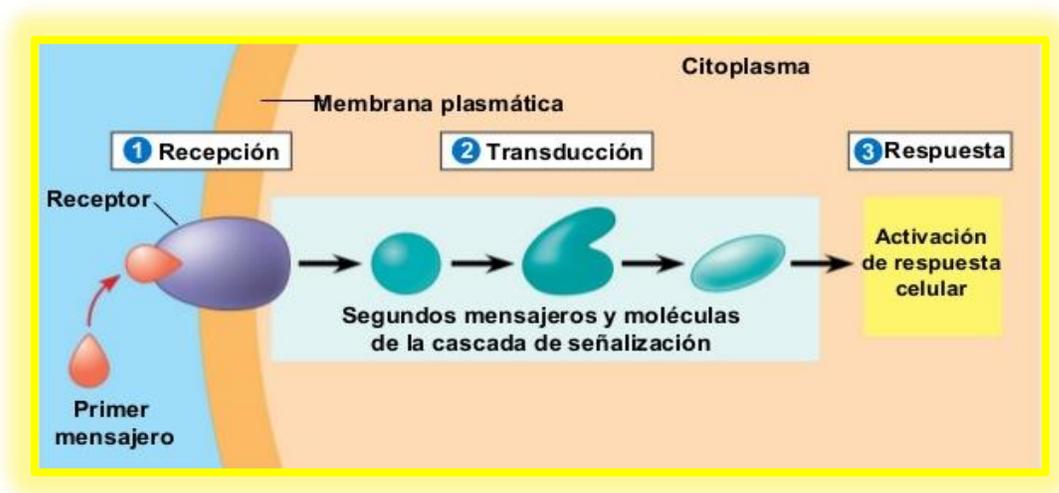


Figura 21. Comunicación intracelular. La transducción de señales ocurre cuando una molécula de señalización extracelular activa un receptor específico en superficie de la célula. A su vez, este receptor altera moléculas intracelulares. Un segundo mensajero transmite la señal hacia la célula, provocando una respuesta fisiológica. Tomado de <http://goo.gl/R4cyq4>

En la **señalización endocrina** la molécula de señalización u hormona es producida y secretada por una glándula y vertida a la sangre para ser distribuida por el torrente hacia la totalidad del organismo hasta alcanzar ciertas células distantes de su lugar de origen para ejercer su acción reguladora. Los mensajes se secretan en órganos específicos llamadas glándulas. El alcance de la comunicación es a todas partes del cuerpo ya que viaja por el torrente sanguíneo. Las hormonas son sintetizadas por las células de los órganos endocrinos y actúan sobre células diana muy alejadas, a las que llegan vehiculadas por la sangre.

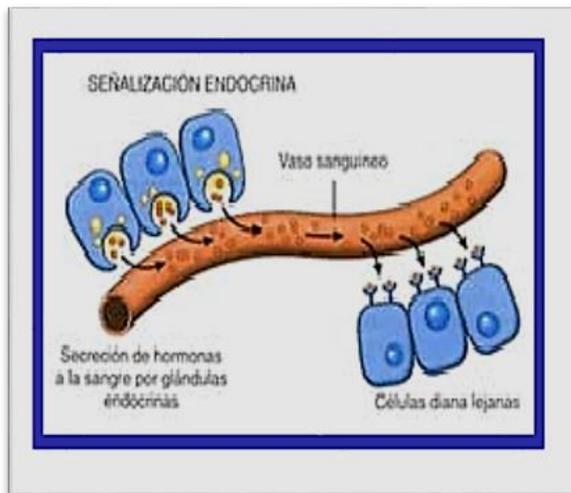


Figura 22. Comunicación endocrina. Las hormonas son secretadas y distribuidas por el torrente circulatorio hacia la totalidad del organismo para ejercer su acción reguladora sobre las células blanco localizadas habitualmente a distancias considerables. Los mensajes se secretan en órganos específicos llamadas glándulas. Tomado de <https://goo.gl/8LF8z7>

La **señalización paracrina** se caracteriza porque señal química liberada se difunde a células blanco cercanas a través del espacio extracelular, así ejerce su acción sobre células vecinas.

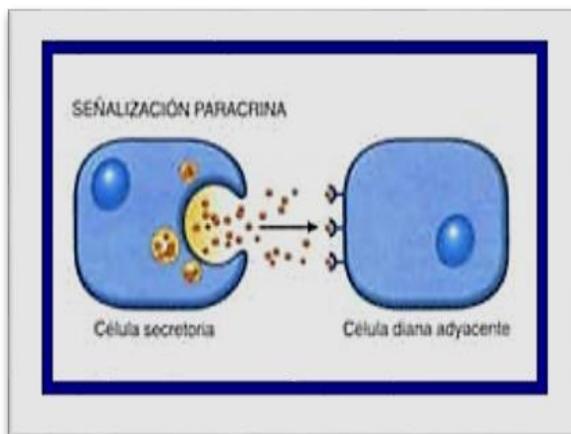


Figura 23. Señalización paracrina. Una célula produce sustancias que actúan solamente sobre una célula blanco próxima. La estimulación paracrina es frecuente durante la curación de las heridas y su reparación por tejido conjuntivo. Tomado de <https://goo.gl/gBVL1a>

En la **señalización autocrina** o autocomunicación una célula produce un ligando que secreta y activa a receptores en la superficie de la misma o en un grupo de células idénticas.

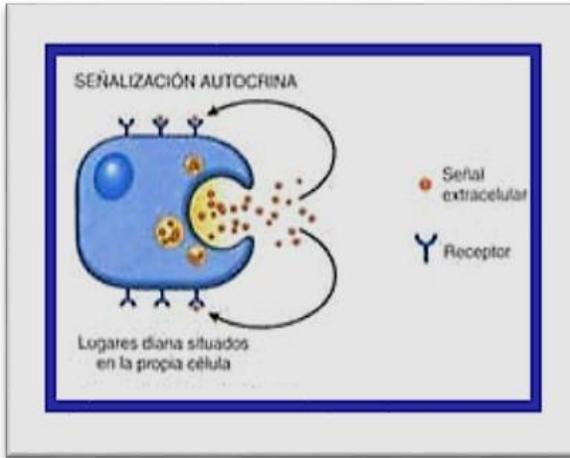


Figura 24. Comunicación autocrina. Esta se establece una célula consigo misma. Las células responden a moléculas de señalización que ellas mismas secretan. Este tipo de comunicación es la que establece la neurona presináptica al captar ella misma a su receptor celular, los neurotransmisores que ha vertido en la sinapsis para así dejar de secretarlos o recaptarlos para reutilizarlos. Tomado de <https://goo.gl/kCZ5zZ>

En la **señalización nerviosa** el mediador o neurotransmisor se sintetiza en los terminales axónicos de las células nerviosas, es secretado en la conexión sináptica y ejerce su acción sobre células vecinas (otra célula nerviosa, célula muscular, entre otros).

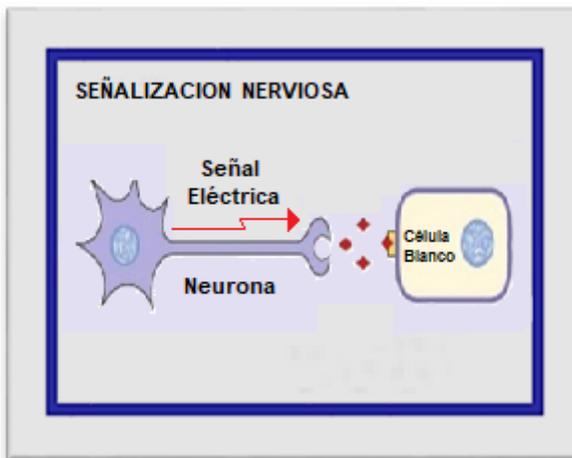


Figura 25. Comunicación nerviosa. En la neurotransmisión el flujo de información eléctrica recorre la dendrita y axón de las neuronas en una sola dirección hasta alcanzar la sinapsis. Tomado de <https://goo.gl/YMBWBj>

Hay otros tipos de comunicación, por ejemplo, la molécula de señalización es sintetizada e incorporada a la membrana plasmática donde es expuesta al exterior y ejerce su acción por contacto con otra célula. A este tipo de comunicación se le llama yuxtacrina o también estas moléculas de señalización pueden pasar de una célula a otra, a través de uniones *gap*.

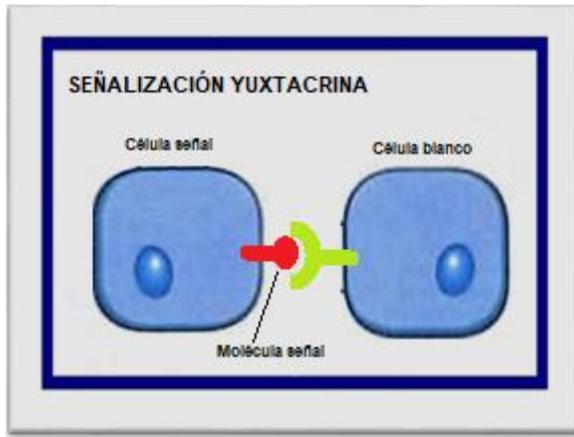


Figura 26. Comunicación yuxtacrina. Es la comunicación por contacto con otras células o con la matriz extracelular mediante moléculas de adhesión celular. Tomado de <https://goo.gl/YMBWBj>

Los ligandos son considerados moléculas pequeñas circulantes que interactúan con receptores ubicados en la superficie externa, pueden tener formas variadas y algunos son capaces de penetrar a la célula para unirse a receptores intracelulares. Los ligandos extracelulares pueden ser proteínas grandes o enzimas. Algunos ligandos no son capaces de difundirse, pero se mantienen unidos a una célula; la mayor parte de los ligandos de señalización son hidrofílicos y no pueden atravesar la bicapa lipídica para ingresar a las células; así, la mayoría de los ligandos necesitan unirse a receptores en la superficie externa de las células.

Independientemente de la variante de que se trate, e independientemente de la naturaleza del señalizador, es necesario para que se produzca este evento celular, la existencia de una proteína específica que va a reconocer y a unirse al mediador. Esta proteína es el receptor (R). Así, la molécula de señalización actúa como ligando uniéndose al receptor, produciendo un cambio conformacional en éste, que desencadena la secuencia de reacciones que lleva en última instancia a una respuesta celular específica.

Sólo las células que poseen el receptor adecuado para un determinado ligando responderán a éste. Estas células reciben el nombre de células dianas, e igualmente podríamos hablar de tejidos dianas, órganos dianas, entre otros. Por tanto, existe una especificidad de unión ligando-receptor, como también la hay en la respuesta que se produce. Es común encontrarnos en la vida celular, con el hecho de que distintos ligandos produzcan el mismo

efecto en un tipo celular p. Ej. epinefrina y glucagón en hepatocitos producen liberación de glucosa a la sangre, tanto que un mismo complejo ligando-receptor modulen distintas respuestas dependiendo del tipo tisular (la epinefrina en células musculares de corazón eleva la fuerza de contracción).

Los ligandos que se unen a receptores son variados, con la característica común de ser todos proteínas. Los receptores pueden clasificarse en varios tipos principales, 1) receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la unión de un ligando extracelular permite que la porción intracelular del receptor se acople a un grupo de proteínas denominadas proteínas G; 2) Canales iónicos, la unión extracelular del ligando regula el flujo de iones específicos a través del canal que atraviesa la membrana celular; 3) receptores ligados a enzimas formados por un dominio extracelular del ligando y actividad enzimática intracelular regulada por la unión extracelular del ligando, y 4) receptores nucleares que se ubican al interior de las células y se unen a moléculas hidrofóbicas como los esteroides, y también ligan en forma directa al DNA para regular la transcripción.

En el presente trabajo nos enfocaremos a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), los cuales componen una de las familias más grandes de proteínas de membrana que participan en la señalización intracelular y están involucrados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos y son los principales candidatos para el desarrollo de fármacos.

4.3 PROTEÍNAS G ^{4,9}

Las proteínas G heterotriméricas son parte de una familia de proteínas que se caracterizan por unir e hidrolizar GTP, mediando un mecanismo encargado de transmitir información del receptor al efector. Estas son responsables de la transmisión de gran parte de las señales que provienen de un GPCR activado por agonistas. Las proteínas G están compuestas por subunidades α , β y γ y funcionan como interruptores moleculares mediante ciclado entre sus estados unidos a GDP y GTP (Ciclo de las proteínas G). El estado inactivo consiste en un complejo heterotrimérico $\alpha\beta\gamma$ en el que $G\alpha$ está unida a GDP, mientras que el estado competente activo para señalización depende de $G\alpha$ unida a GTP y en disociación con $G\beta\gamma$. Las subunidades β y γ de la proteína G casi siempre se encuentran en unión irreversible entre sí, y por ello se denominan dímero $\beta\gamma$ de la proteína G ($G\beta\gamma$). En gran medida, el complejo heterotrimérico no es capaz de interactuar con proteínas, es decir efectores, distales en la vía metabólica y activarla, debido a que $G\alpha$ unido a GDP tiene una conformación que no es óptima para interactuar con proteínas efectoras y debido a que las superficies proteicas de $G\alpha$ $G\beta\gamma$ que interactúan con los efectores se encuentran ocluidas cuando $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ están unidas entre sí.

Las proteínas G son proteínas especializadas con la capacidad de unirse al trifosfato de guanosina nucleótidos (GTP) y difosfato de guanosina (PIB). Algunas proteínas G, tales como las proteínas de señalización Ras, son pequeñas proteínas con una subunidad. Sin embargo, las proteínas G que se asocian con GPCRs son **heterotriméricas**, lo que significa que tienen tres subunidades diferentes: una subunidad α , una subunidad β , y una subunidad γ . Dos de estas subunidades - α y γ - están unidos a la membrana plasmática por las anclas de lípidos (Figura 27).

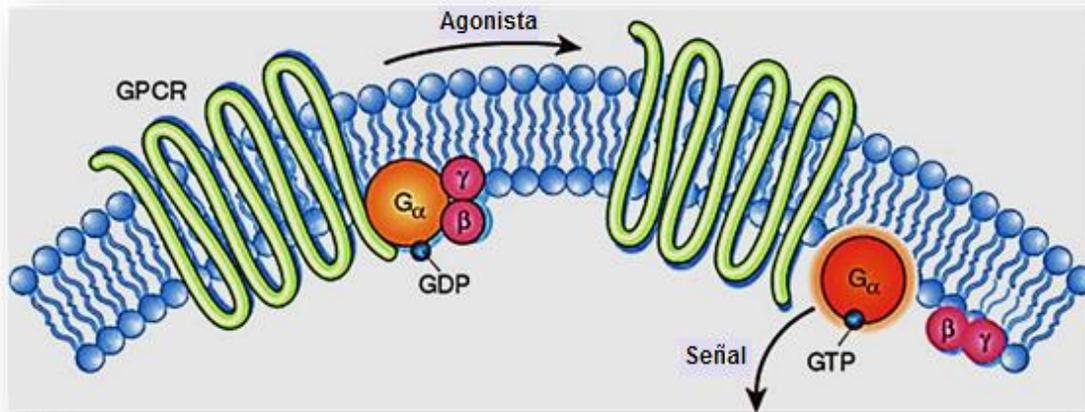


Figura 27. Activación de la subunidad G alfa de un receptor de la proteína G acoplada. En las células no estimuladas, el estado de G alfa (círculos de color naranja) se define por su interacción con el PIB, G beta-gamma (círculos de color púrpura), y un receptor acoplado a proteína G (GPCR; bucles luz verde). Tras la estimulación del receptor por un ligando llama un agonista, el estado de los cambios de los receptores. G alfa se disocia del receptor y G beta-gamma, y GTP es intercambiado por el GDP unido, que conduce a la activación alfa G. G alfa pasa luego a activar otras moléculas en la célula. Recuperado de Nature Publishing Group © 2002 Li, J. *et al.* La base de datos de Páginas molécula. *Naturaleza* 420, 716-717 (2002).

4.3.1 EFECTORES DE PROTEÍNAS G.²³

La activación de una proteína G puede afectar la producción de cientos o incluso miles de moléculas de segundos mensajeros (Figura 3). Recordemos que los segundos mensajeros - tales como AMP cíclico [AMPC], diacilglicerol [DAG], e inositol 1, 4, 5-trifosfato [IP3] -. Son pequeñas moléculas que inician y coordinan vías de señalización intracelular. Un objetivo particularmente común de activado proteínas G es la adenililciclase, una enzima asociada a la membrana que, cuando se activa por la subunidad alfa unida a GTP, cataliza la síntesis de la segunda mensajero AMPC a partir de moléculas de ATP. En los seres humanos, AMPC está implicado en las respuestas a la entrada sensorial, las hormonas, y la transmisión nerviosa, entre otros.

Fosfolipasa C es otro objetivo común de las proteínas G activadas. Esta enzima asociada a la membrana cataliza la síntesis de no uno, sino dos segundos mensajeros DAG e IP3 de la fosfatidil inositol de los lípidos de membrana. Esta vía particular es crítica para una amplia variedad de procesos corporales humanos. Por ejemplo, los receptores de trombina en las plaquetas utilizan esta vía para promover la coagulación de la sangre.

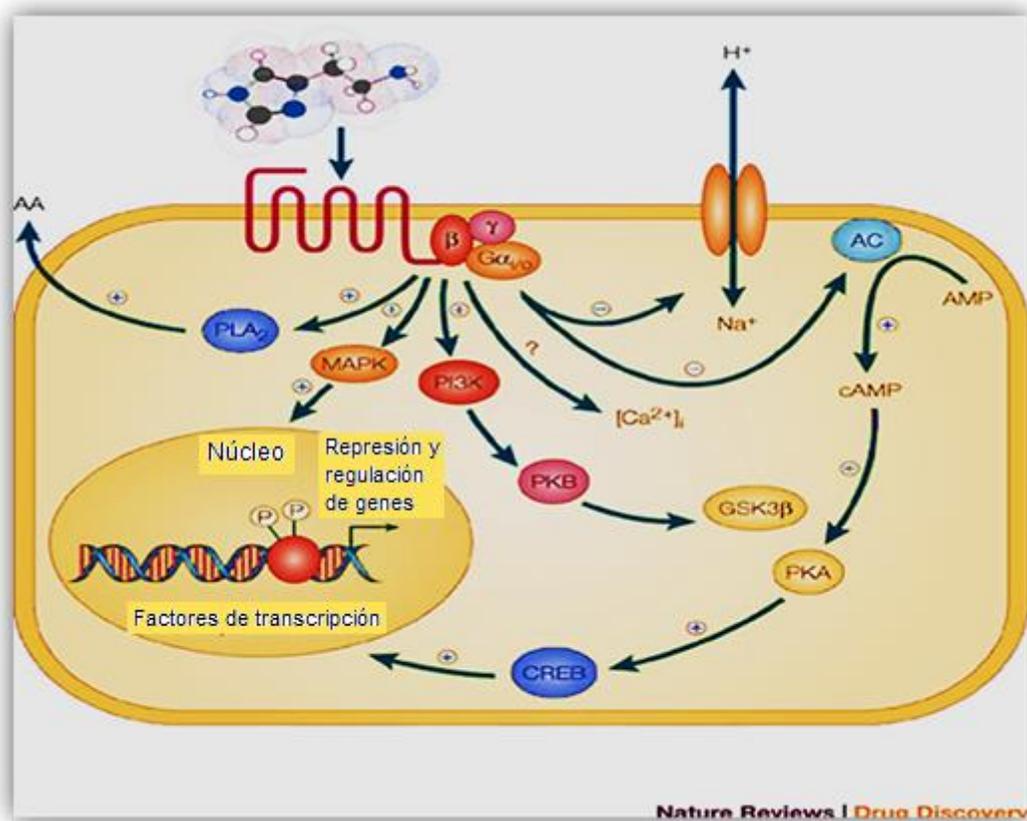


Figura 28. Cascadas de señalización dentro de una célula puede interactuar para afectar a múltiples moléculas en la célula, lo que lleva a la secreción de sustancias de la célula, la apertura del canal de iones, y la transcripción.

Tomado de [Nature Publishing Group](#) 2005 Leurs, R. *et al.* La histamina H3 receptor: De la clonación de genes a las drogas receptor H3 *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 107-120 (2005). Todos los derechos reservados.

La unión de un agonista al receptor acoplado a proteína G en la membrana plasmática activa una vía que implica las proteínas G, así como rutas relacionadas con AMPc que modulan la señalización celular. En este ejemplo, la G alfa activado ($G_{\alpha i} / 0$) proteínas inhiben la (-) adenililciclasa (AC, a la derecha), la enzima que induce la formación de AMPc, lo que a su vez resulta en la activación de la proteína quinasa A (PKA). Esto a su vez activa una molécula llamada AMPc responde elemento vinculante proteína (CREB), que modula la transcripción de genes. Las proteínas alfa G activadas también pueden tener una variedad de otros efectos, que se muestran a la izquierda. Estos efectos incluyen la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La activación de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) también pueden ocurrir, que induce la liberación de ácido araquidónico (AA), así como la inhibición de la Na^+ / H^+ intercambiador

en la membrana plasmática, y la reducción de Ca^{2+} intracelular niveles (mecanismo exacto desconocido). la posterior activación de las MAPK y PI3K vías da como resultado la fosforilación de las quinasas extracelulares reguladas por señales (ERK) y proteína quinasa B (PKB), respectivamente. PKB activado posteriormente se fosforilar y de ese modo inhibir la acción de la glucógeno sintasa quinasa 3beta (GSK3beta), una quinasa importante en el cerebro.

AMP CÍCLICO (AMPc, 3'5'monofosfato de adenosina cíclico)²⁶⁻²⁹

Un número elevado de sustancias, tanto endógenas (neurotransmisores y neuromoduladores, hormonas autacoides) como exógenas (fármacos), activan su célula diana, estimulando la producción de AMPc. Para que los mensajeros extracelulares (primeros mensajeros), por ejemplo los fármacos, incrementen la concentración intracelular de AMPc (segundo mensajero) se requieren tres proteínas de la membrana plasmática: el receptor específico una proteína reguladora y la adenilatoclasa propiamente dicha.

Estos tres componentes son independientes, siendo posible combinarlos con los de otras especies o tejidos para formar una unidad totalmente funcional. Ello parece ser debido a que se encuentran libres en la membrana celular donde pueden desplazarse por separado, interaccionado de vez en cuando entre sí. Estos componentes están, pues, en un estado dinámico que, no obstante, permite lo que se denomina su acoplamiento, término que hace referencia a la eficacia con que una molécula mensajera extracelular al fijarse a un receptor ubicado en la superficie de la célula, convierte su información en AMPc u otro mensajero intracelular.

¿Cómo se efectúa este acoplamiento? Esquemáticamente, la unión del fármaco al receptor produce un doble fenómeno. Por un lado, el receptor que en estado de reposo presenta una alta afinidad por el fármaco, pasa, tras su unión a éste, a un estado de baja afinidad, lo que favorece la disociación del fármaco de su receptor y permite la terminación del efecto.

La unión del fármaco a su receptor conduce, en segundo lugar, a la activación de la proteína reguladora que, a su vez, activa al tercer componente, aumentando la afinidad de la adenilato ciclasa por su sustrato, el ATP Mg al que transforma en AMPc. La proteína reguladora, llamada así por regular la prueba de la afinidad del receptor por el agonista (cuando se activa, logra un descenso de la unidad del receptor), como la actividad de la adenilato ciclasa tiene la particularidad de fijar nucleótidos de guanina. De esta manera su activación por el complejo fármaco-receptor supone la fijación de GTP. Esta proteína se autorregula debido a su capacidad GTPasica.

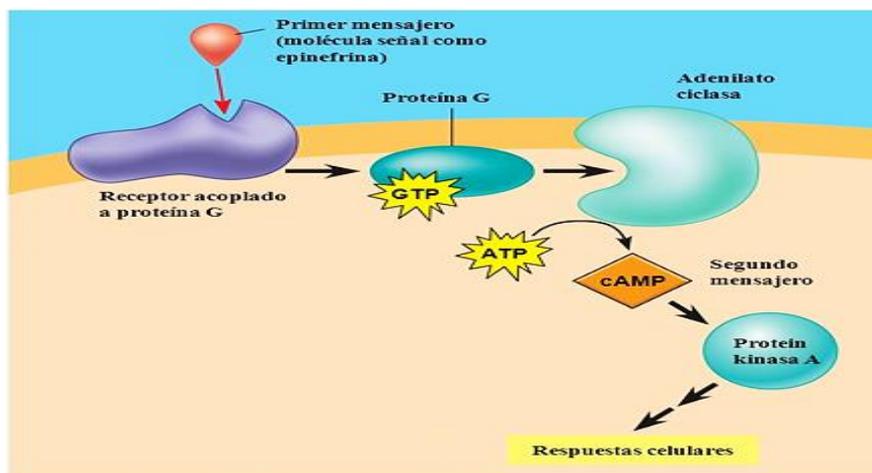


Figura 29. Sistema de AMP cíclico. El AMPc como segundo mensajero en una vía de señalización de la proteína G. El primer mensajero activa a un receptor asociado a proteína G, la que activa a una proteína G específica. A su vez, la proteína G activa la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión de ATP en AMPc. El AMPc activa a otra proteína, generalmente, una proteincinasa A. Tomado de <https://goo.gl/8meHru>

Por último, el producto de la reacción, el AMPc, se encuentra en equilibrio entre su síntesis por la adenilato ciclasa y su degradación por la fosfodiesterasa.

Las hidrólisis del AMPc es catalizada por varias fosfodiesterasas (strada-hidaka) y la extrusión de AMPc, desde las células, se logra gracias a un sistema de transporte activo regulado. En casi todos los casos el AMPc actúa por activación de las proteínquinasa cíclicas dependientes de AMP que regulan innumerables proteínas intracelulares al catalizar su

fosforilación (Edelman y col) y por lo tanto modifican (a través de su activación o inactivación) sus funciones biológicas.

La especificidad de la respuesta al AMP cíclico dependerá de la naturaleza de las proteínas sobre las que actúen las proteinquinasas para inducir su fosforilación, que también es modulada por otros agentes, como el Ca^{2+} .

El AMPc es metabolizado por una fosfodiesterasa. Esa última es inhibida por la metilxantinas, como cafeína y teofilina; en consecuencia, estos últimos compuestos aumentan los efectos hormonales y transmisores mediados por el AMPc.

Ca^{2+} INTRACELULAR²⁸

La concentración citoplásmica del ion de calcio, que es otro segundo mensajero de amplia distribución, depende de la regulación de los diversos canales específicos de dicho ion en la membrana plasmática y de su descarga desde sitios de reserva intracelular. Los canales de calcio pueden ser abiertos por la despolarización eléctrica, por fosforilación (proteinquinaasa cíclica dependiente de AMP, por proteínas Gs y por potasio o el propio ion de calcio. La abertura del conducto puede ser inhibida por otras proteínas G (Gi y Go).

La liberación del calcio de otros depósitos intracelulares es medida por IP_3 .

La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma se mantiene alrededor de 100 nmol/L. La concentración de Ca^{2+} en el líquido intersticial es de 2000 veces la concentración citoplasmática, es decir 200 000 nmol/L, de manera que hay un gradiente de concentración hacia adentro, la gradiente eléctrica. Cantidad importante de Ca^{2+} está en el retículo endoplasmático y en otros organelos, por lo cual estos últimos proporcionan una reserva desde la cual el Ca^{2+} puede mobilizarse para aumentar la concentración libre de este ion en el citoplasma. El calcio iónico aumentado en el citoplasma se une a proteínas captadoras de calcio y las activa, lo cual a su vez activa varias proteinquinasas.

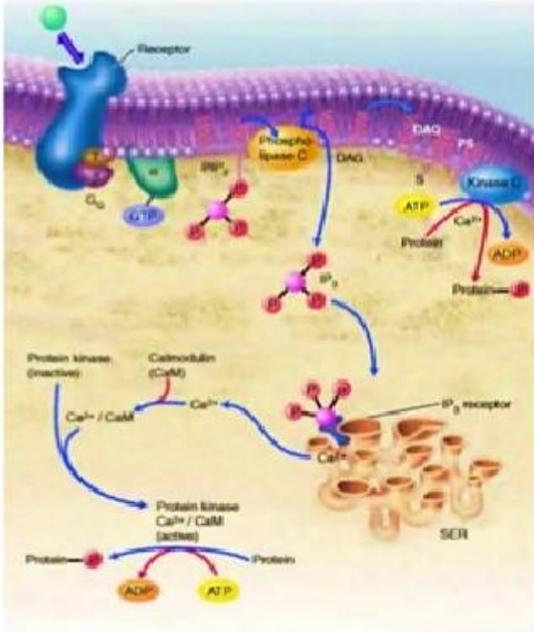


Figura 30. Representación esquemática de la liberación de trifosfato de inositol(IP) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros. La fijación de un ligando al receptor acoplado a la proteína G activa a la fosfolipasa C (PLC) $\beta 1$ o $\beta 2$. De manera alternativa, la activación de los receptores con los dominios intracelulares de tirosinquinasa pueden activar al PLC $\gamma 1$, La hidrólisis resultante del PIP $_2$ produce IP $_3$, que libera al Ca $^{2+}$ del retículo endoplásmico (RE), y al DAG, que activa a la proteínquinasa C (PKC). PFCa, proteínas fijadoras de Ca $^{2+}$. LI:líquido intersticial. Tomado de <https://goo.gl/Xa9gTx>

El Ca $^{2+}$ entra a las células a través de dos tipos de conductos: los que tienen compuertas de voltaje y los que las tienen de ligando. Los conductos para este ion con compuertas de voltaje, de los cuales hay por lo menos cuatro tipos, se activan por la despolarización, mientras que los conductos con compuertas de ligando lo hacen por la acción de muchos neurotransmisores y hormonas diferentes. Además, parece haber conductos de Ca $^{2+}$ que se activan por estiramiento.

El calcio se bombea, asimismo, hacia afuera de las células, intercambiándolo por 2 $^{+}$ por la acción de una Ca $^{2+}$ -H $^{+}$ -ATPasa y se transporta hacia afuera de la célula por un antiportador conducido por la gradiente de Na, que intercambia tres de estos últimos iones por cada Ca $^{2+}$.

Algunos segundos mensajeros actúan aumentando la concentración citoplásmica de calcio. El aumento se produce por la liberación de Ca $^{2+}$ desde almacenes intracelulares, principalmente el retículo endoplásmico, o aumentando la entrada del mencionado ion a las células, o por ambos mecanismos. El IP $_3$ es el principal, entre los segundos mensajeros, que produce liberación de Ca a partir de depósitos internos.

Aunque la adenosinadifosforribosa cíclica (ADPRc), un metabolito del NAD, puede participar también en tejidos como el páncreas. El ADPRc se forma por la acción del GMP cíclico sobre el NAD y puede actuar sobre los receptores de rianodina, mientras que el IP actúa sobre el retículo endoplásmico. En muchas circunstancias, el aumento en la concentración de Ca^{2+} comienza en una parte de la célula y se disemina hacia otras partes del citoplasma. Además, hoy día está claro que, en muchas circunstancias, las hormonas y otros ligandos inician oscilaciones cíclicas en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico más que un aumento sostenido. Aún no se ha establecido la función de esas oscilaciones.

FOSFOINOSITIDOS (sistema fosfatidilinositol, polifosfoinositidos)^{25,26}

El sistema fosfatidilinositol donde se produce dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG).

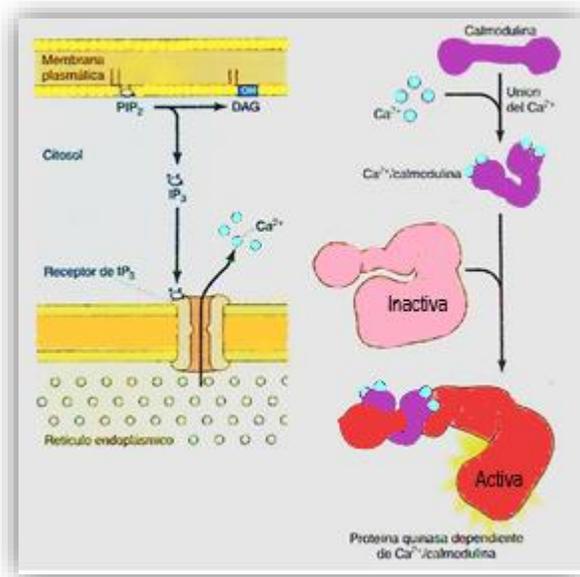


Figura 31. Activación de Proteínquinasa. En el sistema de fosfatidilinositol sensible a hormonas se producen dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol. Ambos contribuyen a la activación de la proteína quinasa C: el IP_3 al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, también actúa como segundo mensajero. H: hormona. Rec: receptor. PLC: fosfolipasa C. Tomado de <https://goo.gl/ikXX7M>

El inositol, 1,4,5-trifosfato (IP_3) es producto de la hidrólisis del lípido de la membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2); dicha reacción es catalizada por una fosfolipasa C (PLC). La liberación del calcio de los depósitos intracelulares es mediada por este segundo mensajero, que permite la salida al citosol de Ca^{2+} almacenado.

El diacilglicerol (DAG) potencia la activación de la proteinquinasa C en la que interviene el ion calcio. También es un producto de la reacción catalizada por fosfolipasa C que libera IP₃. El DAG actúa como segundo mensajero de esta enzima dependiente de Ca²⁺ unido a membrana y que fosforila residuos de SER o T HR de proteínas dianas específicas, modificando sus actividades catalíticas.

La lista de hormonas que se sabe que actúan a través de este mecanismo de transducción está en rápido aumento.

4.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G ^{4,9,31-37}

Los receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptors, GPCRs) representan una de las superfamilias de proteínas más importantes debido a su implicación en prácticamente todos los procesos fisiológicos del organismo. Esta importancia queda manifiesta en el hecho de que prácticamente la mitad de los fármacos actualmente comercializados ejercen su actividad terapéutica a través de al menos un GPCR. Los GPCRs son proteínas de membrana capaces de recibir la información proveniente de estímulos externos y transmitir ésta al interior celular de modo que se genere la respuesta adecuada al estímulo recibido. Para ello los GPCRs actúan como transductores de señales, es decir, son capaces de unir con especificidad y selectividad uno o varios ligandos (que pueden provenir tanto del exterior como del interior del organismo, es decir, ligandos endógenos) y responder a esta unión mediante un cambio conformacional que implica su activación o inactivación. Este cambio estructural se transmite al interior celular produciéndose así una modificación que activa un cierto tipo de proteína(s) G a las que se encuentran acoplados (de ahí su nombre). Estas proteínas G, a su vez, activan diferentes cascadas intracelulares responsables de los distintos efectos finales. Debido a su importancia, los GPCRs han constituido un área de investigación extremadamente dinámica durante las pasadas décadas. Además, en los últimos años se han producido avances fundamentales en cuanto a la elucidación de su estructura y del detalle molecular de sus mecanismos de (in)

activación. Sin embargo, en la actualidad aún existen diversas cuestiones que no se han podido abordar con las herramientas existentes hasta el momento y que requerirían el desarrollo de sondas químicas que permitieran precisamente obtener esta información.

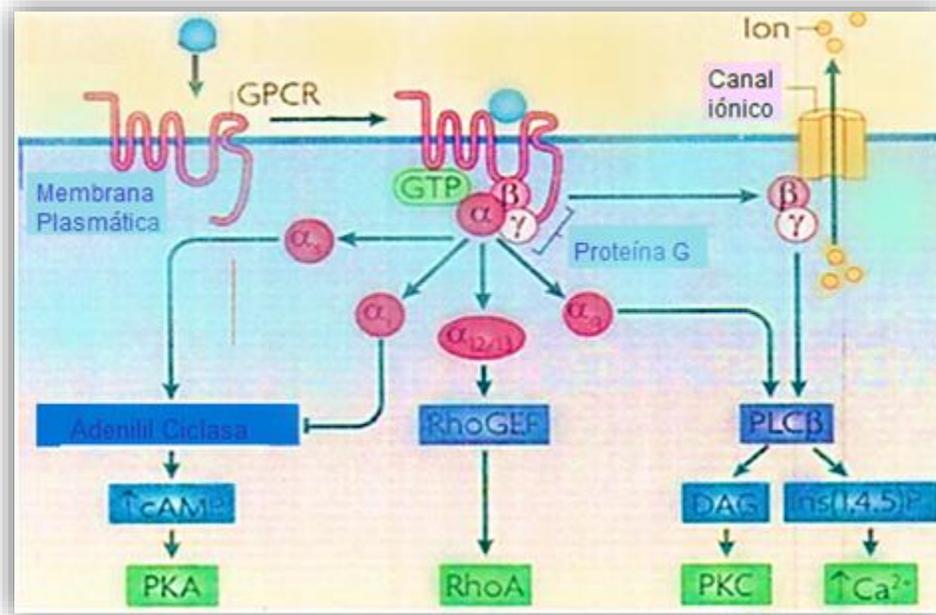


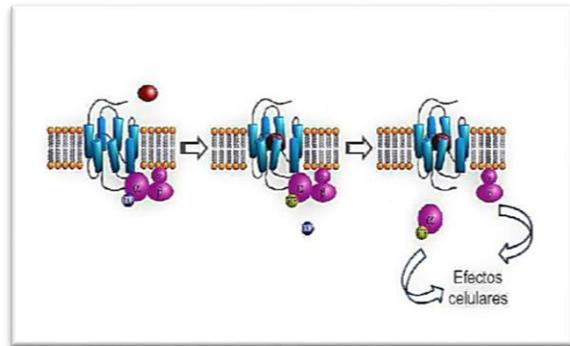
Figura 32. Unión de un ligando agonista a un GPCR y activación de mecanismos de señalización celular responsables de las funciones biológicas. Tomado de Ritter y Hall, 2009.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen aproximadamente el 4% de todos los genes codificados por el genoma humano, por lo que representa la familia más numerosa de proteínas de membrana implicadas en la transducción de señales. Existen aproximadamente unos 800 GPCRs diferentes que se clasifican generalmente en cinco familias en función de su similitud de secuencia y estructura con respecto al receptor que da nombre a la familia o bien porque están implicados en procesos de transducción similares. Así, los GPCRs se clasifican como pertenecientes a la familia de la rodopsina (familia A), secretina (familia B), o glutamato (familia C), o bien a las familias de los receptores de adhesión o frizzled/taste2. Esta división, introducida originalmente por Fredriksson y colaboradores, y basada fundamentalmente en criterios filogenéticos, es la

aceptada actualmente por la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (International Union of Basic and Clinical Pharmacology, IUPHAR), y se conoce con el acrónimo GRAFS (glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled/ taste² y secretina). La clasificación GRAFS permite además agrupar los receptores pertenecientes a cada uno de estos grupos en diversas subfamilias, lo que resulta fundamental en el caso de la familia de la rodopsina, a la que pertenecen más del 80% de la totalidad de los GPCRs . Además de ser la más numerosa, la familia A presenta la mayor diversidad estructural de todas las familias. Estos GPCRs se activan por un gran número de estímulos muy diversos. Por ello, los miembros de las distintas subfamilias de clase A se caracterizan por poseer motivos altamente conservados en su secuencia, lo cual a su vez se traduce en numerosas homologías estructurales. De forma muy general, los GPCRs se caracterizan por presentar (i) una estructura de siete hélices transmembrana; (ii) un extremo N terminal orientado hacia el exterior celular, que en general contiene la zona de unión del ligando; y (iii) un extremo C terminal, en el interior celular, en las proximidades del cual se produce la interacción con la proteína G heterotrimérica responsable de la activación de las cascadas de señalización correspondientes (Figura 32).

4.4.1 LIGANDOS DE LOS GPCRs. Debido a su localización en la membrana celular, los GPCRs reconocen un elevadísimo número y tipo de señales extracelulares, incluyendo fotones, iones, moléculas pequeñas (entre las que se encuentran hormonas, neurotransmisores, nucleótidos, lípidos de distinta complejidad y azúcares), péptidos y proteínas. Estos estímulos son capaces de activar (o bloquear) su correspondiente GPCR y transmitir así la señal desde el exterior celular, a través de la membrana plasmática, hasta el interior citoplasmático, donde se genera la respuesta adecuada. Estas respuestas celulares incluyen la regulación de diversas actividades enzimáticas, canales iónicos, transcripción génica, así como determinadas vías de supervivencia, motilidad y proliferación celular. Cascadas de señalización a través de GPCRs: proteínas G heterotriméricas, ligandos sesgados (biased ligands), oligomerización de GPCRs y ligandos alostéricos.

Figura 33. Representación esquemática general de la activación de un GPCR. La unión del ligando (en rojo) produce la activación de la proteína G heterotrimérica y la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, las cuales inician así sus cascadas de señalización correspondientes. Recuperado (Figura adaptada © Sven Jähnichen/wikimedia commons/ GNU-FDL).



4.4.2 CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE GPCRs

El modelo comúnmente aceptado para la activación de los GPCRs implica la unión de un ligando agonista en el dominio extracelular del receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el GPCR de tal modo que se modifica la posición relativa de las hélices transmembrana y de los loops intracelulares que unen los dominios transmembrana. Esta conformación activa, en la que el agonista está unido al receptor, es capaz ahora de interactuar con la proteína G heterotrimérica. Las proteínas G heterotriméricas tienen actividad GTPasa, es decir, unen e hidrolizan trifosfato de guanosa (GTP, guanosine triphosphate) generando difosfato de guanosa (GDP, guanosine diphosphate). Están constituidas por tres subunidades, denominadas α , β y γ , siendo la subunidad α la responsable de la unión e hidrólisis de GTP. De este modo, tras la unión del ligando al GPCR, éste interactúa con la proteína G produciéndose la liberación del GDP y la unión de una molécula de GTP en la subunidad α . Simultáneamente dicha subunidad α se disocia del dímero $\beta\gamma$ y del propio receptor, de modo que tanto la subunidad α unida a GTP como el dímero $\beta\gamma$ activan sus vías de señalización correspondientes. Esta activación se detiene cuando, momentos después, las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS, regulators of G protein signaling) inducen la actividad GTPasa. Tras la hidrólisis del nucleótido, la subunidad α unida a GDP se re-asocia al dímero $\beta\gamma$ quedando la proteína G heterotrimérica en un estado inactivo y por tanto lista para un nuevo ciclo de activación

(Figura 33). De este modo se produce un proceso de amplificación de la señal cuidadosamente regulado en el tiempo y en el espacio. Esta cascada de señalización puede activar múltiples dianas dependiendo de la proteína G específica implicada. En general, se distinguen varios tipos de proteínas G heterotriméricas en función de la subunidad α que poseen, la cual se relaciona estrechamente con el efecto celular producido. Por otro lado, el dímero $\beta\gamma$ induce su propia cascada de señalización (Tabla 1).

Señalización clásica (canónica)			
Tipos de proteínas G heterotriméricas	Subunidad A	Efecto	Ejemplos de GPCR's ^[c]
G _s	α_s	Activación de la AC	R A β R _s 5-HT ₄ ' 5-HT ₆ ' 5-HT ₇ R D ₁ R H ₂
G _i	α_v α_o	Inhibición de la AC Cierre de Canales de Ca ²⁺	R A α_2 R 5-HT ₁ R _s H ₃ , H ₄ R _s M ₂ ' M ₄ R _s de Quemoquinas
G _q	α_q ' α_{11} ' α_{14} ' α_{15} ' α_{16} '	Activación de la PLC	R A α_2 R 5-HT ₂ R H ₁ R _s M ₁ ' M ₃ ' M ₅
G _{12/13}	α_{12} ' α_{13}	Activación de proteínas de la familia Rho	R _s P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ R _s M ₁ ' M ₃
Subunidad $\beta\gamma$ (de todas las Proteínas G heterotriméricas)	Activación de la PL A ₂		R _s H
	Apertura de canales de K ⁺ tipo GIRK		R _s M
	Activación de canales de Ca ²⁺		R H ₃
Señalización no clásica			
β Arrestinas	Desensibilización e internalización de los GPCRs Señalización (p.ej. activación de la vía de las MAPKs)		General
PKs asociados a GPCRs	Fosforilación e inactivación de los GPCRs		General

Tabla 1. Cascadas más comunes de señalización inducidas por la activación de los GPCR's ^[a] ^[b]
Tomado de [a] C. Marty, R.D. Ye, Mol. Pharmacol. 2010, 78, 12-18. [b] S. Siehler, Br. J. Pharmacol. 2009, 158, 41-49. [c] Abreviaturas: 5-HT: serotoninérgico; A: adrenérgico; AC: enzima adenilil ciclasa; D: dopaminérgico; M: muscarínico; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; P: purinérgico; PK: proteína quinasa; PL: enzima fosfolipasa; R: receptor.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, G protein-coupled receptors) constituyen la familia más numerosa de receptores de superficie. Más de 100 miembros de esta familia, codificados por alrededor de mil genes, ha sido identificados en mamíferos. Estos receptores son activados por ligandos que incluyen aminas biogénicas, péptidos, glucoproteínas, lípidos, nucleótidos, iones y proteasas. Estímulos como luz, olores y gustos son mediados por esta clase de receptores. Los GPCRs han recibido esta denominación por su capacidad para reclutar y regular la actividad de proteínas G heterotriméricas intracelulares.

Estos receptores están organizados en una cadena peptídica que atraviesa la membrana 7 veces, de ahí que también se los haya denominado receptores 7TM (7 transmembrana).

Estos receptores de la superficie celular actúan como una bandeja de entrada de mensajes en forma de energía de la luz, péptidos, lípidos, azúcares y proteínas. Estos mensajes informan a las células acerca de la presencia o ausencia de la luz o nutrientes para mantener la vida en su entorno, o que transmiten información enviada por otras células. Los GPCR juegan un papel en una increíble variedad de funciones en el cuerpo humano, y el aumento de la comprensión de estos receptores ha afectado en gran medida la medicina moderna. De hecho, los investigadores estiman que entre un tercio y la mitad de todos los medicamentos comercializados actúan mediante la unión a GPCR.

Los GPCRs se unen a una tremenda variedad de moléculas de señalización, pero comparten una arquitectura común que se ha conservado en el curso de la evolución. Muchos eucariotas actuales incluyendo animales, plantas, hongos y protozoos - dependen de estos receptores para recibir información de su entorno. Por ejemplo, los eucariotas simples, tales como la levadura tienen GPCRs que detectan factores de glucosa y de apareamiento. No es sorprendente que los GPCR están involucrados en considerablemente más funciones en los organismos multicelulares. Los seres humanos tienen solamente cerca de 1.000 GPCRs diferentes, y cada uno es altamente específico para una señal particular.

Los GPCRs consisten en un único polipéptido que se dobla en una forma globular y embebido en la membrana plasmática de una célula. Siete segmentos de esta molécula

abarcan toda la anchura de la membrana (esto explica por qué GPCRs a veces se llaman **receptores de siete dominios transmembrana**) y las porciones bucle pueden intervenir dentro y fuera de la célula. Los bucles extracelulares forman parte de los bolsillos en los que las moléculas de señalización se unen al GPCR.

Como su nombre lo indica, los GPCR interactúan con las proteínas G en la membrana plasmática. Cuando una molécula de señalización externa se une a un GPCR, se produce un cambio conformacional en el GPCR. Este cambio entonces desencadena la interacción entre el GPCR y una proteína G cercana.

4.4.3 ESTRUCTURA DE GPCRs.

La familia de receptores acoplados a proteínas G independientemente de la naturaleza de sus ligandos, presenta características estructurales similares.

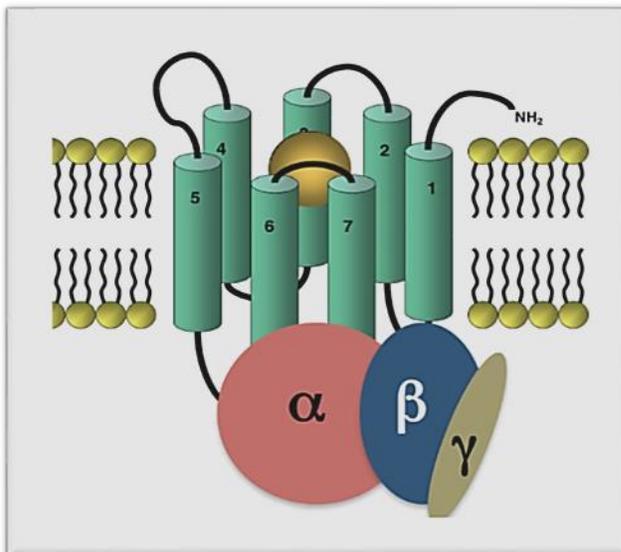


Figura 34. Estructura de GPCR. Estos receptores están constituidos por una cadena polipeptídica de unos 450 aminoácidos plegada en una estructura de siete α -hélices de 22-28 residuos hidrofóbicos cada una, que atraviesan la membrana celular. Las hélices están conectadas por lazos que sobresalen e el citoplasma (lazos C1, C2 y C3) y en el espacio extracelular (lazos E1, E2 y E3) Tomado de: <https://goo.gl/mwtUPj> <https://goo.gl/mwtUPj>

El segmento N-terminal, que reside fuera de la célula varía de tamaño entre 154 residuos en el receptor de calcitocina a 36 residuos en el receptor de rodopsina. Incluye residuos de asparragina, que son sitios para la N-glicosilación, y residuos de cisteína que influyen en el plegado de la proteína. La glicosilación influye en el tráfico intracelular de los receptores desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. El segmento C-terminal intracelular contiene residuos de serina o tirosina que pueden servir como sitios de

fosforilación para quinasas y la desensibilización del receptor. Algunos C-terminales contienen un residuo de cisteína que puede servir como sitio de palmitoilación lo cual puede crear un cuarto lazo interno por la inserción de la cisteína palmitoilada a la membrana plasmática. Este cuarto contiene un sitio de unión a proteína G.

Las siete α -hélice de los dominios de transmembrana están organizados como un núcleo en forma de anillo con los aminoácidos hidrofóbicos enfrentados a la bicapa lipídica y los hidrofílicos a la cara del núcleo. Se enumeran de I a VII desde el n- al C- terminal. Visto desde el lado extracelular las hélices están organizadas secuencialmente en sentido contrario a las agujas del reloj con la hélice III casi en el centro de la molécula. Figura 32.

Los dominios de los lazos intracelulares son importantes para la interacción con proteínas señales y reguladoras, así como para la interacción con otras proteínas como arrestinas. También contienen sitios consenso para la fosforilación por proteína quinasas. Los lazos citoplasmáticos que unen las hélices I-II y III-IV muestran generalmente una significativa conservación en tamaño y secuencias entre los distintos receptores. Por el contrario, el lazo entre las hélices V-VI es de tamaño variable siendo relativamente pequeño en receptores rodopsina y muy largo en receptores α_2 -adrenérgicos y muscarínicos.

Categorías según sus características clínicas
Aminas biogénicas, moléculas pequeñas como adrenalina, serotonina, acetilcolina, dopamina e histamina.
Aminoácidos e iones, glutamato, ácido gammaaminobutírico (GABA) y Ca^{2+} libre.
Péptidos y proteínas, incluidas hormonas peptídicas como hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y angiotensina.
Quimiocinas, una familia numerosa de proteínas pequeñas con estructuras similares.
Lípidos y moléculas derivadas de lípidos, incluidos ácido lisofosfatídico (LPA) prostaglandinas y leucotrienos.
Estímulos ambientales, fotones, odoríferos y sabores.

Tabla 2. Ligandos extracelulares que se unen y activan GPCR específicos.

Los dominios de los lazos extracelulares tienen como aspecto más destacado el puente disulfuro, presente en la mayoría de los receptores, formado por residuos de cisteína de E1 y E2. El receptor de angiotensina posee un puente adicional entre una cisteína de E3 y el dominio N-terminal. Estos puentes de disulfuro son importantes para el adecuado plegamiento del receptor y para la formación de un bolsillo de unión del ligando. Los distintos receptores acoplados a proteínas G que unen ligandos tienen una estructura similar, aunque las secuencias de sus aminoácidos son generalmente muy diferentes. Cada receptor presenta aminoácidos específicos que participan, en forma selectiva, en la unión con su respectivo ligando.

4.4.4 Nomenclatura³⁸. Existen diversos sistemas de clasificación de los GPCRs. El más clásico es el sistema Kolakowski basado en la agrupación de familias en función de su estructura y características genéticas. Como se observa en la figura 33, las diferentes familias se diferencian en el tamaño y en la función del dominio N-terminal y los bucles intracelulares.

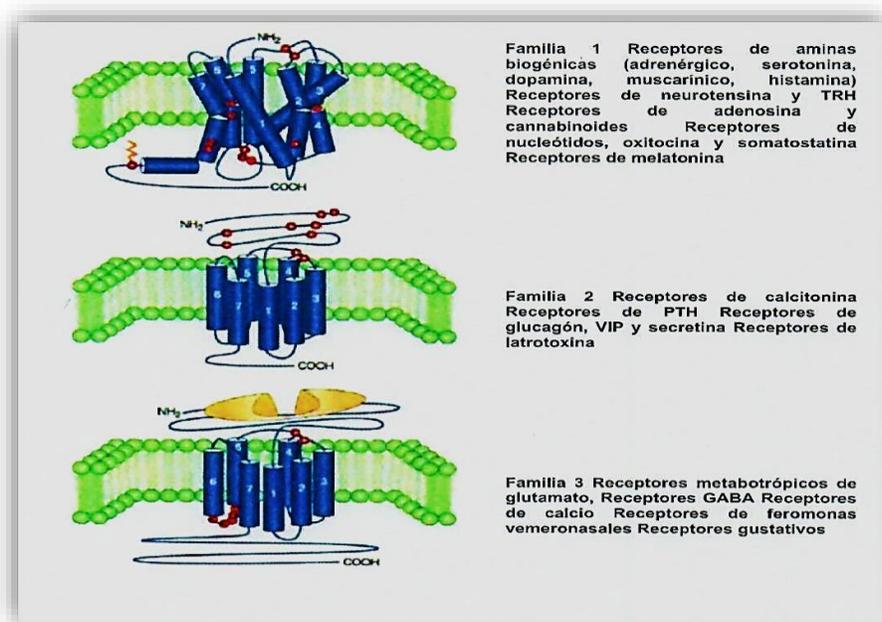


Figura 35. Representación de las tres principales familias de receptores acoplados a proteínas G. . Tomado de Carriba D, P. Heterodimerización de receptores de Adenosina A_{2AR} Dopamina D₂ y Cannabiodes CB₁. Implicaciones farmacológicas y funcionales. Barcelona (2007). Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.

4.4.5 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN^{31,39-50}. Cuando un receptor es activado por un ligando, se inicia una serie de eventos intracelulares que modulan la función celular. Estos eventos dependen de la proteína G a la que se encuentran acoplados y de la maquinaria molecular intracelular. La interacción del ligando con el receptor produce una serie de cambios conformacionales que modifican la estructura de la proteína G, los cuales repercuten en la afinidad de la subunidad G_{α} por $G_{\beta\gamma}$ los nucleótidos de guanina, haciéndola más afín por GTP que por GDP. Al intercambiar GDP por GTP, la subunidad G_{α} se activa y se desensambla tanto del receptor como del complejo estable $G_{\beta\gamma}$. Tanto la subunidad G_{α} como el complejo $G_{\beta\gamma}$ son moléculas señalizadoras de forma que activan o inhiben a moléculas efectoras, como las adenilato y guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, las fosfolipasas A2 y C, la fosfoinositol 3-quinasa entre otras; dando lugar a una activación o inhibición de una gran variedad de segundos mensajeros como el AMPc, GMPC, diacilglicerol (DAG), inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3), fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato, ácidos araquidónico y fosfatídico, por citar algunos.

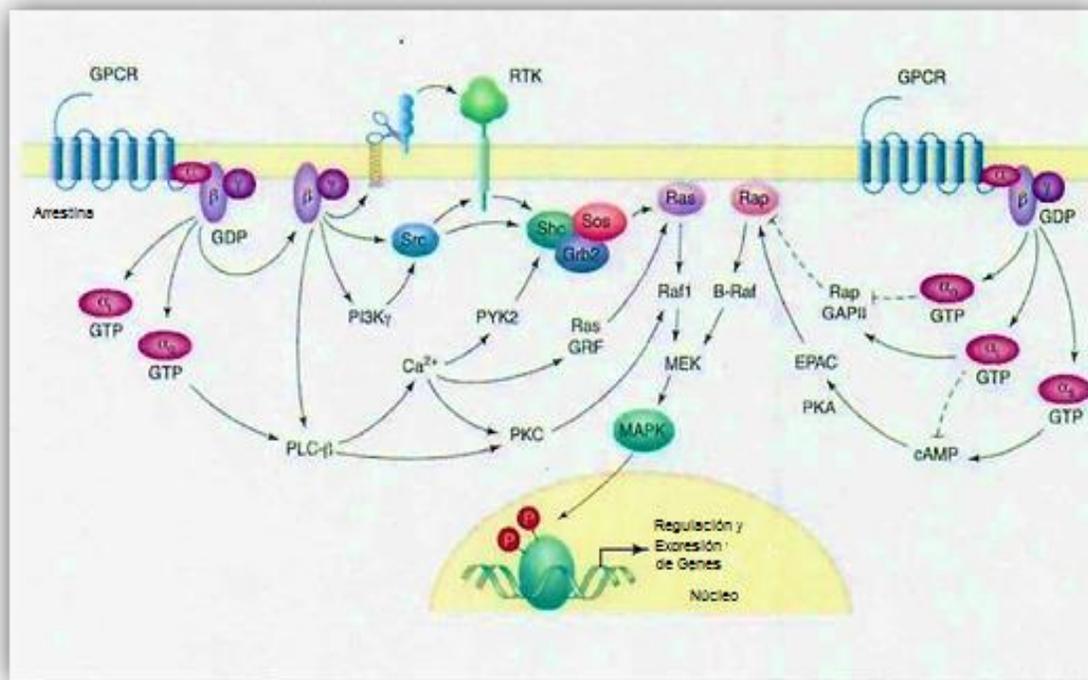


Figura 36. Representación de algunas de las vías que enlazan los GPCR con la vía MAPK. Tomado de Carriba D, P. Heterodimerización de receptores de Adenosina A_{2AR} Dopamina D_2 y Cannabiodos CB_1 . Implicaciones farmacológicas y funcionales. Barcelona (2007). Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.

Muchas de las respuestas mediadas por estos receptores no consisten únicamente en la estimulación de segundos mensajeros convencionales, sino que son el resultado de la integración de diferentes redes de señalización, entre las que se incluyen la vía de las MAPKs y las JNKs.

Existen evidencias que indican que la señalización de los receptores de siete dominios transmembrana es mucho más compleja, ya que pueden activar la vía de las MAPKs a través de vías de señalización dependientes (Figura 34) e independientes de proteínas G. Un ejemplo paradigmático es la señalización mediada por la fosforilación del receptor por GRKs (G protein-coupled Receptor Kinases) la unión de β -arrestinas y el subsiguiente secuestro del receptor de la superficie celular, que no solo es importante para la finalización de la señal, sino que también juega un papel importante en el intercambio entre las vías de señalización dependientes de proteína G e independientes de proteína G e independientes como las utilizadas normalmente por receptores de factores de crecimiento.

En estudios recientes se muestran que las β -arrestinas desempeñan un papel en la señalización celular que va más allá del simple desacoplamiento entre receptor y la proteína, sugiriéndose que las β -arrestinas pueden funcionar como adaptadores o scaffolds reclutando proteínas involucradas en la señalización de un determinado receptor. En la Figura 36 se muestra que las β -arrestinas actúan como scaffolds permitiendo al receptor regular la actividad y la distribución de las kinasas en el interior celular, lo que puede tener unas implicaciones funcionales muy importantes.

Las proteínas andamio o scaffolding proteins o scaffolds, actualmente son consideradas como organizadoras de complejos multiproteicos en diversos compartimentos celulares como por ejemplo las densidades post-sinápticas neuronales y son las responsables de mantener estos receptores en esta localización.

Además de las interacciones receptor-proteínas intracelulares, existen crecientes evidencias de que las interacciones receptor-proteína extracelulares pueden jugar un papel importante en la farmacología de los GPCRs. Un ejemplo es el caso del enzima adenosina desaminasa (ADA), proteína multifuncional que puede estar presente en la superficie de la

célula anclada a diferentes proteínas como receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. Estas interacciones parecen ser esenciales para que estos receptores muestren el estado de alta afinidad por su ligando.

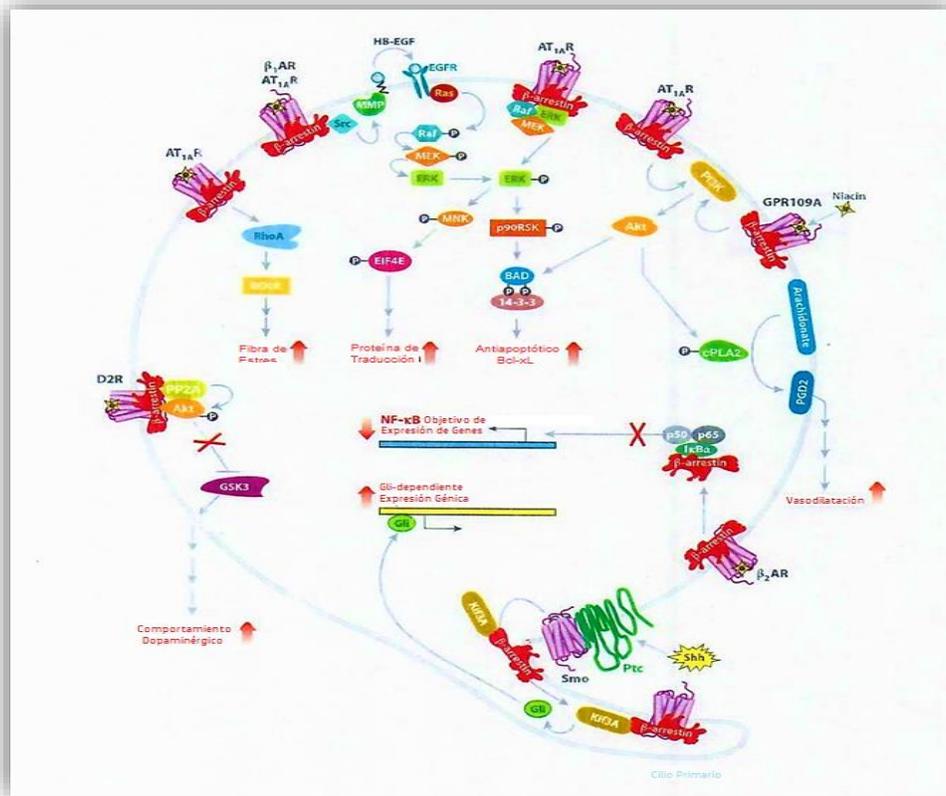


Figura 37. Representación de las β -arrestinas regulando la función y localización subcelular de otras proteínas. Tomado de Reiter et al 2011.

4.4.5.1 ACTIVACIÓN^{9, 31, 53 54.} * Muchos GPCRs tienen cierta actividad basal y pueden activar las proteínas G en ausencia de agonistas. La activación de un GPCR se basa en un cambio conformacional de la estructura terciaria debido a la unión al receptor de un ligando agonista. Después de la unión del agonista, el receptor experimenta cambios conformacionales que afectan la posición relativa de las siete hélices de transmembrana en particular. El receptor pasa de una conformación inactiva a una activa, existiendo una constante de equilibrio entre los dos estados del receptor. La actividad constitutiva que representan estos receptores representa una isomerización del receptor a la conformación

activa en ausencia de ligando. Como consecuencia se promueve el intercambio GDP-GTP en la proteína G acoplada, aumentando así la actividad basal de dicha proteína G y de los siguientes sistemas efectores. Diferentes miembros de la familia de receptores pueden activarse por un mismo ligando.

Esta actividad constitutiva es inhibida por los compuestos denominados agonistas inversos, los cuales actúan sobre el receptor de manera que estabilizan la conformación inactiva y por lo tanto minimizan el intercambio GDP-GTP. Estos compuestos actúan de forma opuesta a los agonistas cuya función es estabilizar al receptor en la conformación activa, y por lo tanto inducir su señalización intracelular. Se ha propuesto la existencia de múltiples conformaciones de los receptores con distintas funciones biológicas. Estas conformaciones estarían estabilizadas por diferentes tipos de compuestos, siendo la más favorable para la señalización aquella conformación del receptor estabilizada por el agonista; seguidas por los agonistas parciales, que serían compuestos con una menor eficiencia para estabilizar el receptor en la conformación más activa y por lo tanto promueven un menor intercambio GDP-GTP. A continuación, vendrían los antagonistas neutros o simplemente antagonistas que no alterarían el equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva, pero con la capacidad de bloquear el efecto de los agonistas y de los agonistas inversos. Por último, estarían los agonistas inversos parciales y los agonistas inversos, que serían capaces de estabilizar al receptor en su estado inactivo en un menor y mayor grado respectivamente, reduciendo la actividad basal o constitutiva del receptor.

En ausencia de un agonista, el equilibrio de la mayor parte de los GPCR se orienta hacia el estado inactivo para evitar la señalización constitutiva, aunque este equilibrio puede variar según el receptor específico. La unión de un agonista desplaza el equilibrio de las GPCR a su conformación activa, en tanto un antagonista inverso es el ligando que desplaza con intensidad al GPCR a su conformación inactiva; un antagonista es un ligando que compete con un agonista para unirse sin desplazar el estado de equilibrio de un GPCR. Casi todos los ligandos endógenos listados anteriormente funcionan como agonistas, mientras que muchos fármacos por tradición se diseñan como antagonistas o agonistas inversos. Existen muy pocos ejemplos de antagonistas endógenos para los GPCR; sin embargo, se conocen

varios moduladores alostérico que modifican o modulan el efecto de un agonista, dando así un área de investigación que en la actualidad aporta oportunidades para el desarrollo de tratamientos cuyo blanco son los GPCR.

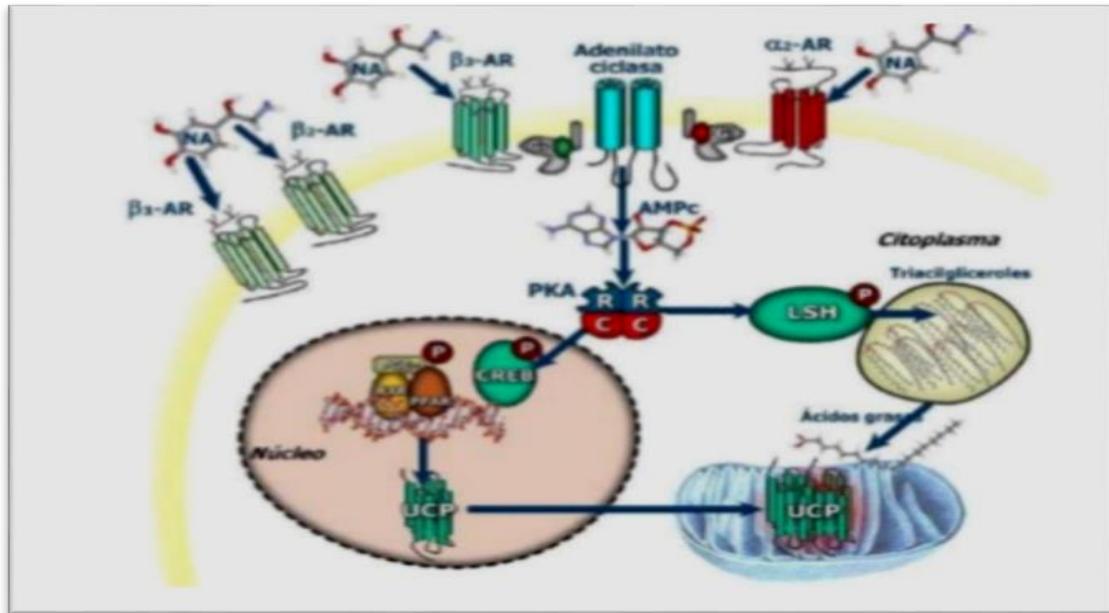


Figura 38. Mecanismo de activación de un GPCR. La mayor parte de los agonistas activa a los GPCR ya sea mediante unión a la superficie extracelular del receptor, con frecuencia a un dominio N-terminal grande, o a un sitio de unión en las hélices transmembrana y que se localiza dentro del plano mismo de la membrana. Tomado de <https://goo.gl/K3SRkm>

4.1.5.2 DESENSIBILIZACIÓN^{4, 9, 55, 56} La rápida atenuación de la respuesta del receptor tras su activación mediante unión de un agonistas se denomina desensibilización, esta es una reducción de su capacidad para responder a la estimulación prolongada, y esto puede suceder en un GPCR de varias maneras, como su habilidad para interactuar con una proteína G y activarla, el secuestro del receptor de tal manera que ya no se exponga al agonista, y la pérdida del receptor por degradación. La desensibilización del receptor puede ser de dos tipos: desensibilización homóloga, cuando la exposición prolongada a un agonista lleva a la disminución de la función de su propio receptor, y desensibilización heteróloga, cuando la exposición a un agonista produce la disminución de función del propio, así como de los receptores. La desensibilización es consecuencia de la combinación de diferentes mecanismos que incluyen 1) el desacople del receptor de las proteínas G por fosforilación del receptor, 2) la internalización del receptor de la superficie celular a compartimientos membranosos intracelulares, y 3) la disminución de la síntesis del receptor.

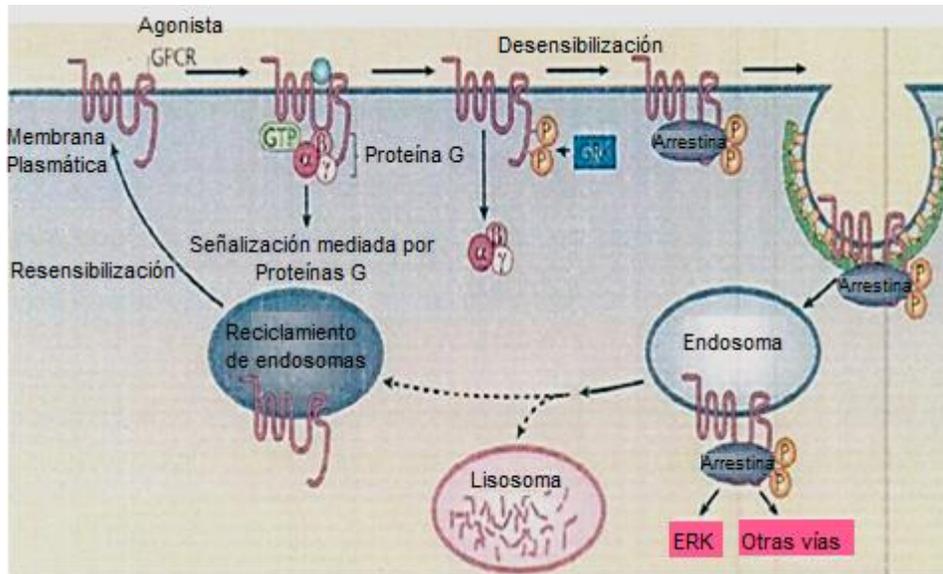


Figura 39. Ejemplo de un modelo de desensibilización, internalización y degradación de los GPCRs. Tomado de Gonzalez G., S. (2012) Receptores de dopamina y heterómeros de receptores de dopamina en la modulación de la neurotransmisión. Tesis de doctorado [en línea] Universidad de Barcelona. Facultad de Biología

El medio más rápido de desacople de los GPCRs de las proteínas G heterotrimericas es por modificación covalente del receptor por su fosforilación por quinzas intracelulares. Tanto PKA y PKC como GRKs (G protein cupled receptor kinase) fosforilan a los GPCRs. Los miembros de la familia GRKs fosforilan selectivamente receptores activados por agonistas. Por el contrario, PKA y PKC no sólo fosforilan a los GPCRs activados por agonistas sino que también a receptores que no han sido expuestos a agonistas (desensibilización heteróloga). La activación de GPCR aumenta segundos mensajeros intracelulares activando las proteínas quinzas PKA y PKC las que a su vez pueden fosforilar los receptores desensibilizándolos.

4.4.5.3 FOSFORILACIÓN Y ARRESTINAS^{5,9} Las GRKs fosforilan a los receptores acoplados a proteínas G en los residuos serina y treonina localizados y tanto en el tercer lazo intracelular como en los dominios de la cola C-terminal. La consecuencia clave de la fosforilación de un GPCR activado por efecto de una GRK es que este proceso promueve la atracción de proteínas arrestinas hacia el receptor. La unión de una proteína arrestina al GPCR (del inglés arrest, detener) detiene la señalización al bloquear la interacción del GPCR con la proteína

G; de esta manera, la señalización se inactiva o desensibiliza, incluso si persiste la presencia del agonista estimulante. Este tipo de regulación es esencial para prevenir una respuesta de señalización dure demasiado. Las arrestinas se dividen en dos grupos en base a la homología de secuencias, función y distribución, y distribución tisular: 1) arrestina visual y arrestina de conos, y 2) β -arrestinas (β -arrestina 1 y β -arrestina 2). Las β -arrestinas se expresan ubicuamente fuera de la retina pero están predominantemente localizados en tejidos nerviosos, concentradas en las sinapsis neuronal y en el bazo. Las arrestinas se unen preferentemente a GPCRs activados por agonistas y fosforilados por GRK. La estructura molecular de la arrestina visual comprende tres dominios funcionales y dos dominios reguladores. Los dominios funcionales comprenden un dominio de reconocimiento del receptor, y un dominio sensor del fosfato, que hace contacto con la porción fosforilada del GPCR. El dominio regulador, está formado por un dominio de unión a clatrina y β 2adaptina. Las arrestinas se unen a la cola C-terminal del receptor.

4.4.5.4 INTERNALIZACIÓN^{9,57-61} La internalización de GPCR es un fenómeno común tras la estimulación por agonista. El tráfico de receptores a compartimientos endosomales permite la desfosforilación y reciclaje del receptor a la superficie celular.

La exposición al agonista promueve la translocación de los GPCRs de la superficie celular hacia un compartimiento intracelular. Este proceso de internalización, conocida como endocitosis, comienza con la invaginación de la membrana que contiene el receptor formando vesículas cubiertas de clatrina. Estas cavidades se desprenden de la membrana plasmática y entran en la célula como complejos macromoleculares de receptores formando vesículas cubiertas de clatrina. Estas pierden su cubierta de clatrina a medida que se internalizan en el citoplasma y su interior se acidifica hasta llegar a un pH5,0. La acidificación promueve la disociación del complejo con liberación del ligando. El receptor secuestrado recupera su función por desfosforilación por la fosfatasa de la vesícula llamada GRP (G protein coupled receptor phosphatase). Para los GPCR, los dos destinos principales del receptor después de la internalización son su movilización hacia los lisosomas para degradación o reclutamiento hacia la superficie celular. La internalización y degradación de un GPCR constituye el mecanismo que permite prevenir la señalización adicional, por lo

menos hasta que se sintetizan receptores nuevos y se restituyen a la superficie celular. Muchos GPCR internalizados pueden reciclarse hacia la superficie celular.

4.4.6 TRANSACTIVACIÓN Y TRANSREPRESIÓN. El mecanismo de acción más común de los receptores nucleares implica la unión directa del receptor nuclear al elemento de respuesta a hormonas. Este mecanismo es referido como transactivación.²⁶

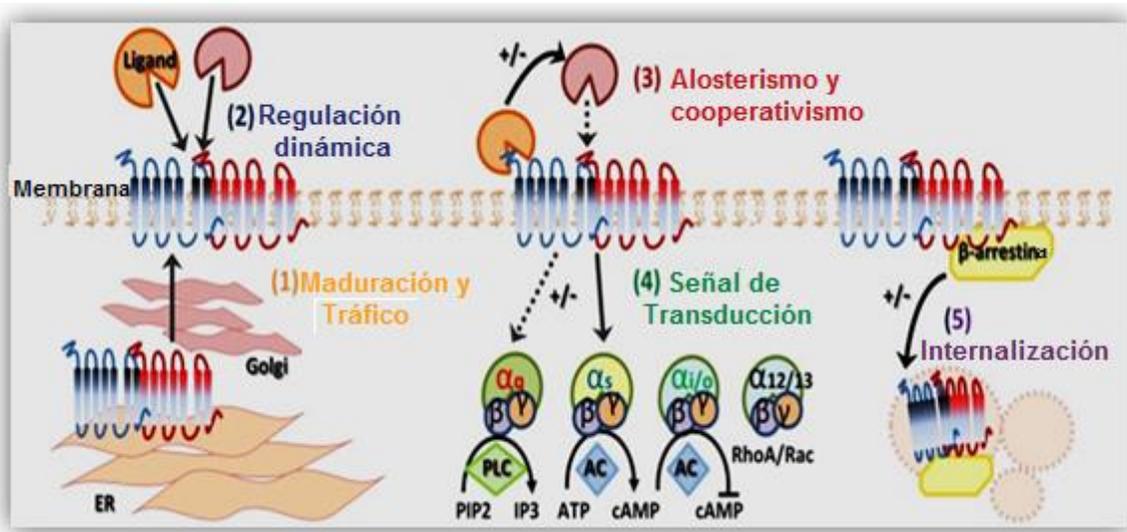


Figura 40. Heterodimerización de GPCRs. La heterodimerización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) tiene varias funciones y consecuencias biológicas. La dimerización del Receptor desempeña un papel en maduración del receptor y el tráfico correcto (1). La unión del ligando específico puede regular dinámicamente la heterodimerización (2) y alostericamente puede mejorar o suprimir la señalización en cascada (3). Además, la heterodimerización de GPCR puede demostrar preferencia al acoplamiento de la proteína G (4). Finalmente, el agonista promueve la endocitosis de GPCR y la co-internalización puede conducir a la atenuación de la señal (5). +/- indica incremento o disminución, respectivamente. Tomado de Front Neurosci. 2013; 7: 148. Published online 2013 Aug 30. Prepublished online 2013 Jul 3. doi: [10.3389/fnins.2013.00148](https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00148)

5.DIMERIZACIÓN DE RECEPTORES^{9, 10, 5,9,62}

El mecanismo preciso de activación de los GPCR no se comprende del todo, pero al parecer un evento clave es que la unión del agonista incita un cambio de orientación de varias hélices transmembrana, lo que conduce a la modificación de la región intracelular del GPCR. Se cree que estos cambios producen la formación de una bolsa de unión óptima para las proteínas G intracelulares heterotriméricas. Además, se reconoció que muchos, si no la mayoría de los GPCR tienen probabilidad de existir como dímeros, ya sea como homodímeros o heterodímeros, y la unión de un agonista podría influir también sobre la dimerización de un GPCR, con lo cual contribuiría a la propagación de cambios de conformación para definir un sitio de unión intracelular para las proteínas G y otras proteínas señalizadoras. Muchos receptores pueden funcionar no como monómeros sino como dímeros o conjuntos oligoméricos. Un ejemplo de dimerización del receptor metabotrópico GABA_B que opera como un heterodímero. Otros receptores como los de glutamato, vasopresina, adenosina, opioides, y aún los receptores β_2 -adrenérgicos y muscarínicos pueden unirse como homodímeros.

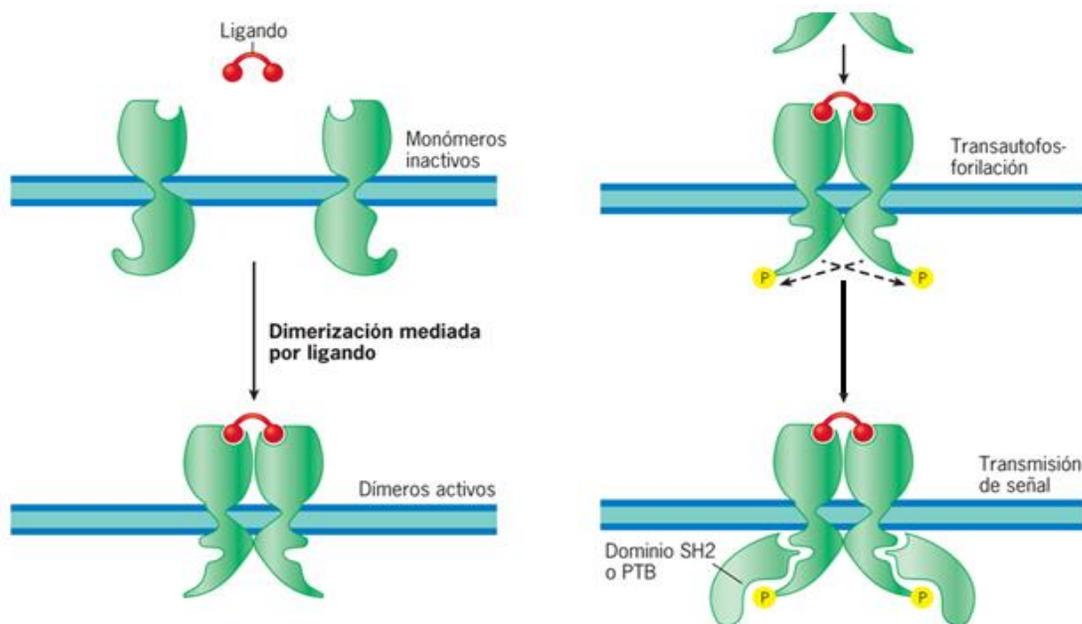


Figura 41. Dimerización mediada por un ligando. Tomado de Karp, Gerard. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. México, D.F. 2014. Mc Graw-Hill Interamericana Editores.

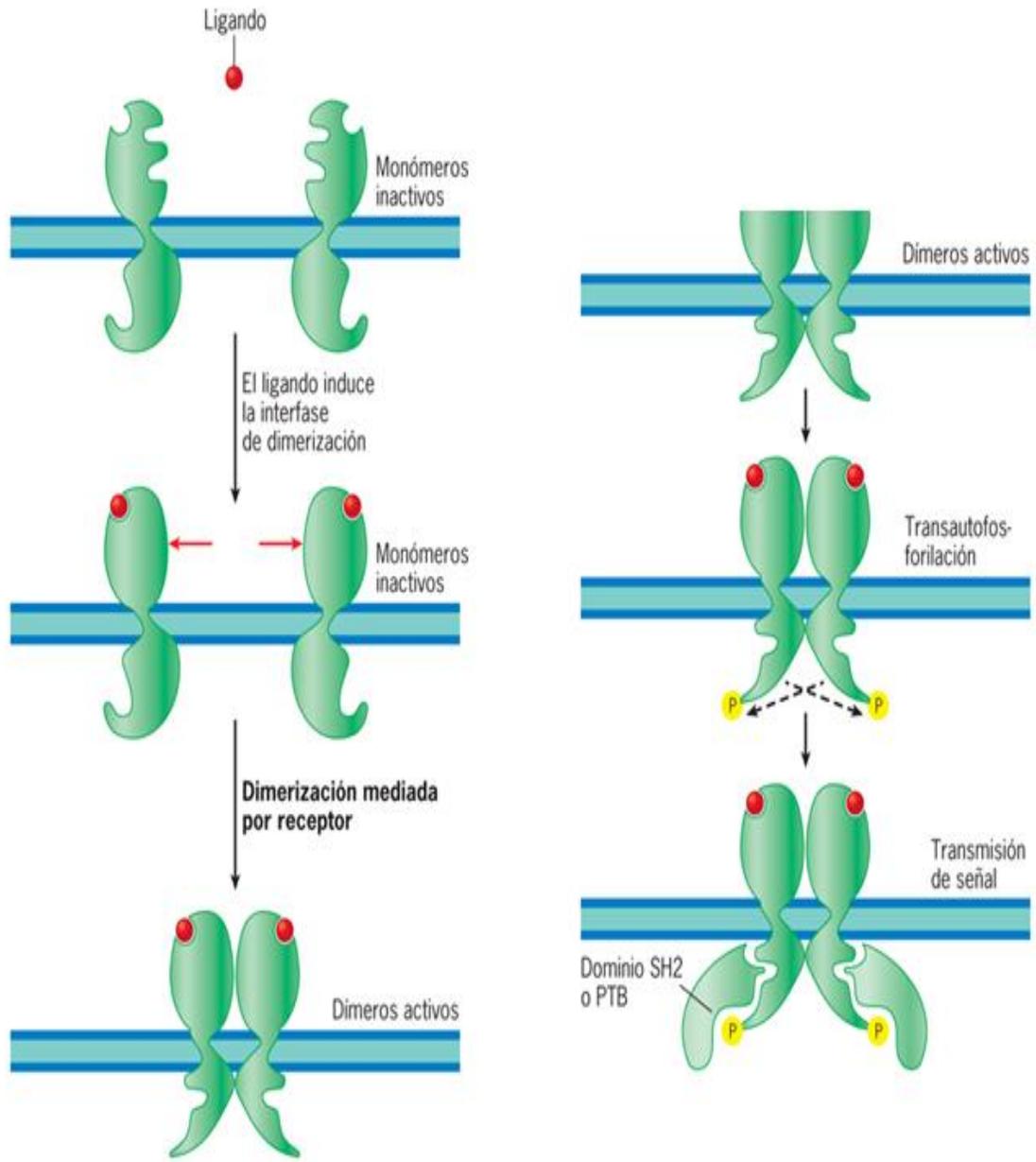


Figura 42. Dimerización mediada por un receptor. Tomado de Karp, Gerard. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. México, D.F. 2014. Mc Graw-Hill Interamericana Editores.

5.1 HETERODIMERIZACIÓN DE RECEPTORES Y EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS⁶³⁻⁶⁶

En la última década, se ha identificado varios mecanismos que regulan la función y las propiedades de GPCRs. Uno de estos mecanismos son las vías de señalización cruzadas entre distintos GPCRs conocido como *cross-talk*. Esto ocurre a menudo como resultado de la interacción proteína-proteína entre tipos de receptores, o 'heterodimerización'. La heterodimerización se está convirtiendo en un importante proceso involucrado en la especialización de la función del receptor. Existen receptores de heterómeros en tejidos seleccionados y, en algunos casos, se ha informado que la heterodimerización regula los procesos patológicos. Estos complejos de receptores representan entidades funcionales, que modulan distintas respuestas biológicas. Estas propiedades sugieren que los heterodímeros de receptores se pueden utilizar como blancos terapéuticos novedosos debido los compuestos que se dirigen a heterómeros específicos son propensos a tener una mejor especificidad y reducción de los efectos indeseables.

5.1.1 INTERACCIONES RECEPTOR-RECEPTOR^{67,68}. El concepto de interacción receptor-receptor se introdujo en la década de 1980, donde los receptores interactúan físicamente, mecanismos alostéricos permiten que surja una actividad integradora intermolecular de los GPCR formando homodímeros, heterodímeros o mosaicos de receptores.

Como consecuencia de este tipo de interacciones intermoleculares de los receptores se puede conducir a cambios en el reconocimiento de agonistas su señalización intracelular debido a una cooperatividad de los GPCR.

Durante la última década diversos descubrimientos han demostrado que el que los GPCRs dimerizen no solo está limitado a la formación de homodímeros, sino que también podían interactuar con otros miembros de la familia de GPCRs para formar heterodímeros. La homodimerización está definida como la asociación física entre proteínas idénticas, mientras que la heterodimerización es la asociación física entre proteínas distintas. Esta asociación puede ser entre dos monómeros para formar dímeros o entre múltiples monómeros para formar oligómeros.



Figura 43. Esquema de formación de un homodímero de dos receptores. **Homodímero.** Se le denomina así al complejo macromolecular formado por dos unidades monoméricas idénticas. Tomado de: Fuxe, K. Marcelino, D. (2008) Heterodimers and Receptor Mosaics of Different Types of G-Protein-Coupled Receptors. Physiology Published23.



Figura 44. Esquema de la formación de un heterodímero de dos receptores. **Heterodímero.** Es un complejo macromolecular formado por dos unidades monoméricas distintas. Tomado de: Fuxe, K. Marcelino, D. (2008) Heterodimers and Receptor Mosaics of Different Types of G-Protein-Coupled Receptors. Physiology Published 23.

La heterodimerización está emergiendo como un proceso importante implicado en la especialización de la función de alguno de los receptores implicados, este tipo de interacción receptor-receptor existe en diferentes tejidos además de que regula procesos patológicos.

Estos complejos de receptores representan entidades funcionales que median distintas respuestas biológicas con ello se han identificado varios mecanismos que regulan la función y propiedades de los GPCR, uno de estos mecanismos es el *cross-talk* entre distintos GPCR.

Estas propiedades sugieren que los homodímeros son nuevos blancos moleculares en la terapéutica de diversas patologías.

Se ha demostrado la formación de dímeros para una gran variedad de receptores, en las Tablas 3 y 4 se describen algunos ejemplos de homodímeros y heterodímeros.

Familia 1	
Adenosina A ₁	Serotonina 5-HT _{1B}
Adenosina A _{2A}	Serotonina 5-HT _{1D}
Angiotensina II AT ₂	Somatostatina SSTR _{1A}
Bradiquinina B ₂	Somatostatina SSTR _{1B}
Dopamina D ₁	Somatostatina SSTR _{1C}
Dopamina D ₂	Somatostatina SSTR _{2A}
Dopamina D ₃	Tirotopina
Histamina H ₂	Vasopresina V ₂
Histamina H ₄	B-adrenérgico
Hormona Luteinizante	
Familia 2	
Melatonina MT ₁	
Melatonina MT ₂	Hormona liberadora De gonadotropina
Muscarinico M ₂	Repta IgG
Muscarinico M ₃	
Familia 3	
Opiode δ	
Opiode κ	GABA _B R ₁
Opiode μ	GABA _B R ₂
Citoquina CCR2	metabotropico de glutamato mGlu1
Citoquina CCR5	metabotropico de glutamato mGlu5
Citoquina CXCR4	Sensor de ca ²⁺

Tabla 3. Ejemplos de homodímeros

Adenosina A ₁ -Dopamina D ₁
Adenosina A ₁ -Dopamina D ₁
Adenosina A ₁ -mGlu1
Adenosina A ₁ -Purinérgico P2Y ₁
Adenosina A _{2A} -Dopamina D ₂
Adenosina A _{2A} -mGlu5
Angiotensina AT ₁ -AT ₂
Angiotensina AT ₁ -Bradiquinina B ₂
Dopamina D ₂ -Dopamina D ₃
GABA _B R ₁ -GABA _B R ₂
Melatonina MT ₁ -MT ₂
Muscarinico M ₂ -M ₃
Opiode δ-β-adrenérgico
Opiode δ-κ
Opiode δ-μ
Opiode κ-β-adrenérgico
Citoquina CCR2-CCR5
Serotonina 5-HT _{1B} -5-HT _{1D}
Somatostatina SSTR _{1A} -SSTR _{2C}
Somatostatina SSTR _{1B} -Dopamina D ₂
Somatostatina SSTR _{1B} -SSTR _{2A}
T1R1-T1R3
T1R2-T1R3

Tabla 4. Ejemplos de heterodímeros

Tomado de Carriba P; et al. *Tesis de Doctorado*. Heterodimerización de Receptores de Adenosina A_{2A}, Dopamina D₂ y Cannabiodos CB₁. Implicaciones farmacológicas y funcionales. Barcelona (2007).

Actualmente hay evidencias de que además de las interacciones intramoleculares, las interacciones intermoleculares entre más de un receptor en la formación de homo- y heterodímeros también son importantes para definir los estados de activación de un receptor. Por tanto se ha propuesto que las interacciones intermoleculares participan en la actividad de los GPCRs. Las interacciones entre GPCRs son cruciales para entender el variado *cross-talk* que se observa, sobre todo entre receptores de neurotransmisores.

5.2 HETERODÍMEROS Y HOMODÍMEROS DE GPCR: NUEVAS PROPIEDADES DE LOS RECEPTORES^{69,70}.

Para explicar el fenómeno de la dimerización de los GPCR se puede considerar dos posibilidades: que estas interacciones sean indirectas o bien directas. En el caso de las interacciones indirectas, éstas son a través de otras proteínas que hacen de puente, como proteínas del citoesqueleto. Las interacciones directas entre miembros de la familia de GPCRs no precisan de otras proteínas. Se cree que en la mayoría de estos casos los oligómeros se pre-forman en el RE, por lo que no son modulables por ligando, entendiendo la modulación como la formación o destrucción del oligómero. La oligomerización, y especialmente la directa, puede conferir nuevas características a los receptores implicados ya que los cambios conformacionales sobre uno de los receptores se transmiten directamente al otro receptor, lo que constituye un nivel más de regulación de las funciones del receptor. En el caso de las interacciones indirectas entre GPCRs hace falta la mediación de terceras proteínas. Los dominios intracelulares de los GPCRs se unen a un gran número de proteínas citosólicas, muchas de estas son proteínas andamio o *scaffolding proteins*, que proporcionan una estructura compleja en la cual diversos receptores pueden interactuar entre ellos y con otras proteínas involucradas en la transducción de señal, controlando la velocidad y la especificidad de dicha señalización.

El concepto de dimerización entre GPCR se refiere a una asociación e interacción física entre dos tipos de receptores, esto representa un mecanismo no esperado para la regulación y función de los GPCR, lo cual nos proporciona nuevos objetivos moleculares en la respuesta fisiológica y fisiopatológica, así como en la terapéutica y uso de nuevos blancos moleculares. Los métodos bioquímicos para el estudio de la dimerización de los GPCR incluyen la coimmunoprecipitación y bioluminiscencia o también conocido como transferencia de energía de resonancia de Foster (BRET y FRET). Recientemente se han usado modelos bioinformáticos para predecir la formación de posibles dímeros entre los GPCR, investigadores han ilustrado la existencia de la formación de los dímeros a través de

crystalografía e incluso se realizan estudios funcionales con la finalidad de conocer la respuesta que se genera por la formación de este tipo de complejos entre receptores.

Un nuevo concepto en la investigación GPCR es la promoción de heterodímeros específicos en las cascadas de señalización que permiten la diversificación de los efectos mediados por el receptor de una manera dependiente del contexto (Figura 43).

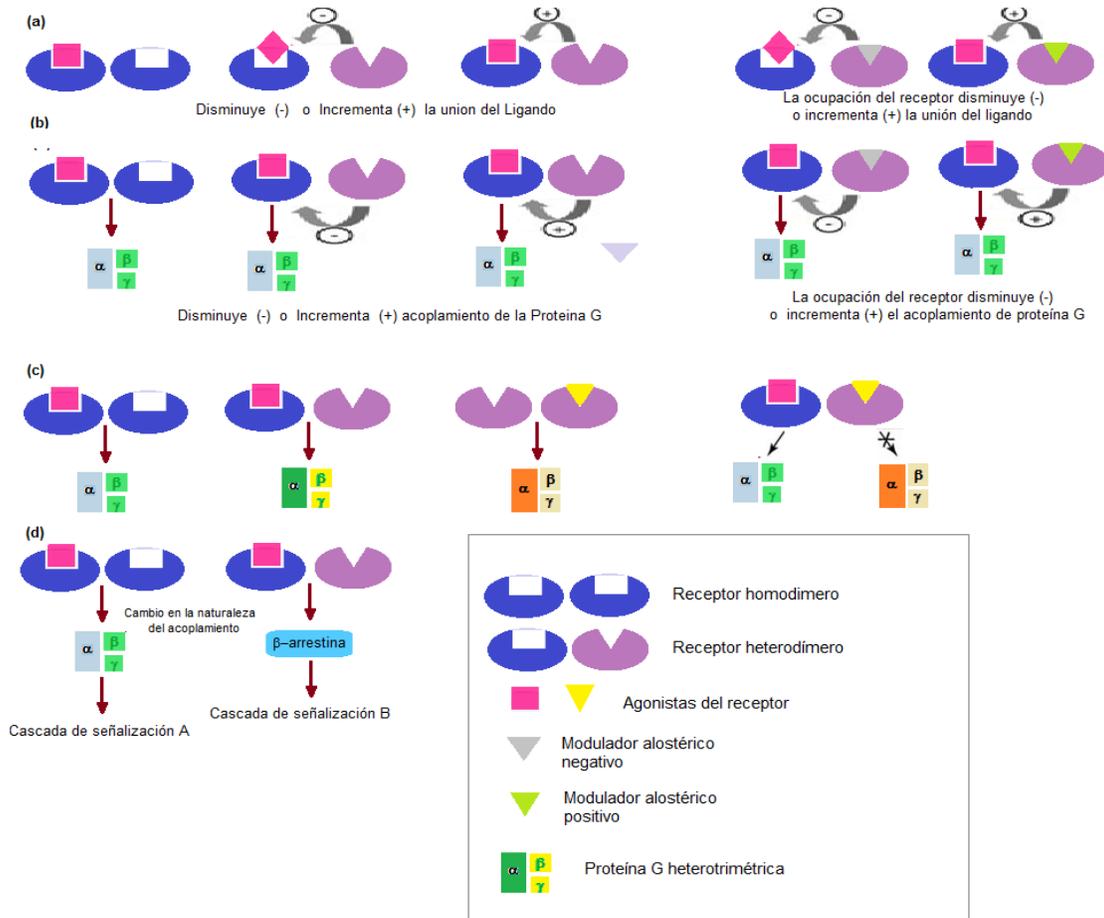


Figura 45. La modulación de la función del receptor por heterodimerización. **(A)** La heterodimerización conduce a la formación de un sitio de unión del ligando alterada. Se muestra de DOR-KOR, DOR-MOR y MOR-sst2A. **(B)** La heterodimerización conduce a una disminución o aumento en el acoplamiento a la proteína G. La disminución de acoplamiento se mostró para el heterodímero DOR-MOR; se muestra el aumento de acoplamiento para $\alpha 2$ -AR-MOR, y AT1R-B2R. **(C)** La heterodimerización conduce al acoplamiento a una nueva proteína G. Se muestra para el heterodímero MOR-DOR acoplamiento a $G_{\alpha z}$; la heterodimerización de dos receptores acoplados de manera diferente conduce a acoplamiento preferencial a una proteína G a co-estimulación. Se muestra de DOR-SNSR-4. **(D)** La heterodimerización conduce a un cambio en el acoplamiento de receptor, a partir de la proteína G a β -arrestina, y la posterior activación de señalización diferencial y factor de transcripción. Se muestra para el heterodímero MOR-DOR. Tomado de Rozenfeld R, Devi LA. Heterodimerización del receptor conduce a un cambio en la señalización: la activación de ERK beta-arrestina2 mediada por heterodímeros receptores opioides mu-delta FASEB J. 2007; 21:.. 2455-2465

5.2.1. CAMBIOS EN LA FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR⁷¹⁻⁷⁸

La modulación de las propiedades de unión de los GPCR que por heterodimerización se ha descrito para varios pares de receptores, se cree que es la consecuencia de una alteración en los enlaces de unión, revelando que algunos ligandos pueden preferir los receptores en su conformación homodimérica o heterodimérica. Por ejemplo, se observó una disminución en la afinidad y potencia de los agonistas selectivos del receptor en el caso de los receptores delta opioide kappa (DOR-KOR), DOR-Mor y receptores de sst2A sst3 somatostatina. Al contrario, se observó un incremento en la afinidad de los ligandos del receptor (AR) β 2-adrenérgicos para los pares de receptores β 1-AR- β 2-AR. Estos estudios indican que la heterodimerización altera las propiedades de unión del ligando a los receptores, pero los cambios en la farmacología del receptor no parecen seguir un patrón común, porque cada par receptor representa una alteración única en la farmacología del receptor. Estos cambios pueden resultar de la modulación alostérica de un solo protómero mediante la unión al otro protómero dentro del heterodímero (modulación positiva o negativa dependiendo de la pareja receptor).

5.2.2 LOS CAMBIOS EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR⁷⁹⁻⁸⁶

Estudios realizados han demostrado que la heterodimerización de receptores conduce a un cambio en el acoplamiento de la proteína G. En muchos casos, la heterodimerización conduce a alteraciones en el grado de acoplamiento a la misma proteína G, pero los hallazgos recientes muestran que, en algunos casos, hay un cambio en la naturaleza de la proteína G acoplada. Un ejemplo bien estudiado de un cambio en el grado de acoplamiento de la proteína G es el heterodímero α 2A-AR-MOR: la morfina inhibe la unión mediada por norepinefrina señalizando a G α i y corriente abajo de la cascada de MAP quinasa. El análisis en Transferencia de Energía de resonancia de Förster (FRET) reveló un cambio conformacional que se propaga desde un receptor al otro, provocando la rápida inactivación del segundo receptor con la cinética por debajo del segundo. Estos hallazgos sugieren que heterodimerización induce un cambio en la conformación del receptor que es responsable de las nuevas propiedades de los receptores.

La heterodimerización también puede resultar en un cambio del tipo de la proteína G acoplada. La heterodimerización entre DOR y receptor-4 sensorial neuronal específico se informó que dio lugar a un cambio de $G\alpha_i / o$ - a $G\alpha_q$ mediada por una vía de señalización. En la heterodimerización entre los receptores de dopamina D1-D2 se encontró que dio lugar a un cambio de un $G\alpha_s / olf$ (D1R) - o $G\alpha_i$ (D2R) - a $G\alpha_q / 11$ una vía mediada y la heterodimerización entre DOR y MOR ha demostrado conducir a un cambio de una $G\alpha_i$ - a una vía mediada por $G\alpha_z$.

Estudios recientes también indican que la activación del heterodímero conduce a un cambio en el reclutamiento de diferentes moléculas de señalización. A su vez, esto conduce a especializar la larga duración del efecto corriente abajo, tales como la activación de distintos factores de transcripción y la expresión génica. La heterodimerización de α_2A -AR con Alfa $2c$ -AR reduce la fosforilación del receptor GRK mediado y el reclutamiento de β -arrestina, que afecta a la fosforilación corriente abajo de Akt. La heterodimerización de MOR con DOR conduce a un cambio de una predominante proteína G mediada por una vía β -arrestina mediada, a su vez resulta en la activación diferencial de los factores de transcripción. El mecanismo subyacente a la activación de nuevas cascadas de señalización por heterómeros aún no se comprende. Un protómero puede funcionar como un andamio para reclutar moléculas de señalización que promueven la señalización distinta del otro protómero, como se propone en el caso de α_2A -AR-MOR. Dicho mecanismo aún no ha sido explorado por otros pares de receptores, pero podría representar un medio general para diversificar la función GPCR.

La heterodimerización de los GPCR conduce a cambios tanto cualitativos, como cuantitativos en el acoplamiento. Este cambio puede ser desde la fuerza de la modulación de una respuesta mediada por un agonista por el cambio de acoplamiento y/o asociación de proteínas G a diferentes procesos de señalización complejos. Estas nuevas propiedades destacan la heterodimerización del receptor como un mecanismo importante que se expande a varios efectos mediados por GPCR, y contribuye a la especificación funcional de los receptores. Esto sugiere que el blanco específico de un tipo de receptor dentro de un heterodímero podría permitir la activación de una vía fisiológica discreta, con efectos

limitados en los otros procesos involucrados en el mismo receptor cuando no está en un complejo heterodimérico.

5.3 FISIOPATOLOGÍA DE LOS HETERODÍMEROS DE LOS GPCRs^{82,87-94}.

En algunos casos, los heterómeros parecen existir constitutivamente en tejidos específicos donde participan para regular un proceso fisiológico. En otros casos, los heterómeros son específicos de enfermedades, haciéndolos atractivos como blancos farmacéuticos. Los heterómeros fisiológicos constitutivos que se han reportado para regular la contractilidad cardíaca son: receptor de angiotensina AT1 (RAT1)-RA-β2 Receptor Adrenérgico, heterómeros que regulan el control de las catecolaminas que median la frecuencia cardíaca. Los heterómeros RA β1-RA β2 regulan la sensibilización y estimulación del agonista y supresión de la actividad espontánea de los RAS β2 en miocitos cardíacos, optimizando la modulación de los -β-adrenérgicos de la contractilidad cardíaca. Estudios recientes apoyan un papel fisiológico para los heterómeros de los receptores post-sinápticos corticales 5-HT2A-R2mGlu porque se cree que la desregulación de cualquiera de los componentes del complejo 5-HT2A-mGluR2 es a través de la predisposición a los pacientes esquizofrénicos a la psicosis.

Los heterómeros específicos de enfermedad, a través de sus novedosas propiedades de señalización, pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. El ejemplo mejor descrito es el del heterodímero RAT1- RB2 bradicinina. Lo característico de estos dos receptores para interactuar es controversial, pero los estudios han demostrado que la regulación a la alza de este par de receptores durante el embarazo tienen un papel principal en la hipersensibilidad inducida por Ang II en la preeclamsia y en el aumento de la respuesta a Ang II por parte de las células mesangiales en la hipertensión experimental. Otro ejemplo es el heterodímero de receptor de prostaglandina PE1-RA-β2 en el músculo liso bronquial; esta heterodimerización conduce a un acoplamiento reducido de AR-β2 a Gαs, por lo tanto, se reduce el potencial broncodilatador del agonista RA-β2 isoproterenol. Esta regulación de la señalización adrenérgica por heterodimerización podría representar un mecanismo adicional que contribuye al asma. Otro heterodímero que podría mostrar una

señalización específica de la enfermedad es el receptor a apelina (APJ)-RAT1; la apelina ha demostrado inhibir el desarrollo mediado por la angiotensina en la aterosclerosis.

En conjunto, estos ejemplos indican que los heterómeros podrían representar nuevos blancos terapéuticos. Si los heterodímeros son específicos de alguna enfermedad, estos complejos se forman o se regulan al alza en un tejido específico sólo durante la enfermedad. Los compuestos que actúan en un complejo de receptores podrían modular una función específica de un receptor en un tejido particular o en un proceso fisiológico. Por ejemplo, el complejo RA β 1-RA- β 2 en lugar de los receptores adrenérgicos individuales es probable que afecte específicamente a los cardiomiocitos. Un heterodímero que existe sólo o regula al alza durante una enfermedad podría incrementar la especificidad del fármaco. Por ejemplo, compuestos selectivos como RAT1- RB2- o APJ-RAT1-, podrían ser utilizados como blancos específicos de los receptores a angiotensina involucrados en el asma y la aterosclerosis, respectivamente, sin afectar a los receptores homodiméricos que no juegan un papel en estas enfermedades. Estudios recientes muestran que una chaperona, RTP4, específicamente aumenta los niveles de heterómeros DOR-MOR en la superficie celular protegiendo el complejo de la ubiquitinación y degradación esto sugiere que los factores que regulan los niveles de heterodímeros podrían servir como blancos terapéuticos adicionales. La Identificación de proteínas y factores involucrados en la formación de heterodímeros podría abrir nuevas líneas para el desarrollo de estrategias novedosas para facilitar y prevenir la expresión de heterodímeros.

5.4 BLANCOS DE LOS HETERODÍMEROS DE LOS GPCR.^{82, 95-111}

5.4.1 Ligando específicos de los heterodímeros. Como se mencionó antes, se cree que la heterodimerización conduce a una alteración de las propiedades de unión del ligando, sugiriendo que la unión alterada podría acomodar compuestos distintos de los ligandos correspondientes. Una prueba de este concepto es para el compuesto 6'-guanidinonaltrindole. Este actúa como un agonista del receptor opioide en el heterodímero DOR-KOR, pero no en cualquier homodímero, sugiriendo que este representa un ligando específico DOR-KOR. Este fármaco tiene efectos diferentes según el sitio de administración.

La administración espinal conduce a la analgesia, apoyando la idea de que el blanco específico tisular selectivo de los heterodímeros de GPCR puede aumentar los efectos locales de los fármacos. Otro ejemplo es que el SKF83959, un agonista D1 que supuestamente se une al heterodímero D1-D2 y activa a la vía $G_{\alpha q}$ en el cerebro. Estos hallazgos indican que los ligandos específicos de heterodímeros pueden también promover o bloquear vías de señalización mediadas por heterodímeros selectivos. Esto sugiere que el blanco de los heterodímeros permite la intervención farmacológica específica para modular la función del receptor específico.

5.4.2 LIGANDOS BIVALENTES. Los heterodímeros del receptor opioide parecen desempeñar un papel en la modulación de las respuestas analgésicas. Con los complejos aislados DOR-MOR de las neuronas de la medula espinal la respuesta MOR fue incrementada por la ocupación del sitio de unión DOR por el antagonista TIPPpsi, en la cual se encontró un aumento de la analgesia inducida por la morfina, y para reducir el desarrollo de la tolerancia a la morfina. Esta propiedad única de los heterodímeros DOR-MOR sugieren que la orientación de ambos receptores podría producir un aumento de la analgesia, mientras que evitan el desarrollo de la tolerancia. El Mdan-18, es un agonista MOR (oximorfona) y el antagonista (NTI) de DOR unido por un espacio, demostró mejorar la actividad anti-nociceptiva comparada con la que se alcanza por la co-administración de los dos ligandos individuales, validando el concepto basado de ligando bivalente los receptores heterómeros.

5.4.3 LIGANDOS MÚLTIPLES. Se han descrito evidencias que indican que la aplicación de tratamientos con ligandos altamente específicos es insuficiente en la modulación de algunos sistemas complejos *in vivo*. Por otro lado, también existen evidencias que señalan la interacción con más de un receptor como una estrategia más efectiva en algunos desórdenes, en contra de la establecida filosofía “un blanco para una enfermedad”. Los primeros fármacos con acción múltiple fueron descubiertos de manera fortuita y su modo de acción se ha ido descubriendo retrospectivamente. Sin embargo, en la actualidad, el diseño deliberado y racional de ligandos múltiples, capaces de interactuar con más de un receptor simultaneo, se ha establecido como una nueva tendencia en el desarrollo de

agentes terapéuticos y moduladores de receptores. El uso de ligandos múltiples presenta cierta ventaja respecto a otras aproximaciones para la interacción simultánea con múltiples dianas, como son los cócteles de fármacos (un principio activo por preparado) o los fármacos multicomponentes (varios principios activos en un único preparado). Si la aplicación de una diana da lugar a resultados insuficientes, la modulación equilibrada de un número pequeño de dianas es más eficaz y da lugar a menos efectos secundarios que los tratamientos con fármacos altamente selectivos. El diseño de este tipo de ligandos consiste en una primera etapa basada en el conocimiento adquirido y focalizada en la interpretación de datos biológicos de fármacos o ligandos antiguos; y en una segunda etapa centrada en la evaluación biológica de estos compuestos, que puede ser masiva (extensas colecciones de biomoléculas) o dirigidas (compuestos de los que se conoce su actividad en una de las dianas).

La aplicación de ligandos múltiples para la regulación de la neurotransmisión en desórdenes del SNC es de especial relevancia, puesto que, en numerosos casos, los tratamientos dirigidos a la interacción con una sola diana han dado lugar a resultados insuficientes. Un ejemplo de esta situación son los desórdenes poligénicos complejos como el ADHD y la esquizofrenia o las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Vendrell y colaboradores derivatizaron la estructura privilegiada del ergoleno con distintos tripéptidos lineales consiguiendo ligandos duales para los receptores de dopamina y adenosina. Se identificaron ergopéptidos (ergoleno-péptidos) con actividad agonista de receptores de dopamina y antagonista de receptores de adenosina cuyo perfil farmacológico indica que podrían ser útiles en el estudio del cross-talk dopamina-adenosina en el SNC y para probar el potencial terapéutico de fármacos múltiples en la enfermedad de Parkinson.

Utilizando las similitudes estructurales entre la fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina) y la rivastigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa) se ha diseñado un ligando múltiple que mantiene la alta afinidad por ambas dianas y puede ser un tratamiento útil en la enfermedad de Alzheimer.

5.4.4 MODULADORES ALOSTÉRICOS. Los compuestos que funcionan como moduladores alostéricos actúan en un receptor y causan un aumento o disminución la respuesta de un receptor asociado dentro de un heterodímero, también representan nuevos candidatos potenciales para apuntar como blancos de efectos específicos de los heterodímeros. La heterodimerización del receptor de adenosina 2A (A2AR) y RD2 conduce a un efecto antagonista recíproco entre los dos receptores. Como consecuencia, los antagonistas de RA2A potencian los efectos de la activación motora de la L-DOPA o de los agonistas del receptor D2 éstos representan moduladores alostéricos prometedores para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Como se mencionó anteriormente, los antagonistas de DOR se intensifica la analgesia inducida por la morfina, al actuar como moduladores alostéricos del heterodímero DOR-MOR, y se potencia la anti-nocicepción de péptidos opioides endógenos o mejoran la acción de los agonistas MOR exógenos tales como la morfina.

Los ligandos clásicos del GPCR modulan la señalización del receptor estimulando directamente la respuesta del receptor (agonismo), bloqueando la unión de los agonistas endógenos (agonismo competitivo), o bloqueando la actividad constitutiva de los receptores (agonismo inverso). Estos ligandos clásicos ejercen sus efectos interaccionando con el centro de unión ortostérico del receptor (el centro que reconocen el agonista endógeno) y esta interacción ha sido caracterizada clásicamente utilizando métodos de unión de radioligandos ortostéricos. En el caso del descubrimiento de fármacos, la mayor parte de la atención se focaliza en la identificación y estudio de moléculas que actúan como ligandos ortostéricos de determinados receptores diana para obtener un efecto farmacológico (la activación o inhibición de la señal de transducción) Estos compuestos compiten con los ligandos endógenos impidiendo la ocupación simultánea del receptor por ambas moléculas.

Se han encontrado que muchos GPCR poseen sitios de unión alostéricos, los cuales son topográficamente distintos de los sitios ortostéricos. La presencia de sitios de unión alostéricos permite numerosas interacciones ligando-receptor, más allá de las asociadas con el sitio ortostérico. Además, los sitios alostéricos pueden estar menos conservados

entre subtipos de receptores que los sitios ortostéricos, proporcionando un medio para conseguir una verdadera selectividad de la acción farmacológica.

Los moduladores alostéricos de los GPCR acostumbran a presentar una o varias de las siguientes propiedades farmacológicas, representadas en la Figura 44: modulación de la afinidad, en general se asume que la interacción del ligando alostérico con su sitio de unión causa un cambio conformacional en el receptor que es transmitido al sitio ortostérico, y viceversa. La cualidad del efecto alostérico se define como modulación positiva si el modulador facilita la interacción o modulación negativa si el modulador inhibe la interacción del ligando con el sitio de unión ortostérico. Modulación de la eficacia, el efecto alostérico puede provocar el cambio de las respuestas intracelulares, lo que conduce a un cambio en la capacidad de señalización (o eficacia intrínseca) de un ligando ortostérico; agonismo/agonismo inverso, el modulador alostérico puede alterar la señalización del receptor en un sentido positivo (agonismo) o negativo (agonismo inverso), independientemente de la presencia o ausencia de un ligando ortostérico.

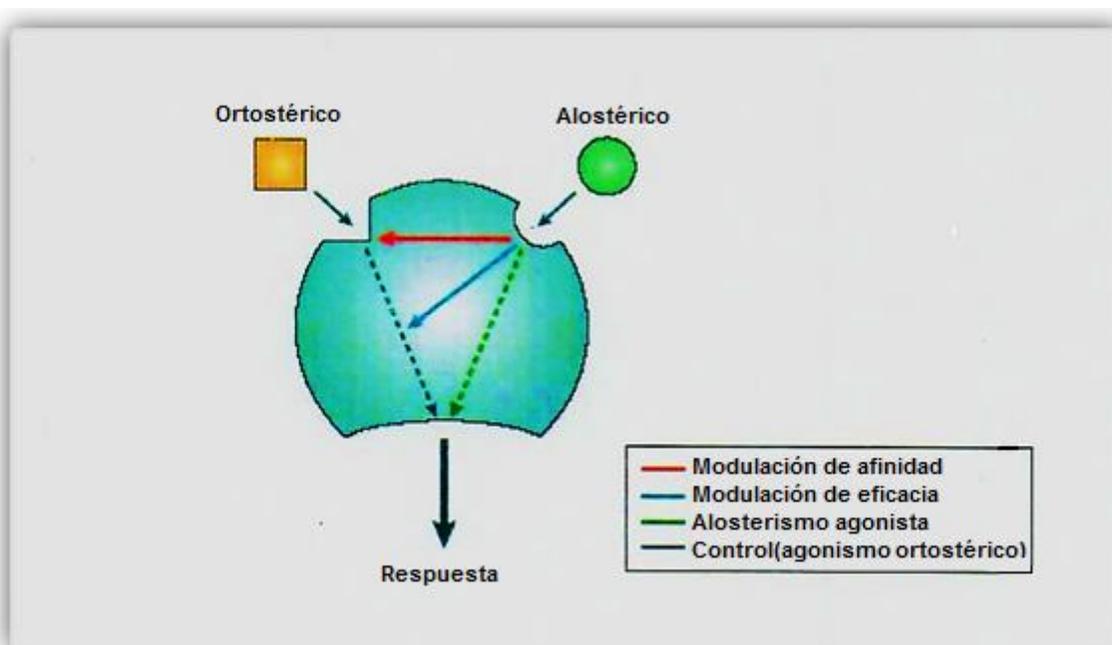


Figura 46. Modos de acción de los moduladores alostéricos. Los ligandos se unen a un sitio topográficamente distinto en el receptor para modular la afinidad del ligando ortostérico (rojo) y/o eficacia (azul). Algunos ligandos alostéricos pueden por ellos mismos alterar directamente la señalización del receptor (verde). Tomado de Conn P J (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. Nat Rev. Drug Discover. 8: 41-54

Al menos tres ventajas terapéuticas se han propuesto que pueden proporcionar los moduladores alostéricos respecto a los ligandos ortostéricos. Primero, el efecto de los moduladores alostéricos es saturable, lo que significa que incluso a altas dosis no sobreestimularía o sobreinhibiría al sistema entero y no se produciría toxicidad. Esta saturabilidad depende del grado de cooperatividad que existe entre el ligando alostérico y ortostérico. Segundo, al menos que el fármaco presente actividades adicionales no-alostéricas o agonismos por ellos mismos, el fármaco alostérico es activo únicamente en los sitios del tejido donde se produce la liberación fisiológica normal del ligando endógeno, y con la misma pauta temporal que el ligando endógeno. Y por último, los moduladores alostéricos pueden ser selectivos de un determinado subtipo de receptor mediante su unión a regiones no conservadas y/o a la cooperatividad con ligandos ortostéricos de un determinado subtipo de receptor.

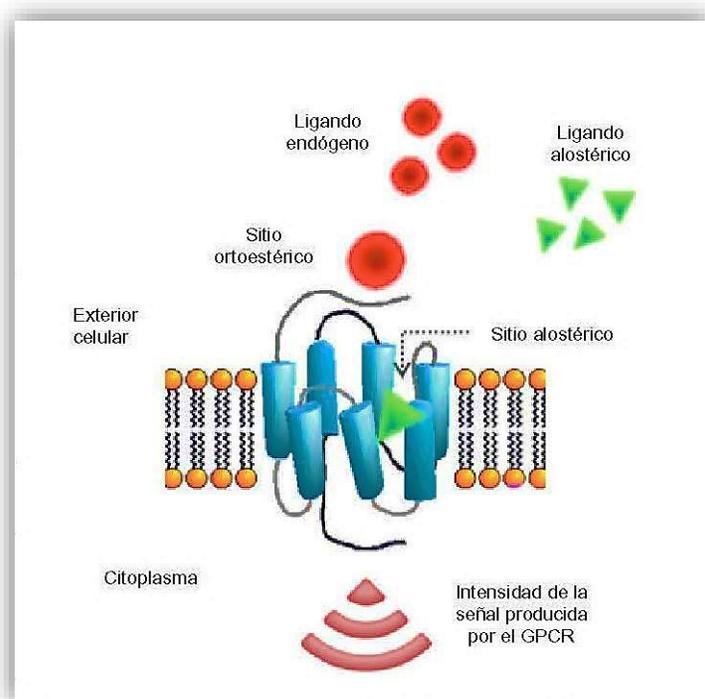


Figura 47. Representación esquemática del fenómeno de alosterismo en GPCRs. Un modulador alostérico positivo aumenta la intensidad de la señal del ligando endógeno, mientras que un negativo la disminuye. (Figura adaptada © Sven Jähnichen/wikimedia commons/ GNU-FDL).

5.5. IMPORTANCIA TERAPÉUTICA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA¹¹²⁻¹²²

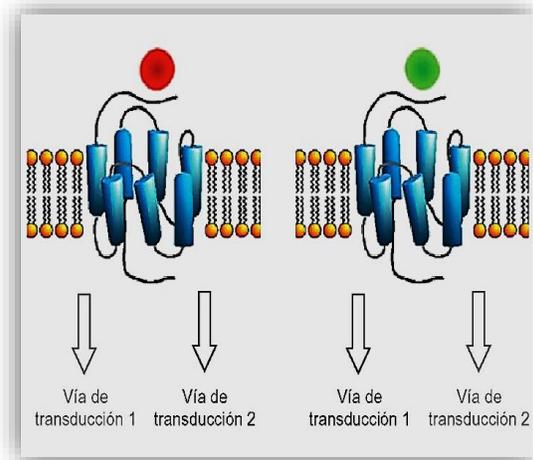
Los GPCR representan la familia de proteínas de mayor impacto social terapéutico y económico. Los GPCRs están involucrados en una amplia diversidad de enfermedades como son: alergias, disfunción cardiovascular, depresión, obesidad, cáncer, dolor, diabetes, y una variedad de trastornos del sistema nervioso central. Dado que los GPCRs representan alrededor del 2% del genoma humano, sólo una porción muy pequeña de todos los GPCRs son actualmente blancos farmacológicos. Por lo tanto, hay mucho interés en la identificación de nuevos receptores que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos. En la Tabla 5 se muestran algunos de los fármacos más vendidos dirigidos a GPCRs.

Acción	Nombre Comercial	Entidad Molecular	Compañía	Indicación terapéutica	Ventas Mundiales (Millones De US\$)
Antagonista de H₁	Allegra/Telfast®	Fexofenadine	Sanofi-Aventis	Alergias	1792
Antagonista de AT₁	Diovan®	valsartan	Novartis	Hipertensión	2214
Antagonista de H₂	Gaster®	Famotidine	Yamanouchi	Úlcera gástrica	656
Agonista de 5HT_{1D}	Imigran®	Sumatriptan	GlaxoSmithKline	Migraña	1454
Agonista de LH-RH	Leuplin/Lupron®	Leuprorelin	Takeda/Abbot	Cáncer	904
Agonista de GABA_B	Neurontin®	GABApentin	Pfizer	Dolor neurológico	2480
Antagonista de P2Y₁₂	Plavix®	Clopidogrel	Bristol-Myers Squibb	Ictus	5277
Antagonista de 5HT₂/D₂	Risperdal®	risperidone	Johnson&Johnson	Esquizofrenia	371

Tabla 5. Algunos de los fármacos más vendidos de GPCR. Tomado de Jacoby et al. (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family ChemMedChem.

Descubrimientos recientes ponen de manifiesto la clara complejidad de los procesos de señalización a través de GPCRs. Así, estos receptores pueden señalar no sólo a través de proteínas G sino también de forma independiente de las proteínas G (Figura 46), como por ejemplo a través de las proteínas denominadas β -arrestinas (Tabla 1). De hecho, hay ligandos que favorecen la activación de una vía frente a la otra (los denominados ligandos “sesgados” o biased ligands).

Figura 48. Representación esquemática del fenómeno de agonismo “sesgado” o *biased agonism*. Distintos ligandos agonistas (representados en rojo y en verde, respectivamente) activan selectivamente vías de transducción diferentes (por ejemplo, señalización a través de proteínas G heterotriméricas a través de arrestinas). (Representación del GPCR adaptada de ©Sven Jähnichen/wikimedia commons/GNU-FD)



Un modelo reciente supone la existencia de diversos estados conformacionales para un GPCR dado de tal modo que un GPCR no existe exclusivamente en dos estados (activo e inactivo), sino en varios. Este modelo propone que cada uno de estos estados conformacionales activa de forma específica una vía de señalización dada, de tal modo que si un ligando favorece una de estas conformaciones frente a las demás, dicho ligando activará específicamente una determinada ruta de señalización. Esta eficiencia de un ligando para inducir específicamente una u otra vía de señalización no está relacionada con la afinidad del ligando ni tampoco con el hecho de que funcionalmente se trate de un agonista total o parcial o inverso o de un modulador alostérico. Puesto que distintas vías pueden tener efectos celulares diferentes, claramente el desarrollo de ligandos sesgados puede ser muy importante en términos terapéuticos con el fin de disociar efectos deseados de aquellos no deseados.

Por ejemplo, la angiotensina II es una hormona peptídica con un potente efecto vasoconstrictor que produce un aumento inmediato en la tensión arterial cuando se une a su GPCR correspondiente y activa la vía de la proteína G heterotrimérica. Por tanto, los antagonistas del receptor de angiotensina están considerados como unos de los fármacos más importantes para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares precisamente porque bloquean este efecto contribuyendo a mantener una tensión arterial baja. Sin embargo, también bloquean, simultáneamente, la señalización a través de la β -arrestina, la

cual tiene efectos beneficiosos citoprotectores y antiapoptóticos. Por tanto, un ligando “sesgado” que bloqueara únicamente la activación de la proteína G y no la de la β -arrestina en teoría debería ser un fármaco que permitiría controlar la tensión arterial manteniendo, al mismo tiempo, efectos de protección celular. Otra aplicación importante la podemos encontrar en el caso de los receptores opioides del sistema nervioso central. Es bien sabido que los ligandos agonistas del receptor μ -opioide están entre los analgésicos más potentes que se conocen debido a su capacidad para activar la proteína G_i a la que están acoplados. Sin embargo, los opioides tienen multitud de efectos secundarios indeseables, entre los que destacan la depresión respiratoria, el estreñimiento y, sobre todo, la aparición de tolerancia, es decir, la necesidad de dosis crecientes de fármaco para obtener el mismo efecto. Todos estos efectos secundarios se deben a la activación de la vía de la β -arrestina y de hecho no aparecen en ratones a los que se ha eliminado el gen de esta proteína (ratones knockout de β -arrestina) .^{15,16} Por tanto, el desarrollo de ligandos sesgados para el receptor μ -opioide capaces de activar únicamente la vía de la proteína G heterotrimérica y no la de la β -arrestina podría constituir un excelente punto de partida para obtener fármacos con una potente capacidad analgésica pero carentes de los efectos secundarios típicos de los opioides.

5.6 FUNCIONES DE LA HOMO- Y HETERODIMERIZACIÓN DE GPCR.¹²³⁻¹⁵⁴ La formación de homodímeros y heterodímeros tiene un papel importante en la regulación de la función de los receptores implicados. Esta regulación tiene lugar a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferirles nuevas propiedades farmacológicas a los dímeros. Tanto la homo- como la heterodimerización de GPCR confiere cooperatividad a la unión de ligandos ya que se ha visto que la unión de un ligando específico sobre un receptor en el homo- o heterodímero puede alterar la unión del ligando específico en el otro receptor, dando lugar a un mecanismo donde un ligando modula la eficacia y/o potencia del otro ligando, es decir la cooperatividad. En la figura 49 se resumen las posibilidades funcionales de la dimerización, tanto mediada por interacciones directas como por indirectas.

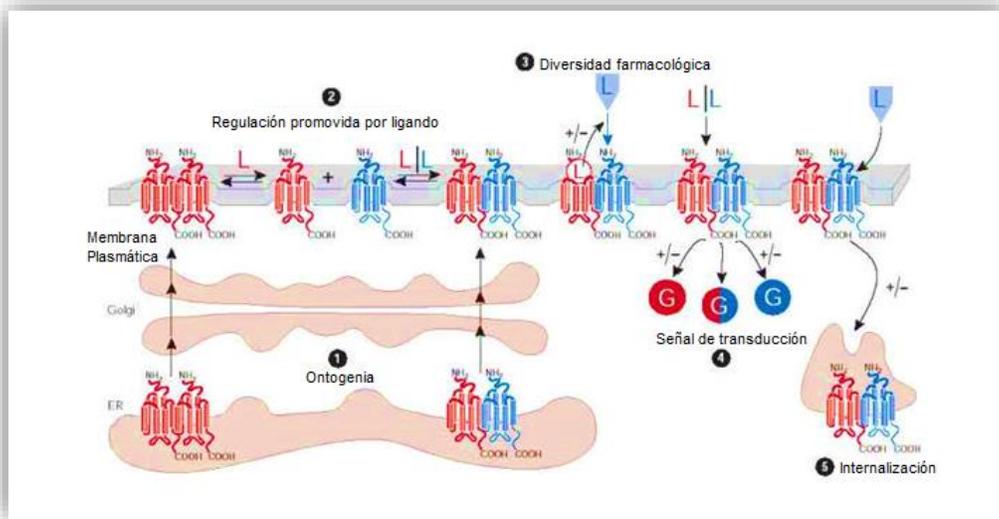


Figura 49. Posibles papeles de la oligomerización de GPCRs. 1. La oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de GPCRs, es decir en el control de calidad del plegamiento y de la destinación a la membrana de receptores. 2. En algunos casos se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando. 3. Se ha constatado que la oligomerización confiere diversidad farmacológica ya que la unión de un ligando específico de uno de los receptores puede verse afectada por la oligomerización, provocando cooperatividad de unión positiva o negativa. 4. La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado logando afectando la selectividad de interacción entre el receptor correspondiente y su proteína G, resultando en una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G. 5. Finalmente, también se ha visto que la oligomerización puede alterar el patrón endocítico para un determinado receptor. Tomado de Terrillon S, Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*:5:30-34. de González S. Receptores de dopamina y heterómeros de receptores de dopamina en la modulación de la neurotransmisión. *Tesis de doctorado*. Barcelona (2012) Universidad de Barcelona.

Se ha encontrado que la formación de heterocomplejos contribuye a la maduración del receptor, el plegamiento y la expresión en la superficie celular mediante la modulación de su orientación o internalización. El heterodímero de CXCR1 y CXCR2 es un ejemplo del papel de la heterodimerización del receptor en su orientación a la membrana plasmática. En la heterodimerización de los receptores β 2-adrenérgico (β 2AR) -delta receptor opioide (DOR), el receptor opioide mu (MOR) -somatostatina 2A receptor (SSTR2A), α 2A-adrenérgico receptor (α 2AR) - β 1-adrenérgico receptor (β 1AR) y receptores α 1A- α 1B-adrenérgicos, basta con la activación de un solo receptor para inducir la internalización de ambos receptores. La heterodimerización de los receptores opioides DOR-kappa (KOR), β 2AR-KOR, β 1AR- β 2AR o β 2AR- β 3-adrenérgico (β 3AR), la activación de un receptor previene la internalización del otro. Otros estudios muestran que la heterodimerización de GPCR puede

modificar la internalización del receptor mediante la determinación de la interacción con β -arrestina.

Una vez en la superficie celular, el cross-talk entre GPCRs puede conducir a los receptores específicos de los perfiles farmacológicos. De hecho, los procesos de unión cooperativa negativos (SSTR2A-somatostatina SSTR3, LH / CGR-TSHR o quimiocina CCR2-CCR5) y positivo (β 1AR- β 2AR) han sido descritos para muchos heterómeros. La heterodimerización de GPCR tiene otros roles funcionales importantes. Los heterómeros pueden regular positivamente la transducción de la señal activada por el receptor D2R-somatostatina SSTR5, receptor de la angiotensina II tipo 1 receptor-bradicinina B2, receptores α 1B- α 1D-adrenérgicos o α 2C-receptor adrenérgico β 2AR. O negativamente (SSTR2A-SSTR3 o melatoninareceptor MT1 receptor GPR50 huérfano). En algunos casos, la heterodimerización puede cambiar la selectividad de un GPCR para diferentes tipos de proteína G o β -arrestina, lo que conduce a la regulación de una nueva vía de señalización. Los heterodímeros de GPCR introducen nuevas propiedades que conducen a una gran complejidad de respuestas reguladoras mediadas por receptores. La complejidad combinatoria introducida por este fenómeno de formación de heterocomplejos dificulta la comprensión y el estudio de los mecanismos biológicos de los GPCR. La existencia de heterodímeros funcionales de GPCR representa tanto un desafío mayor como una oportunidad para la neurociencia y el descubrimiento de fármacos. El número de GPCRs para los cuales la evidencia sugiere un papel funcional de la heterodimerización está aumentando rápidamente. Dado el gran número de genes GPCR, su capacidad para formar combinaciones plantea la posibilidad de que hay decenas o incluso cientos de miles de receptores formando heterodímeros únicos en el cerebro y el sistema nervioso. Elucidar la función de cada uno de estos potenciales complejos de receptores distintos representa un desafío considerable. Por otra parte, esta proliferación de complejos funcionales trae consigo un potencial para desarrollar fármacos dirigidos a heterómeros específicos que han aumentado considerablemente la especificidad terapéutica y redujeron los efectos secundarios. Debido a que GPCRs incluyen muchos objetivos terapéuticos importantes, una mejor comprensión de la heterodimerización GPCR es esencial para comprender la

farmacología de los fármacos potenciales, especialmente en el tratamiento de trastornos neurológicos.

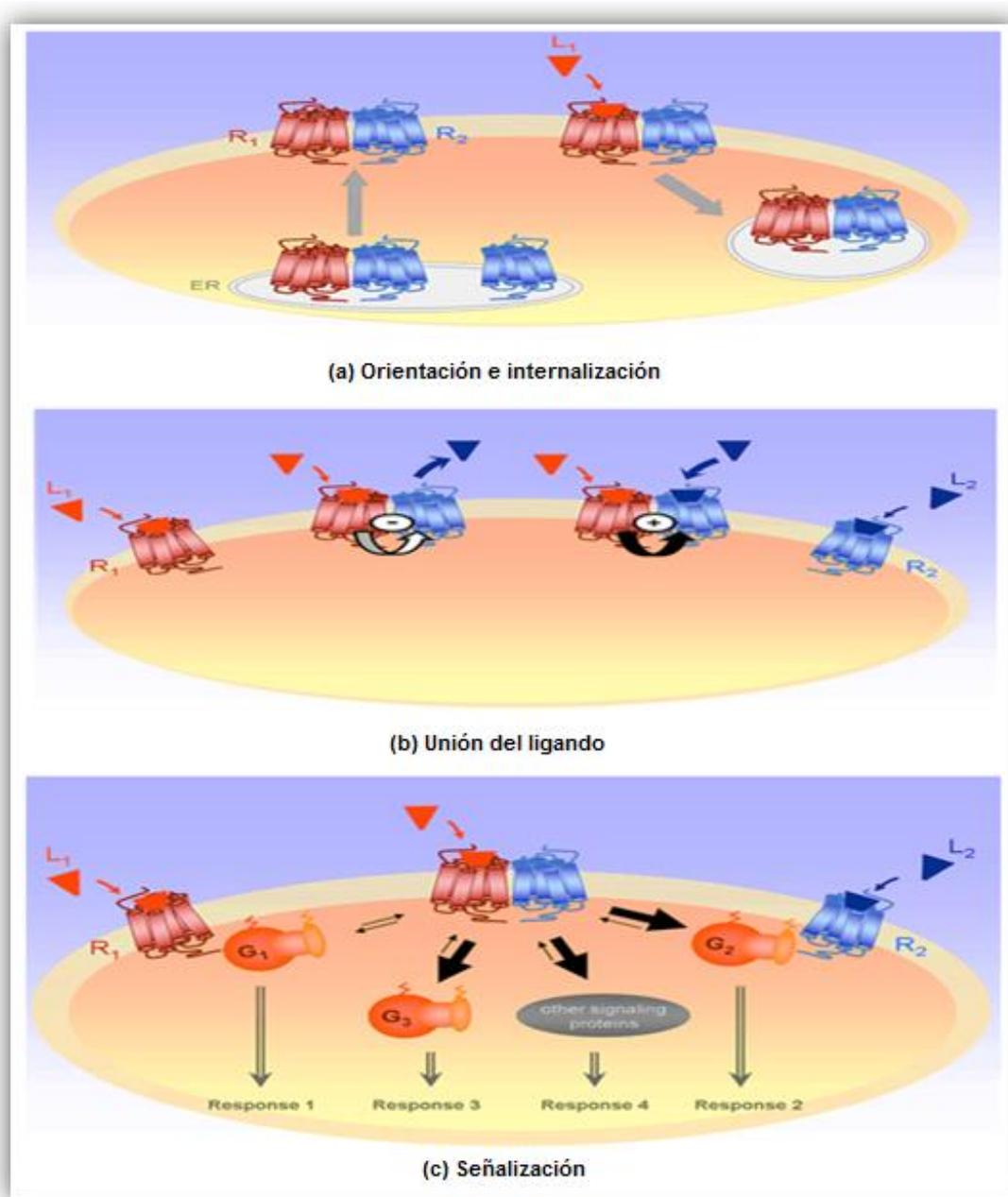


Figura 50. Funciones de la heterodimerización de GPCR.

(A) La heterodimerización se involucra primero en la maduración, plegamiento y expresión del receptor en la superficie celular modulando su orientación desde el retículo endoplásmico o la internalización. (B) En la membrana plasmática, la heterodimerización de GPCR puede inducir unión de ligando cooperativo positivo (+) o negativo (-) que conduce a perfiles farmacológicos específicos. (C) La heterodimerización puede tener un papel funcional promoviendo o atenuando el acoplamiento específico de la proteína G de un único receptor que constituye el heterómero. En algunos casos, esta regulación puede abrirse a una nueva vía de señalización

(a un nuevo acoplamiento de proteína G o a un cambio a otro reclutamiento de proteínas de señalización como el reclutamiento de β -arrestina). (R1: receptor 1, R2: receptor 2, L1: ligando 1, L2: ligando 2, G1: G proteína 1, G2: G proteína 2, G3: G proteína 3, ER: retículo endoplásmico). Tomado de Albizu L, et al (2010) Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. CNS Neurol Disord Drug Targets 9(5): 636–650.

5.7 HETERODÍMEROS DEL RECEPTOR DE ADENOSINA Y DOPAMINA. ^{149,150-185}

Heterodímeros de Adenosina (A1R-A2AR) y Dopamina (D1R-D2R; D1R-D3R; D2R-D3R). Los receptores de adenosina y dopamina están implicados en muchos procesos neurológicos (motivación, placer, cognición, memoria, aprendizaje, control motor) y las alteraciones de su señalización están involucradas en varios trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, la adicción a las drogas y la enfermedad de Alzheimer. Los receptores de adenosina A1R y A2AR y de dopamina D1R y D2R son objetivos principales para los fármacos neurológicos (antipsicóticos o psicoestimulantes) y las investigaciones de sus mecanismos de interacción son particularmente relevantes para la comprensión de su diafonía funcional y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La primera evidencia de dimerización del receptor de adenosina y dopamina se encontró para la adenosina A1R y los homodímeros dopamina D1R y D2R. La colocación de estos diferentes subtipos de receptores en las mismas áreas llevó al estudio de su posible heterodimerización. Recientemente, se han identificado complejos heterodímeros A1R y A2AR en células vivas y terminales nerviosas del estriado combinando BRET (Transferencia de Energía de Resonance Bioluminiscente), FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente) y enfoques de co-immunoprecipitación. Tanto D1R y D2R también pueden formar heterodímeros y estos complejos presentan propiedades específicas de señalización e internalización que son distintos de los de homodímeros D1R y D2R. El heterodímero D1R-D2R está asociado al acoplamiento de la proteína Gq/11 y activa la cascada de fosfolipasa C en el cuerpo estriado, mientras que D1R está acoplado específicamente a la proteína Gs y D2R a la proteína Gi/o. También el heterodímero D1R-D2R cointernalizado después de la activación selectiva de cualquiera de los receptores. Recientemente, D1R se ha demostrado que interactúa en las células vivas con otro subtipo de receptor de dopamina, D3R. Los ensayos de unión en las preparaciones de membrana estriatal muestran modificaciones de las propiedades farmacológicas del receptor, puesto que la activación de D3R aumenta la

afinidad del agonista de D1R. Por otra parte, los efectos de comportamiento mediada por D1R se mejoran cuando D3R se activa sugiriendo la presencia del heterodimero D1R-D3R en estriado. Los heterómeros D2R-D3R detectados en las células vivas y la co-localización del receptor en las neuronas del ácido gamma-aminobutírico striatopallidal (GABA) también son potencialmente relevantes para la fisiopatología y el tratamiento tanto de la enfermedad de Parkinson como de la esquizofrenia.

Debido al *crosstalk* antagonico de adenosina-dopamina en el sistema nervioso central y a la co-localización estriatal de sus diferentes subtipos de GPCR, se ha investigado la existencia de complejos funcionales entre ellos. De hecho, los sistemas de adenosina y dopamina modulan la actividad de las neuronas de las vías estriatonigrales y estriatopalidales. Las neuronas D2R dopaminérgicas expresan A1R y A2AR mientras que las neuronas dopaminérgicas D1R expresan sólo A1R. Basado en experimentos de co-inmunoprecipitación, BRET y FRET, varios grupos han proporcionado pruebas específicas A1R-D1R y A2AR-D2R de la formación de heterodímeros tanto en las células vivas y estriado.

***Heterodímeros de Adenosina A1R-Dopamina D1R.** Los experimentos de co-inmunoprecipitación realizados en células de fibroblastos co-transfectadas con dos receptores proporcionan evidencia de un complejo heterodimérico A1R-D1R, pero no A1R-D2R, que es modulado por ligandos. El pretratamiento de las células con un agonista selectivo A1R aumenta la cantidad de complejo A1R-D1R detectado, mientras que un agonista D1R tiene el efecto opuesto.

En el cerebro, la adenosina y la dopamina antagonizan los efectos farmacológicos y bioquímicos del otro; esto puede resultar en parte de su actividad en el complejo A1R-D1R heterodímero. Los experimentos farmacológicos muestran que los agonistas del receptor de adenosina A1R desplaza el estado de unión a la dopamina D1R de alta afinidad a afinidad baja. A1R expresado en terminales nerviosos dopaminérgicos presinápticos disminuye la liberación de dopamina al inhibir la activación D1R. Los antagonistas A1R conducen a una potenciación de la D1R inducida por la respuesta adenosin monofosfato cíclico (AMPC), un efecto que podría resultar de su regulación de proteínas G que tienen actividades de

compensación. D1R está acoplado predominantemente a la proteína Gs que estimula la adenilato ciclasa y A1R a Gi/o proteínas que tienen efectos inhibidores. Sin embargo, el heterodímero introduce efectos de *crossstalk* que no pueden atribuirse completamente a los efectos de señalización separados de los dos receptores. La coactivación del heterodímero A1R-D1R induce una disminución de la afinidad de D1R para el agonista y la acumulación de AMPc inducida por D1R. Un informe reciente demuestra que la activación de la adenosina A1R mejora la desensibilización de dopamina D1R en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) y este efecto está bloqueado por los antagonistas A1R. Otro estudio muestra que la activación de A1R bloquee D1R desensibilización en células COS-7. Estas diferencias también destacan la importancia del contexto celular; las células HEK293 y COS7 no expresan las mismas proteínas reguladoras tales como las quinasas receptoras acopladas a proteína G (GRK) y la proteína β -arrestina que regulan la desensibilización de D1R. En general, estos datos sugieren fuertemente que el heterodímero A1R-D1R alteran al receptor y ligando, su señalización y mecanismos de desensibilización. A nivel neuronal, los ensayos de doble inmunofluorescencia demuestran una colocalización de A1R y D1R en soma y dendritas de las neuronas corticales. Muchos estudios de comportamiento reportan antagonismo funcional de la adenosina A1R-dopamina D1R. Los agonistas selectivos de la adenosina inhiben los efectos activadores del motor inducidos por los agonistas dopaminérgicos mientras que los antagonistas de la adenosina aumentan el mismo efecto. Además, las últimas descripciones de las propiedades farmacológicas del heterodímero A1R-D1R proporcionan una base para el diseño de nuevos compuestos farmacológicos para tratar la adicción.

Heterodímero serotonina 5-HT_{2A}-glutamato mGluR₂ ¹⁸⁶⁻²⁰⁶. La función de la serotonina en el cerebro está fuertemente asociada con respuestas fisiológicas específicas, que van desde la modulación de la actividad neuronal y la liberación del transmisor a los cambios de comportamiento. El glutamato es el principal neurotransmisor de las células piramidales, que son las fuentes de vías eferentes e interconectadas de la corteza cerebral y los sistemas límbicos. Se ha identificado una interacción física y funcional entre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina y el receptor subtipo 2 del glutamato metabotrópico (mGluR₂) en neuronas

piramidales corticales. Este heterodímero constituye un nuevo e inusual ejemplo de asociación física entre GPCR de diferentes clases, ya que la mayoría de los heterodímeros que se han descrito implican GPCR pertenecientes a la misma clase. Los experimentos de hibridación in situ fluorescente (FISH) mostraron la co-localización de la expresión de *RNAm* de 5-HT₂AR y mGluR₂ en la capa V de corteza somatosensorial de ratón y cultivos primarios corticales de ratón. La evidencia de una asociación de receptores ha sido proporcionada por co-inmunoprecipitación, BRET, FRET, ensayos de unión en sistemas heterólogos y corteza cerebral. El glutamato mGluR₂-serotonina 5-HT₂AR heterodímero representa un ejemplo de asociación GPCR que tiene consecuencias específicas sobre la farmacología, la señalización y la farmacología del comportamiento de los fármacos que actúan en los componentes del receptor. Los experimentos de unión mostraron que un agonista de mGluR₂ aumenta la afinidad de los fármacos alucinógenos para el sitio de unión a 5-HT₂AR, y un agonista de 5-HT₂AR disminuye la afinidad de los agonistas para el sitio de unión a mGluR₂. Los cambios en la unión de alta afinidad causada por el crosstalk mGluR₂-5-HT₂AR sugieren que este complejo puede servir para integrar la señalización del receptor de serotonina y glutamato y modulando el acoplamiento de la proteína G. Farmacológicamente, alucinógenos y no alucinógenos similares de serotonina 5-HT₂AR agonistas provocan cualitativamente diferentes eventos de señalización corriente abajo, como se refleja en el patrón de transcripción de genes que inducen. Más precisamente, los agonistas 5-HT₂AR alucinógenos inducen cambios conformacionales del receptor específico dentro del heterómero mGluR₂-5-HT₂AR que conduce al reclutamiento de vías de señalización mediadas por el 5-HT₂AR cortical específico. Los agonistas alucinógenos 5-HT₂AR inducen a través de la heterodimerización con mGluR₂ la activación de ambas proteínas Gαq / 11 y también Gαi / o, mientras que el 5-HT₂AR y mGluR₂ solo están acoplados a las proteínas Gαq / 11 y Gαi / o, respectivamente (Figura 50). Curiosamente, el heterodímero mGluR₂-5-HT₂AR puede constituir un nuevo objetivo para fármacos antipsicóticos en el tratamiento de la esquizofrenia puesto que los agonistas de mGluR₂ inhiben mediante interacciones alostéricas dentro del heterodímero la señalización Gαi/o específica de alucinógeno mediada por 5-HT₂AR.

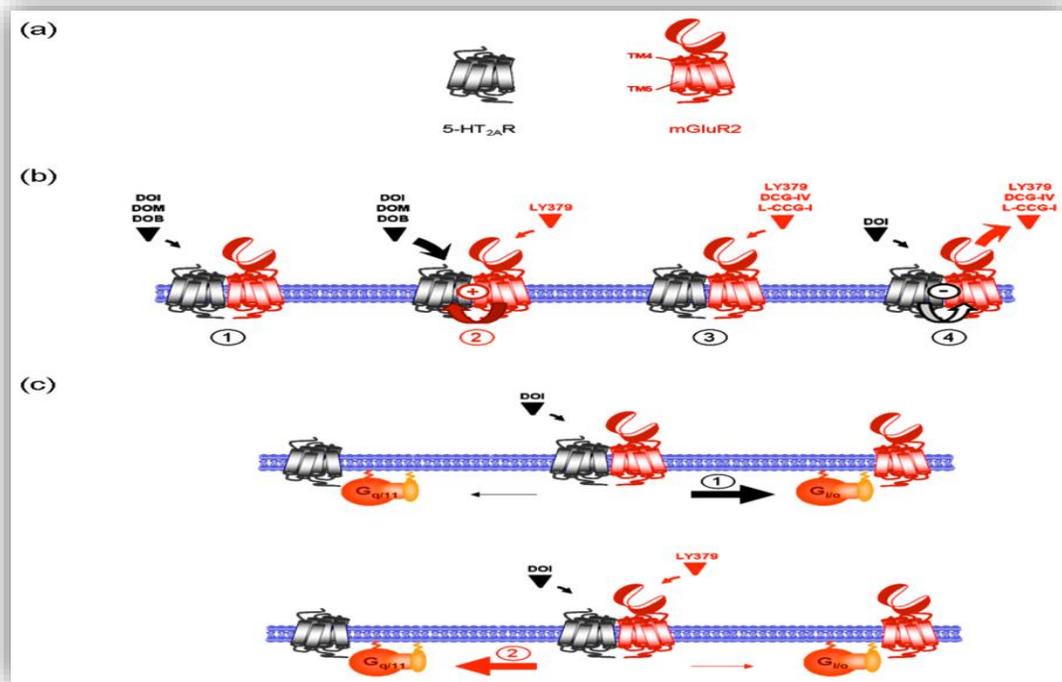


Figura 51. El *crossstalk* entre el glutamato mGluR2 y la serotonina 5-HT_{2A}R resultante de su heterodimerización. (A) La interacción física entre la serotonina 5-HT_{2A}R y el glutamato mGluR2 pertenecientes a las clases GPCR 1 y 3, respectivamente, está mediada por mGluR2 dominios transmembrana 4 (TM4) y 5 (TM5). (B) Las afinidades del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}R (DOI / DOM / DOB) son mayores en presencia del agonista mGluR2 (LY379268) que induce una unión cooperativa positiva dentro del heterodímero (1 y 2). Por el contrario, las afinidades de agonista de mGluR2 (LY379268 / DCG-IV / L-CCG-I) son menores en presencia del agonista 5-HT_{2A}R (DOI) que induce una unión cooperativa negativa dentro del heterodímero (3 y 4). (C) Aunque el 5-HT_{2A}R y el mGluR2 están acoplados principalmente a las proteínas Gq/11 y Gi/o, respectivamente, el heterodímero mGluR2-5-HT_{2A}R estimulado por el alucinógeno (DOI) aumenta significativamente el acoplamiento proteico Gi (1). Este efecto se invierte en presencia del agonista mGluR2 (LY379268) que potencia el acoplamiento proteico Gq/11 (2), lo que sugiere un papel putativo de este compuesto como un fármaco antipsicótico capaz de eliminar efectos específicos inducidos por alucinógeno. Tomado de Albizu L, et al (2010) Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. CNS Neurol Disord Drug Targets 9(5): 636–650.

Las diferencias en la capacidad de mGluR₂ y mGluR₃ para cambiar las propiedades farmacológicas de 5-HT_{2A}R y su estrecha similitud de secuencia fueron la base para identificar los dominios mGluR2 específicos responsables de la formación de heterodímeros. El estudio de una serie de quimeras moleculares del mGluR₂ y mGluR₃ demostró que el segmento que contiene las hélices transmembrana 4 y 5 de mGluR2 es necesario y suficiente para la formación heterodimérica con 5-HT_{2A}R. Estos resultados proporcionan evidencia estructural para la formación de un heterodímero entre miembros

de diferentes clases de GPCR e identifican la implicación de dominios de proteínas específicas en la interfaz de un heterodímero de GPCR.

La expresión de cada componente del heterodímero mGluR2-5-HT₂AR se estudió en el cerebro de pacientes con esquizofrenia. Las densidades de receptores en las membranas corticales de sujetos esquizofrénicos no tratados se alteraron significativamente, mostrando un aumento de 5-HT₂AR y disminución de los niveles de expresión mGluR2. Es posible que esta desregulación de la expresión de 5-HT₂AR y/o mGluR₂ pueda alterar la integración cortical de la señalización de serotonina y glutamato y contribuir a las anomalías del pensamiento y el comportamiento en la esquizofrenia. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el heterodímero mGluR₂-5-HT₂AR integra serotonina y glutamato en la señalización para regular las funciones sensoriales de la corteza, un proceso que se interrumpe en la psicosis. Este complejo merece un estudio adicional de su posible papel en los síntomas de la esquizofrenia y de su potencial como objetivo terapéutico.

5.8 HETERODÍMEROS DE GPCR Y DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS.

94,150,154,169,197-205

Los complejos heterodiméricos de GPCR con propiedades bioquímicas y funcionales únicas proporcionan nuevos objetivos importantes para el descubrimiento de fármacos. Mientras que la identificación de heterodímeros ha complicado la búsqueda de fármacos proporcionando un aumento combinatorio en el número de objetivos, esta complejidad trae consigo una nueva posibilidad para aumentar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios. La heterodimerización del receptor representa un mecanismo directo para el *crosstalk* entre dos señales extracelulares. Los muchos ejemplos emergentes de modificación de las propiedades farmacológicas y de señalización de un GPCR en presencia de otro resaltan la importancia de identificar complejos heterodiméricos apropiados como dianas de fármacos. Las funciones potenciales de los heterodímeros de los receptores opioides en la analgesia y la tolerancia/dependencia del fármaco y de los heterodímeros serotonina/glutamato en los efectos de los agentes antipsicóticos sugieren que los

heterodímeros serán cada vez más importantes como dianas de fármacos para las enfermedades cerebrales y del sistema nervioso.

Actualmente, la mayoría de los ligandos que actúan en heterodímeros son moléculas que se dirigen preferentemente a uno de los componentes del heterodímero (Figura 51). Por ejemplo, se cree que SKF83959 que tiene efectos antiparkinsonianos y actúa en el heterodímero D₁R-D₂R e induce la señalización de proteína Gq / 11 en el cerebro. SKF83959 se une preferentemente al componente D₁R del complejo. Es probable que una serie de ligandos de GPCR que tienen potencial terapéutico (ligandos D₂R, A₂AR, 5-HT₂AR, mGluR₂, mGluR₅, CB₁R y H₃R) ejercen algunos de sus efectos clínicos en enfermedades que van desde el Parkinson a la esquizofrenia a partir de su actividad en heterodímeros. Además, algunos ligandos del receptor de dopamina originalmente descritos como selectivos para un solo receptor pueden ser heterodímeros específicos. Un ejemplo es la l-estefolidina antipsicótica, que es farmacológicamente un agonista D₁R y un antagonista D₂R, que puede actuar específicamente en heterodímeros D₁R-D₂R. De la misma manera, agentes antiparkinsonianos como S32504, ropinirol y pramipexol también representan agonistas selectivos para heterodímeros D₂R-D₃R. Así, aunque los compuestos heterodímeros específicos son más difíciles de caracterizar, su uso podría reducir los efectos secundarios en el tratamiento de enfermedades neurológicas.

5.8.1 DIMERIZACIÓN ENTRE RECEPTORES EN SISTEMA CARDIOVASCULAR.²⁰⁶⁻²¹⁹

Existen por lo menos 4 receptores de Ang II cada uno de ellos con características propias como son: AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄. La Ang II no distingue entre los receptores AT₁ y AT₂ y se une al receptor AT₂ con la misma afinidad que al receptor AT₁ y la acción funcional dependerá por lo tanto de que receptor se encuentre con mayor expresión en el organismo. El sistema Cinina-Calicreína es un sistema de proteínas sanguíneas que participan en la regulación de la presión arterial, los efectos de este sistema son mediados por la estimulación de los receptores B₁ y B₂ al unirse la bradicidina una hormona peptídica que puede ser liberada como consecuencia de algunas enfermedades cardiovasculares. Como respuesta de la unión de bradicidina a su respectivo receptor se genera NO el cual ejerce

importantes efectos en muchos determinantes fisiológicos de la presión arterial, en el estudio de enfermedades cardiovasculares esta molécula al igual que el GMPc son importantes marcadores bioquímicos. Debido a la necesidad sobre un conocimiento a fondo de la fisiopatología de la hipertensión arterial surgen investigaciones en las cuales se involucran a los receptores de sustancias endógenas y exógenas que pueden estar involucradas en la regulación de la presión arterial, así Abadir y col., en el 2006, demostraron en células PC12W que para aumentar la producción de óxido nítrico, existe la formación de un heterodímero entre los receptores AT_2 de Ang II y B_2 de Bradicinina. El resultado del tratamiento combinado entre un antagonista B_2 y un agonista AT_2 fue un incremento del 250% de la formación del heterodímero esta asociación física entre la dimerización de los dos receptores tuvo como consecuencia la actividad de varias vías de señalización con el aumento de la producción de NO y GMPc. Además de que existen otros estudios que comprueban la formación de estos dímeros entre los receptores de Ang II y los receptores de Bradicinina. La heteromerización entre los receptores de angiotensina AT_1 y B_2 de bradicinina mejora la señal del receptor AT_1 mientras que inhibe la del B_2 de bradicinina mostrando que la heterodimerización entre receptores diferentes puede ser un nuevo modelo para la modulación de la respuesta de GPCRs por sus respectivos ligandos.

La activación del receptor de la angiotensina II tipo 2 (AT_{2r}) o la bradicinina B_2 (B_{2r}) aumenta la producción de NO. Recientemente, se ha demostrado una mejora de la producción de NO cuando AT_{2r} y B_{2r} son activados simultáneamente in vivo. Sin embargo, el mecanismo implicado en esta mejora es desconocido. La velocidad de formación de heterodímeros AT_{2r} - B_{2r} es en gran medida una función del grado de expresión de AT_{2r} - B_{2r} . La asociación física entre los receptores dimerizados inicia cambios en las actividades de señalización de la fosfoproteína intracelular que conducen a la fosforilación de la quinasa terminal c-Jun, la fosfotirosina fosfatasa, la proteína inhibidora $\kappa B\alpha$ y el factor 2 de transcripción activante; Desfosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 y p42/44 y el inhibidor de la transcripción 3 del transductor de señal; y el aumento de la producción de NO y cGMP. Controlando la expresión de AT_{2r} - B_{2r} , influyendo en consecuencia su dimerización

biológicamente activa, presenta un potencial objetivo terapéutico para el tratamiento de la hipertensión y otros trastornos cardiovasculares y renales.

El receptor de tipo II de la angiotensina II (AT₂r) media una cascada vasodilatadora que incluye bradicinina (BK), NO y cGMP. BK, la principal hormona efectora del sistema cinina-callicreína, actúa principalmente a través del receptor BK B₂ (B₂r) para mediar la mayoría de sus acciones cardiovasculares y renales. Datos arrojados demostraron que, en comparación con las contribuciones de los receptores individuales, la activación simultánea de AT₂r y B₂r llevó a un aumento del 70% en la producción de NO, sugiriendo la interacción entre estos dos receptores. Sin embargo, el mecanismo molecular que implica la ruta AT₂r-B₂r-NO es desconocido.

El crosstalk es un proceso esencial para los receptores localizados en la membrana plasmática, incluyendo aquellos que implican la superfamilia de los 7 receptores acoplados a la proteína G trans-membrana (GPCR). Está bien establecido que una variedad de receptores de superficie celular interactúan con cada uno Otros para formar dímeros y que esto es esencial para su activación. Estudios recientes demostraron la existencia de homodímeros y heterodímeros de GPCR. La heterodimerización tiene efectos en la unión al ligando, la activación del receptor, la desensibilización y el tráfico, así como la señalización del receptor diferente de la del homodímero u oligómero. La heterodimerización proporciona un nuevo Medios reconocidos de modulación de la función del receptor, así como entrecruzamiento entre GPCRs.

Se reporta la formación de una unidad estable funcional del heterodímero AT₂r-B₂r. Este resultado fue apoyado y reforzado por los resultados de coimmunoprecipitación, lo que indica que los heterodímeros de AT₂r y B₂r activos de alta afinidad eran estables sin reticulación previa, lo que demuestra la resistencia de la asociación física entre los 2 receptores dimerizados. Los datos de C-FRET demostraron la asociación física entre los 2 receptores dimerizados sin ninguna estimulación y sugieren la presencia de heterodímeros constitutivos. Es posible que se formen homodímeros o incluso heterotetradros de AT₂r, B₂r y angiotensina II tipo 1 (AT₁r).

La velocidad de formación del heterodímero AT₂r-B₂r parece estar regulada en gran parte por el estado de expresión de AT₂r y B₂r. El tratamiento con agonistas y / o antagonistas a AT₂r o B₂r durante 30 minutos para influir en el estado de actividad del receptor sin cambiar el nivel de expresión del receptor no afectó el nivel de formación de heterodímeros, lo que sugiere que la activación del receptor no contribuye principalmente al nivel de formación de heterodímeros. Se ha reportado un incremento en la expresión de receptores AT₂ y / o B₂ fue acompañado consistentemente por un aumento en la formación de heterodímeros después de la administración de diferentes agentes farmacológicos durante 24 horas. Observando que los agentes farmacológicos que aumentan un tipo de receptor afectan de manera similar a la expresión o formación de dímero del otro receptor, o ambos, a diferentes niveles. Este hallazgo es consistente con estudios recientes que examinaron los efectos de la angiotensina II sobre la regulación de los receptores B₂. Lo contrario también se observó entre la AT₁r y la terapia génica de la calicreína.

El aumento máximo de la formación de heterodímeros AT₂r-B₂r se observó como resultado del tratamiento combinado de un agonista de AT₂r y un antagonista de B₂r, incrementando cada uno individualmente la expresión de ambos receptores e induciendo un aumento del 250% en la formación de heterodímeros. Es posible que el aumento en la formación de dímeros con el tratamiento de PD pueda ser debido a una conversión incrementada de monómero a dímero. Sin embargo, el monómero no aumentó con el tratamiento de PD. Además, se observó una disminución en B₂r dímero y monómero en respuesta a PD. Aunque el bloqueo B₂r aumentó sustancialmente la expresión de AT₂r y B₂r, sólo aumentó ligeramente la formación de heterodímeros AT₂r-B₂r. En la actualidad, se desconocen los mecanismos subyacentes a la diferencia entre el antagonista B₂r frente al agonista AT₂r con o sin antagonista B₂r en la formación de dímeros observada en el presente estudio. Es de notar que la estimulación AT₂r siempre estuvo asociada con una mayor formación de dímeros. Por lo tanto, los factores que influyen en la expresión de AT₂r y la actividad pueden desempeñar un papel más importante en la formación de dímeros que los factores que afectan la expresión B₂r. La dimerización ocurre en función del número de receptores, pero

también requiere la activación de AT₂r. Esto explica por qué el icatibant solo aumenta la expresión de B₂r y AT₂r pero ni la formación de dímeros ni la producción de NO o GMPc.

5.9 OBJETIVOS DE FÁRMACOS ESPECÍFICOS PARA HETERODÍMEROS GPCR. ²²⁰⁻

224

Un enfoque diferente es el desarrollo de ligandos bivalentes vinculante ambos componentes individuales del heterómero (Fig. 50). Estos compuestos contienen dos diferentes ligandos de GPCR (dos agonistas, dos antagonistas o uno de cada uno) que están unidos a través de espaciadores de aminoácidos. Un estudio reciente describe el desarrollo de nuevos antagonistas del receptor adenosina A₂AR antagonista - dopamina D₂R aglutinante bivalente útil para la detección del heterodímero A₂AR-D₂R. En vista de los antagonistas A₂AR selectivos y de los agonistas D₂R como compuestos antiparkinsonianos, la acción bivalente adenosina / dopamina podría usarse para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mejorando la especificidad y la eficacia. Además, los ligandos GPCR que actúan como moduladores alostéricos representan otra herramienta terapéutica potencial para dirigirse a las entidades receptoras heterodiméricas.

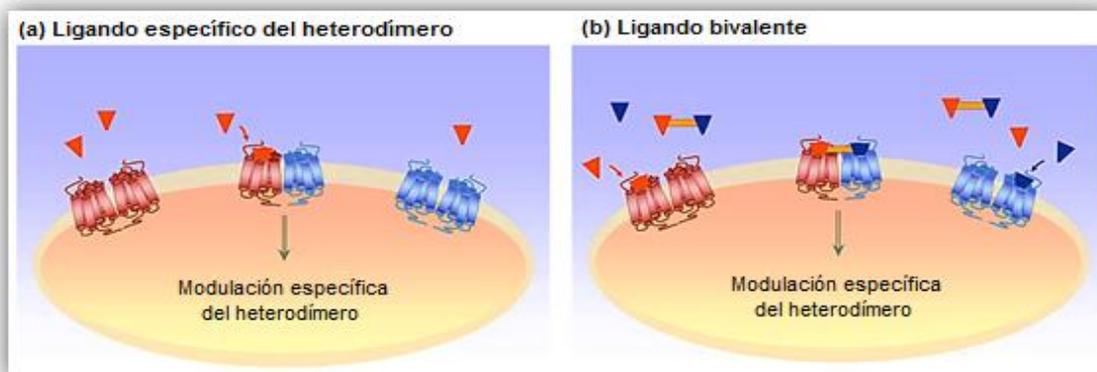


Figura 52. Objetivos de fármacos específicos para heterómeros GPCR (A) El direccionamiento específico de un GPCR sólo está implicado en una formación heteromérica. En cuanto a heterómeros receptores involucrados en enfermedades neurológicas, antiparkinsoniano SKF83959 [178] y antipsicóticos l-stepholidine [179] son específicos para D₁R-D₂R heterómero mientras que antiparkinsonianos S32504, ropinirol y pramipexol son específicos para D₂R-D₃R heterómero [59]. (B) Los ligandos bivalentes modulan específicamente heterómeros uniendo ambos GPCR. El antagonista A₂AR de adenosina - ligando bivalente agonista de dopamina D₂R específico para el heterómero A₂AR-D₂R podría ser utilizado como un potente agente antiparkinsoniano Tomado de Albizu L, et al (2010) Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. CNS Neurol Disord Drug Targets 9(5): 636–650.

6. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA DE HOMO- Y HETERODIMERIZACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A

PROTEÍNAS G 225-229,164, 330,331, 177,125, 332-342, 139, 167, 343-354

Las técnicas utilizadas para el establecimiento de la formación de homo- y heterodímeros de GPCRs son de índole muy variada, como técnicas farmacológicas, utilización de quimeras, aproximaciones bioquímicas y técnicas de biofísica. A menudo la demostración de la oligomerización de GPCRs requiere la utilización de algunas o incluso todas ellas.

Los estudios farmacológicos pueden constituir la primera evidencia de la existencia de homodímeros entre GPCRs en aquellos casos en los que se detecte tanto cooperatividad positiva como negativa en la unión de ligando. El fenómeno de la cooperatividad no puede ser explicado considerando la existencia de distintos estados de activación de los receptores monoméricos en equilibrio. La manera más simple de explicar la cooperatividad requiere la formulación de un modelo que considera la forma dimérica del receptor y explica la cooperatividad de manera natural por analogía con los enzimas. Por otro lado, una evidencia farmacológica contundente de la existencia de heterómeros la constituyen los cambios cinéticos en la unión de ligandos a un receptor provocados por la unión de ligandos al otro receptor en el heterómero, en preparados de membrana de células o de tejidos que expresen los receptores. En preparaciones de membrana aisladas no existe ninguna maquinaria celular que pueda producir un cross-talk indirecto (por ejemplo, un cross-talk a nivel de segundos mensajeros) y la existencia de una modulación a nivel de unión de ligandos sólo puede ser explicada mediante una interacción molecular entre ambos receptores. En estos casos la unión de un ligando a un receptor induce cambios conformacionales en el otro receptor que modulan su capacidad de unir ligandos. Estos cambios conformacionales sólo se pueden producir si ambas proteínas interactúan molecularmente.

En los últimos años, una de las aproximaciones bioquímicas más usadas para el estudio de la dimerización de GPCRs ha sido la coinmunoprecipitación de receptores diferencialmente

marcados. El primer estudio que se llevo a cabo utilizando esta aproximación fue realizado por Herbert y colaboradores en el cual demostraban la existencia de interacciones específicas entre los receptores β_2 -adrenérgicos. Desde entonces, se han utilizado estrategias similares para documentar la homodimerización de receptores D_2 de dopamina, receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGluR₅) y otros. Más recientemente, se han efectuado experimentos de coinmunoprecipitación para demostrar la existencia de heterodímeros entre receptores relacionados, como los subtipos GABA_{BR1} y GABA_{BR2} y menos relacionados como los receptores de adenosina A₁ y D₁ de dopamina, los receptores de angiotensina AT₁ y Bradikinina B₂, el de δ -opioide y de β_2 - adrenérgico. Aunque las coinmunoprecipitaciones y los análisis por western-blot son bastante convincentes requieren de la solubilización del receptor de la membrana, lo que no permite descartar que los dímeros observados puedan ser artefactos debidos al tratamiento con detergentes, considerando la naturaleza hidrofóbica de estas proteínas. A pesar de todos los controles usados para descartar esta posibilidad, la aceptación generalizada de la dimerización de GPCRs permanecía pendiente de una demostración directa de que estos complejos existen en células vivas. Esto fue posible con el desarrollo y la utilización de métodos biofísicos basados en la transferencia de energía por resonancia.

Estas aproximaciones están basadas en la transferencia no radiactiva de energía de excitación entre un dador energético y un aceptor. En el caso de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer), tanto el dador como el aceptor son moléculas fluorescentes, mientras que en la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer) el dador es bioluminiscente y el aceptor fluorescente²³¹⁻²³⁴. Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. El primero, que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor se solapen, de forma que el dador no emite completamente la energía que debiera, si no que transfiere parte de su energía al fluoróforo aceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. Y el segundo, que la distancia entre el emisor y el aceptor sea menor o igual a 100 Å. Esta dependencia crítica de la distancia entre dador y aceptor para la transferencia de energía hace que los sistemas

de BRET/FRET sean los elegidos para monitorizar las interacciones proteína-proteína en cultivos celulares.

Para la técnica de FRET se utilizan las diferentes variantes de la proteína verde fluorescente (GFP: Green Fluorescence Protein) obtenidas por mutación. Estas mutaciones confieren diferentes propiedades espectrales, de forma que, utilizando dos formas diferentes de mutantes con las características espectrales adecuadas, fusionadas a las proteínas en estudio, permite determinar si estas están lo suficientemente cercanas como para transferirse energía. La pareja más ampliamente utilizada para los experimentos de FRET son las variantes YFP (Yellow Fluorescence Protein) y GFP². Esta última variante de la GFP ha sido optimizada para ser usada como pareja de FRET con la YFP. La GFP² se excita a 400 nm y emite a 510 nm, mientras que la YFP se excita a 485 nm y emite a 530 nm. De esta forma, tal y como se muestra en la Figura 52, la excitación de las células que expresan la proteína de fusión receptor-GFP² con un láser de una longitud de onda de 393-403 nm, produce la emisión de energía a 510 nm, que es capaz de excitar a la proteína de fusión receptor-YFP, cuya emisión a 530 nm es cuantificable. Debido a que hay cierto solapamiento entre los espectros de emisión de ambas proteínas de fusión, es necesario separar los dos espectros de emisión para cuantificar la señal de FRET.

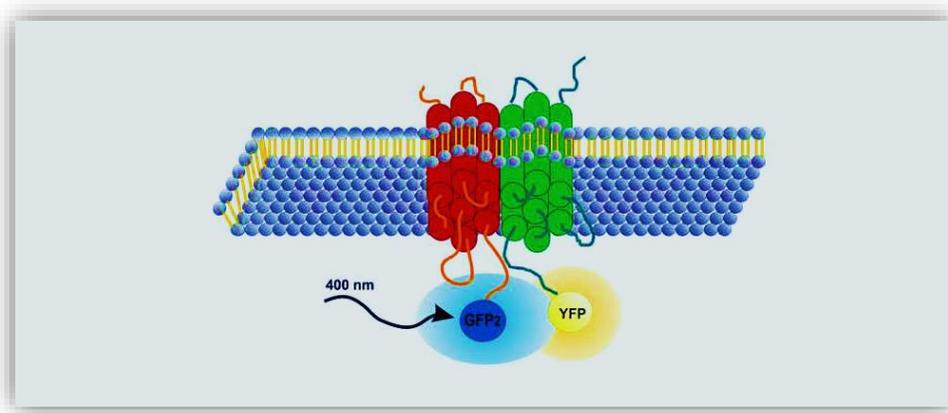


Figura 53. Representación esquemática del fenómeno de FRET. Tomado de González S. Receptores de dopamina y heterómeros de receptores de dopamina en la modulación de la neurotransmisión. Tesis de doctorado. Barcelona (2012) Universidad de Barcelona.

En la técnica de BRET se utiliza el enzima Renilla luciferasa (Rluc) fusionado a uno de los receptores. Se produce la degradación catalítica del sustrato coelenterazina H por la luciferasa en presencia de oxígeno, de forma que se genera luz que al ser transferida a una variante de la proteína GFP fusionada al otro receptor, ésta emite fluorescencia a su longitud de onda característica si ambas proteínas están lo suficientemente cercanas. En el estudio de la dimerización de GPCRs, se generan proteínas de fusión que consisten en la unión de la proteína fluorescente GFP o sus variantes (por ejemplo, YFP) en el extremo carboxi terminal de un receptor y la proteína luminiscente Rluc en el extremo carboxi terminal del otro receptor y, al igual que en la técnica de FRET, se co-expresan ambas proteínas de fusión en células vivas. Como se muestra en la Figura 52a, en ausencia de dimerización la adición del sustrato coelenterazina H genera una señal bioluminiscente característica, mientras que, como se muestra en la Figura 52b, si se produce dimerización entre ambos receptores, la energía es transferida de la RLuc a la proteína fluorescente, dando lugar a la aparición de una señal adicional fluorescente con un pico de emisión característico de la variante usada.

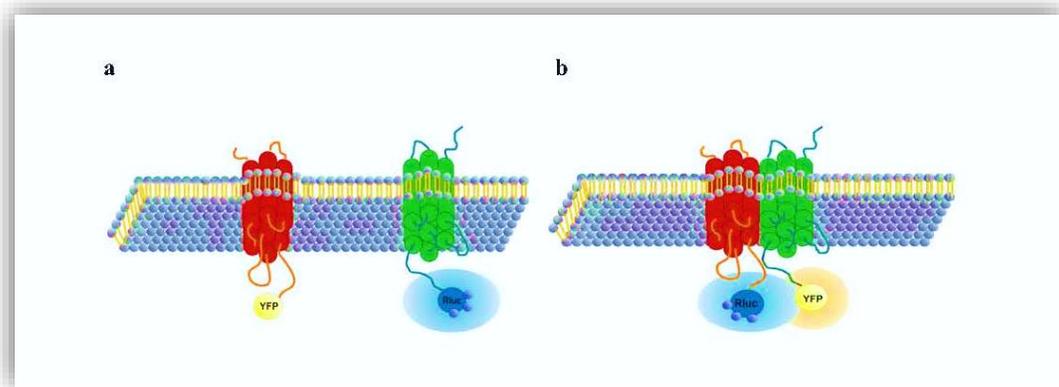


Figura 54. Representación esquemática del fenómeno de BRET. Tomado de González S. Receptores de dopamina y heterómeros de receptores de dopamina en la modulación de la neurotransmisión. Tesis de doctorado. Barcelona (2012) Universidad de Barcelona.

Hasta la fecha se han descrito dos variantes principales de esta técnica, la que se conoce como BRET o BRET¹ y la denominada BRET². Aunque el principio biofísico de ambas técnicas es el mismo, difieren por el sustrato que cataliza la Rluc y por la proteína aceptora. En el

BRET el sustrato que se usa es la coelenterazine H, que al ser metabolizado por la Rluc genera luz con un pico de emisión a 480 nm; emisión que permite excitar a la YFP (ya que se solapa con su pico de excitación), de forma que ésta emite a 530 nm. En el BRET2 el sustrato es DeepBlueC que al ser oxidado por la Rluc emite una luz a 400 nm de forma que puede excitar a la GFP²; en este caso la longitud de onda a la que emite esta variante de la GFP es 510 nm.

Mediante técnicas de transferencia de energía se ha demostrado la existencia de homodímeros de los receptores β 2-adrenérgico δ -opioides y A2A de adenosina entre muchos otros. También se ha realizado una aproximación similar para el estudio de heterómeros de receptores acoplados a proteína G, como por ejemplo entre los receptores de somatostatina SSTR2A y SSTR1B, los receptores de somatostatina SSTR1B y los D2 de dopamina, los receptores A2A de adenosina y D2 de dopamina, los receptores de dopamina D1 y D3, los receptores A2A de adenosina y CB1 de cannabinoides y los receptores D1 de dopamina y H3 de histamina entre otros. En los últimos años se han desarrollado multitud de variantes de estas técnicas entre las que cabe destacar la técnica de SRET (sequential resonante energy transfer) basada en las técnicas de BRET y FRET y la técnica de BRET y complementación bimolecular que permiten la detección de heterómeros de más de dos receptores.

Las técnicas de transferencia de energía ponen de manifiesto que dos proteínas tienen la capacidad de interactuar molecularmente en cultivos celulares, y esta es evidentemente la primera condición que se debe cumplir para que las proteínas en estudio estén formando heterómeros in vivo. Sin embargo, una señal positiva en células transfectadas con proteínas de fusión no significa necesariamente que en un tejido que exprese endógenamente estas proteínas, éstas formen heterómeros. Para detectar heterómeros en tejidos nativos deben utilizarse otro tipo de estrategias. Existen técnicas directas para detectar oligómeros en tejidos nativos. Una de ellas utiliza la microscopía de fuerza atómica. Palczewski y colaboradores usando microscopia de fuerza atómica demostraron, por primera vez, oligómeros de rodopsina en la retina con un determinado patrón de distribución. Esta técnica es factible cuando la concentración de receptores en el tejido es muy elevada como

ocurre con la rodopsina en la retina, pero es de difícil aplicación para la mayoría de receptores del sistema nervioso central cuya expresión es moderada. La técnica de In Situ Proximity Ligation Assay (PLA) es una técnica directa muy útil para el estudio de heterómeros de receptores si se dispone de anticuerpos específicos para. Como se muestra en la figura 55, la técnica se basa en la unión de los anticuerpos primarios a los receptores a estudiar y la posterior unión de anticuerpos secundarios, previamente conjugados a las sondas PLA, a estos anticuerpos primarios. A continuación, se produce la hibridación de unos oligonucleótidos a las dos sondas PLA conjugadas utilizando una solución de ligación. Esta hibridación da lugar a un DNA circular que es posteriormente amplificado utilizando polimerasas y, a continuación, detectado utilizando sondas específicas previamente marcadas con un fluoróforo.

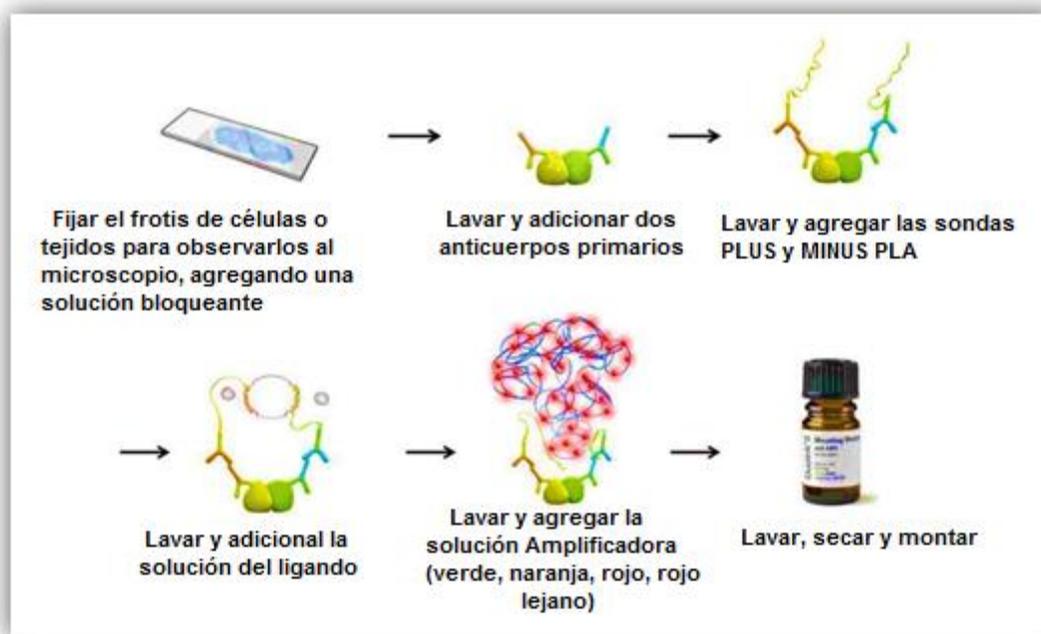


Figura 55. Representación de la técnica 'In Situ Proximity Ligation Assay' (PLA) utilizada para la detección de interacciones entre receptores. Tomado de Olink Bioscience, 2011.

La utilización de ligandos para heterómeros constituye otra técnica directa para su detección. Como se muestra en la Figura 54, se pueden seguir varias estrategias

dependiendo de las propiedades del heterodímero. Uno de los enfoques consiste en el diseño y síntesis de ligandos bivalentes que interaccionen con los dos receptores del dímero (Figura 56a). Estos ligandos pueden tener mayor afinidad y selectividad si se compara con los ligandos clásicos de los receptores. Esta estrategia se ha utilizado para determinar la presencia de heterómeros de receptores de adenosina A_{2A} y de dopamina D₂ en el estriado de cerebro de cordero. Otra aproximación es el desarrollo de ligandos selectivos de un determinado heterodímero (Figura 56b). Estos ligandos interaccionan con el centro de unión únicamente cuando forma parte del heterodímero. Waldhoer y colaboradores demostraron que el compuesto 6'-guanidinonaltrindole (6'-GNTI) no podía unirse a receptores opioides individuales pero sí era capaz de unirse y activar al heterodímero de receptores opioides κ-δ. Experimentos in vivo demostraron que el compuesto 6'-GNTI producía analgesia cuando se administraba directamente en la médula espinal, pero prácticamente no tenía efecto cuando se administraba directamente en el cerebro. Además, este efecto analgésico selectivo de la médula espinal se bloqueaba por un antagonista bivalente selectivo del heterómero κ-δ confirmando a éste como diana funcional para la analgesia in vivo.

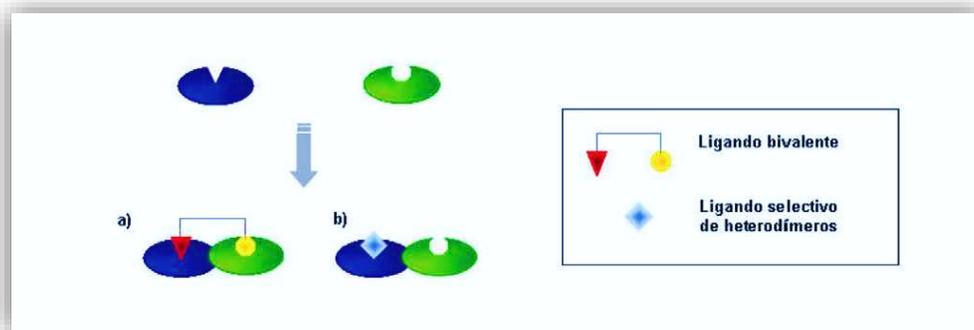


Figura 56. Ligandos que interaccionan específicamente con heterodímeros. Tomado de Rozenfeld R, et al. Heterodimers of G protein-coupled receptors as novel and distinct drug targets. *Drug Discov Today: Ther Strat.* 2006; 3:437–443.

Un ejemplo interesante de ligando que no se une al heterodímero pero si selectivamente a los receptores individuales es el antagonista del receptor adrenérgico α_{1D} denominado BMY

7378. Este resultado sugiere que es posible generar fármacos o ligandos que interaccionen selectivamente con homodímeros, y no heterodímeros, de receptores o vice-versa. Tanto la estrategia de los ligandos bivalentes como la de los ligandos selectivos de un heterodímero tiene sus pros y sus contras. En la tabla 5 se indican las ventajas e inconvenientes de cada estrategia. Actualmente existen varias empresas, como CARA Therapeutics, Dimerix Bioscience o PatoBIOS Incorporated, que están desarrollando estrategias adecuadas para la identificación de heterodímeros o de moléculas que interaccionan selectivamente con heterodímeros (Milligan, 2006).

	Ventajas	Inconvenientes
Ligandos Bivalentes	Alta selectividad. Pocos efectos secundarios Diseño racional del compuesto	Alto peso molecular de los compuestos. No poseer las propiedades fisicoquímicas de un fármaco (i.e. no satisfacer las reglas de Lipinski; (Lipinski, et al., 2001)).
Ligandos selectivos de heterodímero	Alta selectividad. Pocos efectos secundarios. Bajo peso molecular de los compuestos. Pueden satisfacer las reglas Lipinski (Lipinski, et al., 2001).	Se basa en el supuesto de que la heterodimerización altera drásticamente el sitio de unión. Difícil diseño racional de los compuestos. Necesita una extensa exploración para la identificación del ligando.

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes del desarrollo de ligandos bivalentes y selectivos de heterodímeros.

Extraído y modificado de Rozenfeld et al., 2006

Existen técnicas indirectas para detectar oligómeros en tejidos nativos como por ejemplo la coimmunoprecipitación de las proteínas implicadas a partir de tejido, pero como hemos comentado anteriormente, la coimmunoprecipitación requiere de la solubilización de los receptores de la membrana, lo que no permite descartar que los oligómeros observados puedan ser artefactos debidos al tratamiento con detergentes. Una manera bastante eficaz de detectar oligómeros en tejidos nativos es determinar alguna característica específica de los heterodímeros en células donde se haya demostrado la heterodimerización y utilizar esta propiedad como huella dactilar para detectar el heterómero en tejidos nativos. La determinación de cross-talk entre cascadas de señalización intracelular, el antagonismo cruzado en el que un antagonista específico de un receptor inhibe la señalización mediada

por un agonista del otro receptor o bien el estudio de cambios en la unión de ligandos en uno de los receptores en presencia de un ligando para el otro receptor en preparaciones de membranas obtenidas de tejidos vivos pueden constituir una huella dactilar si se ha demostrado previamente que es una característica del heterómero. Estas estrategias se han utilizado para detectar heterómeros entre receptores de dopamina D₁ y histamina H₃ o entre receptores de dopamina D₁ y receptores sigma 1 en el tejido estriatal de cerebro entre otros.

7.0 CONCLUSIONES

La acumulación de pruebas muestra el papel fundamental de los heterodímeros de los GPCR en los procesos fisiopatológicos, y pone de relieve la importancia de estos complejos como blancos terapéuticos. La identificación de heterodímeros específicos que son sobreexpresados durante eventos patológicos y/o una chaperona específica del heterodímero es al parecer lo que conduce a nuevas estrategias para las intervenciones farmacológicas.

LosGPCRs son una gran familia de receptores de superficie celular que responden a una variedad de señales externas. La unión de una molécula de señalización a un GPCR resulta en activación de la proteína G, que a su vez desencadena la producción de segundos mensajeros. A través de esta secuencia de eventos, los GPCR ayudan a regular una increíble variedad de funciones corporales en diversos procesos fisiológicos.

8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

Los GPCRs están involucrados en una amplia diversidad de enfermedades como son: alergias, disfunción cardiovascular, depresión, obesidad, cáncer, dolor, diabetes, y una variedad de trastornos del sistema nervioso central. Por lo que, hay mucho interés en la identificación de receptores que se dimericen y tengan como consecuencia una respuesta o efecto farmacológico deseado, lo que abre una línea importante de investigación para conocer como es que los receptores de un mismo tipo o diferente pueden acercarse y generar vías de señalización que traen como consecuencia un mejor efecto farmacológico. De hecho, existen técnicas histológicas avanzadas que se aplican para determinar el acercamiento de estos receptores acoplados a proteínas G. Un modelo reciente supone la existencia de diversos estados conformacionales para un GPCR dado de tal modo que un GPCR no existe exclusivamente en dos estados (activo e inactivo), sino en varios. Este modelo propone que cada uno de estos estados conformacionales activa de forma específica una vía de señalización dada, de tal modo que si un fármaco favorece una de estas conformaciones, se activará específicamente una determinada vía de señalización. La eficiencia de un fármaco para inducir específicamente una u otra vía de señalización no está relacionada con la afinidad, ni tampoco con el hecho de que funcionalmente se trate de un agonista total o parcial o inverso o de un modulador alostérico.

Por otro lado, la identificación de los heterómeros receptores “in vivo” y su participación en los procesos fisiopatológicos es fundamental para su reconocimiento como nuevos objetivos farmacológicos. Sólo unas pocas técnicas permiten la detección directa de complejos GPCR en tejidos nativos. Se han desarrollado ligandos acoplados a fluoróforo que podrían usarse para llevar a cabo análisis de FRET entre receptores endógenos que interactúan. Los anticuerpos que reconocen específicamente los heterómeros receptores representan herramientas útiles para la detección y el análisis de complejos de GPCR “in vivo”. Comprender los mecanismos que gobiernan la heteromerización de GPCR representa un desafío sobresaliente en todas las áreas de la biología, y es un requisito previo para el desarrollo de fármacos dirigidos a heterómeros GPCR. De hecho se ha preguntado:

- 1) Si dos receptores que pueden interactuar se expresan en una célula en igual medida, ¿formarán preferentemente heterómeros?
- 2) ¿Cuántos receptores hay en un oligómero?
- 3) ¿Los receptores están en un heterómero en una relación estequiométrica? Si no, en el contexto de un heteroligómero, ¿cuál es la proporción mínima de un protómero requerida para cambiar las propiedades del otro protómero?
- 4) ¿Hay formas de "forzar" a los receptores a asociarse que aumenten la homogeneidad (forma heteromérica) de una muestra?

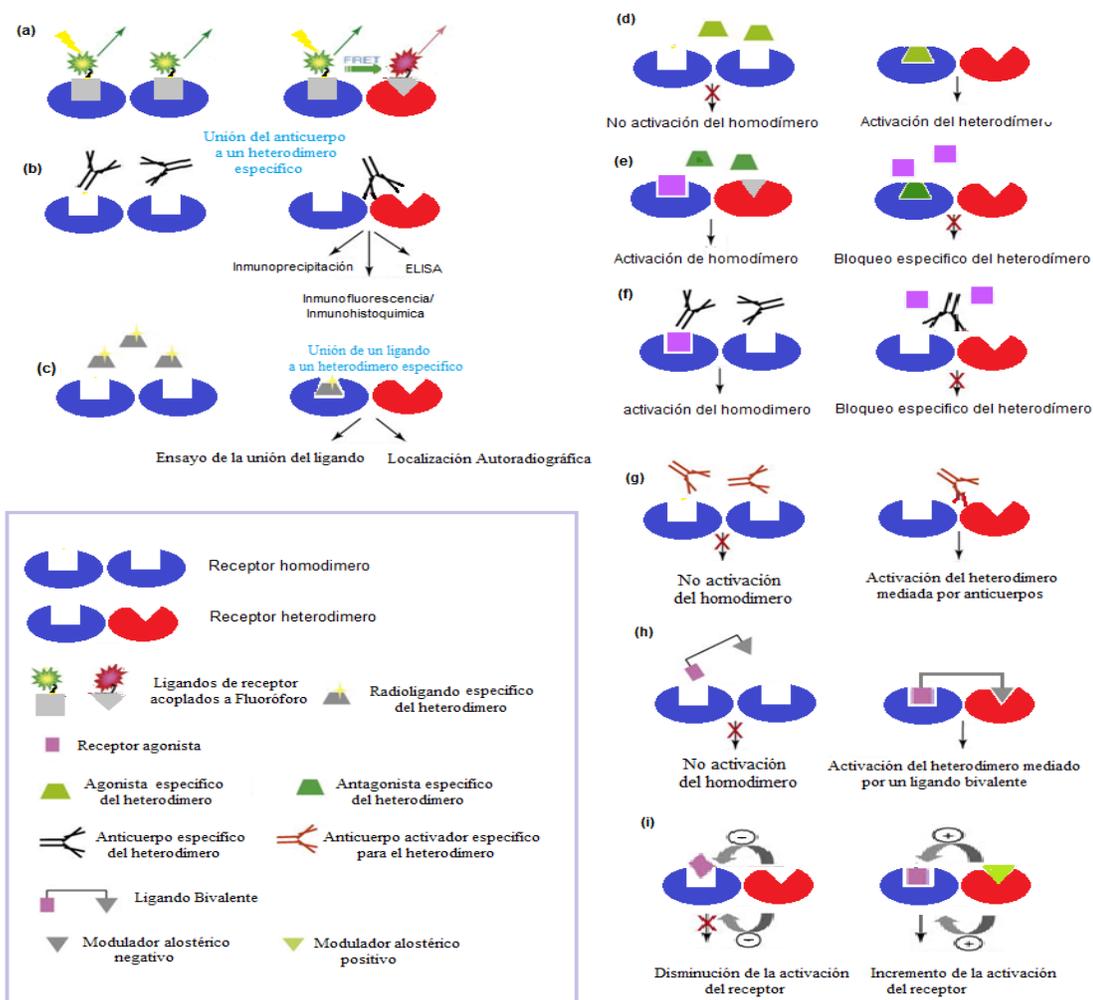


Figura 57. Técnicas emergentes para detectar heterodímeros. Detectan (a-c) y modulan (d-i) heterodímeros. Los heterodímeros GPCR pueden ser detectados usando tres enfoques principales.

- (A) Fluoróforo acoplado FRET mediado por ligando. Los ligandos fluoróforo acoplado para dos receptores se pueden analizar utilizando FRET sólo si sus dos receptores afines están en estrecha proximidad en un complejo heterodimérico.
- (B) Anticuerpos heterodímero selectivo que reconocen sólo heterodímeros; se pueden utilizar para estudiar la localización y los niveles de heterómeros.
- (C) Ligandos específicos para el heterodímero pueden unirse solamente a la alteración de unión al receptor de bolsillo formado en un heterodímero.
heterómeros GPCR puede ser modulada usando seis enfoques principales.
- (D) Los agonistas-heterodímero específico pueden activar un receptor sólo si está en una forma heterodimérica.
- (E) Antagonistas heterodímero-específicos pueden bloquear un receptor sólo si está en una forma heterodimérica.
- (f) Anticuerpos heterodímero-específicos pueden bloquear la unión al receptor y / o de señalización sólo si están en una forma heterodimérica.
- (G) La activación de anticuerpos específicos heterodímero pueden activar los receptores sólo si está en una forma heterodimérica.
- (h) Ligandos bivalentes pueden unirse y activar los receptores sólo si sus receptores afines se encuentran en una heterodímero.
- (I) El ligando de un receptor puede actuar como un modulador alostérico negativo o positivo del receptor interactúan en un heterodímero. El modulador alostérico puede alterar las propiedades de unión y / o de señalización del receptor de la interacción.

8. REFERENCIAS

1. Boticario B C, CASCALES A M (2009). Innovaciones en Cáncer. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?isbn=8436258320>. Universidad Nacional de Educación a Distancia Madrid 2012.
2. Cicancer.org. Cascadas y redes de señalización celular: rutas y redes. Recuperado de <http://www.cicancer.org/es/cascadas-y-redes-de-senalizacion-celular-rutas-y-redes> [fecha de consulta: febrero de 2016]
3. Giraldo, J. Article published in March 2013. DOI:http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2013.03.1Instituto de Neurociencias y Unidad de Bioestadística, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de BarcelonaReceptores acoplados a Proteínas G. [en línea] <http://www.sebbm.es/web/en/science-for-society/get-to-know-our-scientists/770-jesus-giraldo-especial-premio-nobel-marzo-2013-los-receptores-acoplados-a-proteinas-g>
4. Waldman, S. (2010) Farmacología y Terapéutica. Principios para la práctica. México: El Manual Moderno
5. Ferrandis T V. (2016) Fisioterapeuta de Castilla y Leon. Recuperado de <http://cofsegovia.portalfarma.com/Documentos/Curso%20Fisioterap%C3%A9utas/2.-%20Farmacocin%C3%A9tica%20y%20Farmacodinamia.pdf>
6. Kalant, H. (2002) Principios de farmacología Médica. México: Ed. Oxford University Press.
7. Mycek, M. (2006). Farmacología . México: Ed. Mc Graw-Hill.
8. Chaurasia CS, Müller M, Bashaw ED, et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. J ClinPharmacol 2007;47:589-603.
9. Taleisnik, S. (2006) Receptores celulares y la transducción de señales. Cordoba: Encuentro Grupo Editorial.
10. Rocha C., L.A. (2016) “Disminución de la respuesta a Angiotensina II por interacción de un antagonista del receptor B2 de Bradicnina y un agonista del receptor AT2 de Angiotensina”. Tesis UNAM. México.
11. Cell Signaling scitable by nature Education. (2014) Recuperado de http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling_14047077
12. Ciencias Naturales (2015) Recuperado de: <http://www.areaciencias.com/quimica/fuerzas-de-der-waals.html>
13. Palomino, M. (1999) Receptores de fármacos. Dermatología. Perú; 9 (1):35-44

14. Molinoff PB, Wolfe BB, Weiland GA. Quantitative analysis of drug-receptor interactions: II. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sci* 1981; 29:427-443.
15. Weiland GA, Molinoff PB. Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sci* 1981; 29:313-330.
16. Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of disease: beta-adrenergic Receptors-alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2:475-483.
17. Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res* 2003; 4:2.
18. Homer LD, Nielsen TB. Spare receptors, partial agonists, and ternary complex model of drug action. *Am J Physiol* 1987; 253:E114-E121.
19. Molinoff PB, Weiland GA, Heidenreich KA, et al. Interactions of agonists and antagonists with beta-adrenergic receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1981; 14:51-67.
20. Weiland GA, Minneman KP, Molinoff PB. Thermodynamics of agonist and antagonist interactions with mammalian beta-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 1980; 18:341-347. 20. Wilke RA, Reif DM, Moore JH. Combinatorial pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:911-918
21. Recuperado de <http://www.biocancer.com/journal/1101/11-tipos-y-moleculas-de-senalizacion> 2010 biocancer.com
22. Recuperado de <http://www.biocancer.com/journal/1102/12-el-receptor> 2010
23. Recuperado de Fundamentos de Biología Celular, Unidad 4.2 2016 <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471>
24. Recuperado de <http://www.guiasdeneuro.com/tipos-de-senales-biologicas/> Dr. Bernardo Sonzini Astudillo Guías de neuro 2016
25. Rhee SG, Choy KD. Multiple Forms of Phospholipase C Isozymes and their activation Mechanisms. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. Raven Press New York. Vol 26, 1992.
26. Strada SJ, Hidaka H. *Advance in Second Messenger and Phosphoprotein Research. The Biology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases*. Vol 25, Raven Press. New York, 1992.
27. Taussig R, Gilman AG. Mammalian Membrane-Bound Adenylcyclases. *J Biol Chem* 1995;270:1-4.
28. Taylor P et al. *Molecular Basis of Pharmacologic Selectivity Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*. 3a Ed. Livingstone, N.Y., 1990.
29. Walton KM, Dixon JR. Protein Tyrosine Phosphatases. *Ann Rev Biochem* 1993; 62: 101-120.

30. Recuperado de sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatología/v09_n1/. Revista de Dermatología Peruana vol. 9. (1999).
31. Ortega, G S. Avances en el estudio de receptores acoplados a proteínas G. An. Quím. 2013, 109(4), 276–284. Madrid (2013)
32. Lagerstrom M C, Schioth H B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 7. 339.
33. Fredriksson R, Lagerstrom M C, et al. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol. Pharmacol. 63. 1256.
34. Fredriksson R, Schioth H B. (2006) En Ligand Design for G Proteincoupled Receptors (Ed. D. Rognan), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA, Weinheim. pp. 1-25.
35. Stevens R C, Cherezov V, et al. (2013) The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. Nat. Rev. Drug Discov. 12. 25.
36. Cabrera-Vera T M, Vanhauwe J, et al. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation Endocr. Rev. 24. 765.
37. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature. 459. 356.
38. Kolakowski, L F. GCR Db: a G-protein-coupled receptor database. Receptors Channels. 1994. 2:1-7
39. Bourne H R, et al. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanisms. Nature. 349. 117-127.
40. Marinissen M J & Gutkind S. (2001). G-Protein-Coupled Receptors and signaling networks: emerging paradigms. TRENDS in Pharmacol. Sci 22:368-376.
41. Beaulieu J M & Gainetdinov R R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev. 63 (1):182-217.
42. Krupnick J G & Benovic J L. (1998). The role of receptor kinase and arrestins in G-protein-coupled receptor regulation. Annu Rev. Pharmacol Toxicol. 38:289-319.
43. Luttrell L M et al. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta₂adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. Science. 283: 655-661.
44. Perry S J & Lefkowitz R J. (2002). Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. TRENDS Cell Biol. 12:130-138.
45. Reiter E, et al. (2011). Molecular Mechanism of β -Arrestin- Biased agonism at Seven-Transmembrane Receptor. Annu Rev Pharmacol Toxicol.

46. Kelly E, et al. (2008). Agonist-selective mechanism of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* 153. Suppl 1:S 379-388.
47. Violin J D y Lefkowitz R J (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 28 (8):416-22.
48. Bruneau E G, et al (2009). Receptor-associated proteins and synaptic plasticity. *FASEB J.* 23:679-88.
49. Beresewicz M (2007). Scaffold proteins (MAGUK, Shank and Homer) in postsynaptic density in the central nervous system. *Postepy Biochem.* 53(2) 188-97.
50. Triller A, Choquet D (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes and yet they do move! *Trends Neurosci.* 28 (3): 133-9.
51. Gracia E; et al (2011). A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem J.* 1; 435(3): 701-9.
52. Herrera C; et al (2001). Adenosine A_{2B} receptors behave as an alternative anchoring protein for cell Surface adenosine desaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol. Pharmacol.* 59: 127-134.
53. Seifert R & Wenzel- Seifert K (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366:381-416.
54. González S. Receptores de dopamina y heterómeros de receptores de dopamina en la modulación de la neurotransmisión. *Tesis de doctorado.* Barcelona (2012) Universidad de Barcelona.
55. Moser E; et al (2010). G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology.* 86 (1): 22-9.
56. Golan M; et al (2009). Antidepressants, beta-arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions. *Curr. Pharm Des* 15:1699-1708.
57. Boulay F & Rabiet M J. (2005) The chemoattractant receptors FRP and C5aR: same functions – different fates traffic 6: 83-86.
58. Gainetdinov R R; Caron M G. (2004) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol* 43: 201-284.
59. Ferguson S S (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
60. Pierce K D & Lefkowitz R J (2001) New mechanism in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene.* 20: 1532-1539.

61. Krueger K M; et al. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta₂-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem* 272: 5-8.
62. Carriba D, P. Heteromerización de receptores de Adenosina A_{2AR} Dopamina D₂ y Cannabiodes CB₁. Implicaciones farmacológicas y funcionales. Barcelona (2007). Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
63. Alfaras-Melainis K, et al. Modulation of opioid receptor function by protein-protein interactions. *Front Biosci.* 2009; 14:3594–3607.
64. Ferre S, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 2009; 5:131–134.
65. AbdAlla S, et al. Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.* 2001; 7:1003–1009.
66. Levac BA, et al. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2:76–81.
67. Fuxe, M D. The changing world of G protein-coupled receptors: from monomers to dimers and receptor mosaics with allosteric receptor-receptor interactions. 2010.30 (5).
68. Rozenfeld R. Receptor heteromerization and drug Discovery. *Trends Pharmacol* 2010 *Sci.* 31 (3).
69. Christensen R, et al. Eficacia y seguridad del rimonabant medicamento para perder peso... Un meta-análisis de ensayos aleatorios *Lancet* 2007; 370: 1706-13.
70. Mitchell PB, Morris MJ. La depresión y la ansiedad con rimonabant *Lancet* 2007; 370: 1671 a 1672.
71. AbdAlla S, et al. AT₁-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 2000; 407:94–98.
72. Gomes I, et al. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci.* 2000; 20:RC110.
73. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* 1999; 399:697–700.
74. Rocheville M, et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 2000; 288:154–157.
75. George SR, et al. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem.* 2000; 275:26128–26135.
76. Pfeiffer M, et al. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A) *J Biol Chem.* 2001;276:14027–14036.

77. Zhu WZ, et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ Res*. 2005; 97:244–251.
78. Rozenfeld R, et al. Heterodimers of G protein-coupled receptors as novel and distinct drug targets. *Drug Discov Today: Ther Strat*. 2006; 3:437–443.
79. Jordan BA, et al. Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*. 2003; 64:1317–1324.
80. Vilardaga JP, et al. Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol*. 2008; 4:126–131.
81. Breit A, et al. Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol Pharmacol*. 2006; 70:686–696.
82. Rashid AJ, et al. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:654–659.
83. So CH, et al. Desensitization of the dopamine D1 and D2 receptor hetero-oligomer mediated calcium signal by agonist occupancy of either receptor. *Mol Pharmacol*. 2007; 72:450–462.
84. Fan T, et al. A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *J Biol Chem*. 2005;280:38478–38488.
85. Small KM, et al. Alpha2A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry*. 2006; 45:4760–4767.
86. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J*. 2007; 21:2455–2465.
87. Barki-Harrington L, et al. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation*. 2003; 108:1611–1618.
88. Gonzalez-Maeso J, et al. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*. 2008; 452:93–97.
89. Sealfon SC, Gonzalez-Maeso J. Receptor pair for schizophrenia. *Pediatr Res*. 2008; 64:1.
90. Hansen JL, et al. Lack of evidence for AT1R/B2R heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 cells: how common is the AT1R/B2R heterodimer? *J Biol Chem*. 2009; 284:1831–1839.
91. AbdAlla S, et al. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci*. 2005; 26:185–192.

92. McGraw DW, et al. Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest.* 2006; 116:1400–1409.
93. Chun HJ, et al. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2008; 118:3343–3354.
94. Decailot FM, et al. Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:16045–16050.
95. Waldhoer M, et al. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:9050–9055.
96. Zhang ZJ, et al. The paradoxical effects of SKF83959, a novel dopamine D1-like receptor agonist, in the rat acoustic startle reflex paradigm. *Neurosci Lett.* 2005; 382:134–138.
97. Gomes I, et al. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:5135–5139.
98. Abul-Husn NS, et al. Augmentation of spinal morphine analgesia and inhibition of tolerance by low doses of mu- and delta-opioid receptor antagonists. *Br J Pharmacol.* 2007; 151:877–887.
99. Daniels DJ, et al. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:19208–19213.
100. Ferre S, et al. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 2008; 14:1468–1474.
101. Ferre S, et al. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2001; 7:235–241.
102. Roth B L; et al. (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. rev Drug Discov.* 3:437-443.
103. Law M R; et al, (2003) Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs:analysis of 354 randomised trials. *BMJ.* 28; 326 (7404): 1427.
104. Morphy R; et al (2004) From magic bullets to designated multiple ligands. *Drug Discov. Today.* 9:641-651.
105. Buccafusco J R & Terry A V (2000) Multiple central nervous system target for eliciting beneficial effects on memory and cognition. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 295: 438-446.
106. Gray J A & Roth B L (2006). Developing selectively nonselective drugs for treating CNS disorders. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3:413-419.

107. Cavalli A; et al (2008) Multitarget-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med Chem.* 14; 51(3): 347-72
108. Youdim M B & Buccafusco J J (2005) CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson' diseases. *J Neural Transm.* 112 (4): 519-37.
109. Vendrell M; et al (2007) Novel ergopeptides as dual ligands for adenosine and dopamine receptors. *J Med Chem.* 28; 50 (13): 3062-9.
110. Toda N (2003) A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem.* 11 (20): 4389-415.
111. Millan M J (2009) Dual-and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics.* 6(1): 53-77.
112. Fredholm B B; et al (2007) G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol.* 190 (1) 3-7.
113. Lefkowitz R J (2007) Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol.* 190 (1) 3-7.
114. Civelli O, et al (2004) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 281-307.
115. Rajagopal S, et al. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 9 (5): 373-86.
116. Lutrell L, et al. (2010) Beyond desensitization physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev.* 62(2): 305-30. Doi:10.1124/pr.109.002436.
117. Kenakin T & Christopoulos A (2013) Measurements of ligands bias and functional affinity. *Nat. rev Drug Discov.* 12(6):483.
118. El Moustaine D, et al. (2012) Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 109(40):16342-7.
119. Blättermann S, et al (2012) A biased ligand for OXE-R uncouples G α and G $\beta\gamma$ signaling within a heterotrimer. *Nat. Chem. Biol.* 8(7): 631-8
120. Lefkowitz, RJ (2013) A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 52(25):6366-78.
121. Ahn S, et al (2009) β -Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. 284(13):8855-65.
122. Allen, J A, et al (2011) Discovery of β -arrestin-biased dopamine D2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 108(45):18488-93.

123. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 2004; 5:30–34.
124. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:28663–28674.
125. Jordan BA, et al. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98:343–348.
126. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:19762–19772.
127. Xu J, He J, Castleberry AM, Balasubramanian S, Lau AG, Hall RA. Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:10770–10777.
128. Stanasila L, Perez JB, Vogel H, Cotecchia S. Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:40239–40251.
129. Lavoie C, et al. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:35402–35410.
130. Breit A, Lagace M, Bouvier M. Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:28756–28765.
131. Terrillon S, Barberis C, Bouvier M. Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101:1548–1553.
132. Durroux T. Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26:376–384.
133. Pfeiffer M, et al. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A) *J. Biol. Chem.* 2001;276:14027–14036.
134. Urizar E, et al. Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J.* 2005; 24:1954–1964.
135. Springael JY, et al. Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69:1652–1661.

136. Zhu WZ, et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ. Res.* 2005; 97:244–255.
137. Jensen AA, Spalding TA. Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 21:407–420.
138. Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1:198–210.
139. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 2000; 288:154–
140. AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 2000; 407:94–98.
141. Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman KP. Heterodimers of alpha1B- and alpha1D- adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69:45–55.
142. Prinster SC, Holmqvist TAG, Hall RAM. Alpha2C-adrenergic receptors exhibit enhanced surface expression and signaling upon association with beta2-adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 318:974–981.
143. Pfeiffer M, et al. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A) *J. Biol. Chem.* 2001;276:14027–14036.
144. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, Delagrang P, Jockers R. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* 2006; 25:3012–3023.]
145. Kenakin T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24:346–354.
146. George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:26128–26135.
147. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J.* 2007; 21:2455–2465.
148. Mellado M, Rodriguez-Frade JM. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.* 2001; 20:2497–2507.
149. Lee SP, et al. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:35671–35678.

150. Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104:654–659.
151. Fuxe K, et al. Intramembrane receptor-receptor interactions: a novel principle in molecular medicine. *J. Neural Transm.* 2007; 114:49–75.
152. Fuxe K, Marcellino D. Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. *Brain Res. Rev.* 2008; 58:415–452.
153. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2:274–286.
154. George SR, O'Dowd BF, Lee SP. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1:808–820.
155. Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20:482–487.
156. Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L. The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 2006:71–83.
157. Foley P, Gerlach M, Double KL, Riederer P. Dopamine receptor agonists in the therapy of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 2004; 111:1375–1446.
158. Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006; 5:109–131.
159. Hummel M, Unterwald EM. D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *J. Cell Physiol.* 2002; 191:17–27.
160. Toda S, Alguacil LF, Kalivas PW. Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 2003; 87:1478–1484.
161. Angulo E, Casado V, Mallol J, Canela EI, Vinals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol.* 2003; 13:440–451.
162. Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF. Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 267:7–19.
163. Ciruela F, Casado V, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* 1995; 42:818–828.

164. Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 227:200–204.
165. Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortes A, Canela EI, Lopez-Gimenez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferre S, Franco R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.* 2006; 26:2080–2087.
166. So CH, Varghese G, Curley KJ, Kong MM, Alijanian M, Ji X, Nguyen T, O'Dowd BF, George SR. D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol. Pharmacol.* 2005; 68:568–578.
167. Marcellino D, et al. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:26016–26025.
168. Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* 2008; 74:59–69.
169. Maggio R, Scarselli M, Novi F, Millan MJ, Corsini GU. Potent activation of dopamine D3/D2 heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. *J. Neurochem.* 2003; 87:631–641.
170. Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006 ;5:25–43.
171. Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:30308–30314.
172. Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology.* 2000; 23:S50–S59.
173. Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:18091–18097.]
174. Torvinen M, Gines S, Hillion J, Latini S, Canals M, Ciruela F, Bordoni F, Staines W, Pedata F, Agnati LF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K. Interactions among adenosine deaminase, adenosine A(1) receptors and dopamine D(1) receptors in stably cotransfected fibroblast cells and neurons. *Neuroscience.* 2002; 113:709–719.

175. Torvinen M, Kozell LB, Neve KA, Agnati LF, Fuxe K. Biochemical identification of the dopamine D2 receptor domains interacting with the adenosine A2A receptor. *J. Mol. Neurosci.* 2004; 24:173–180.
176. Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferre S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:46741–46749.
177. Gines S, et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:8606–8611.
178. Ferre S, Torvinen M, Antoniou K, Irenius E, Civelli O, Arenas E, Fredholm BB, Fuxe K. Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:4718–4724.
179. Cao Y, Xie KQ, Zhu XZ. The enhancement of dopamine D1 receptor desensitization by adenosine A1 receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 562:34–38.
180. Le Crom S, Prou D, Vernier P. Autocrine activation of adenosine A1 receptors blocks D1A but not D1B dopamine receptor desensitization. *J. Neurochem.* 2002; 82:1549–1552.
181. Yabuuchi K, Kuroiwa M, Shuto T, Sotogaku N, Snyder GL, Higashi H, Tanaka M, Greengard P, Nishi A. Role of adenosine A1 receptors in the modulation of dopamine D1 and adenosine A2A receptor signaling in the neostriatum. *Neuroscience.* 2006; 141:19–25.
182. Cao Y, Sun WC, Jin L, Xie KQ, Zhu XZ. Activation of adenosine A1 receptor modulates dopamine D1 receptor activity in stably cotransfected human embryonic kidney 293 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 548:29–35.
183. O'Neill C, Nolan BJ, Macari A, O'Boyle KM, O'Connor JJ. Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of dopamine release from rat striatal slices is modulated by D1 dopamine receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 26:3421–3428.
184. Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res.* 1995; 677:193–203.
185. Caille I, Dumartin B, Bloch B. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.* 1996; 730:17–31.
186. Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem. Rev.* 2008; 108:1614–1641.
187. Gonzalez-Maeso J, et al. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* 2008; 452:93–97.

188. Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC. Psychedelics and schizophrenia. *Trends Neurosci.* 2009; 32:225–232.
189. Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC. Agonist-trafficking and hallucinogens. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16:1017–1027.
190. Moreno JL, Sealfon SC, Gonzalez-Maeso J. Group II metabotropic glutamate receptors and schizophrenia. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66:3777–3785.
191. Sealfon SC, Gonzalez-Maeso J. Receptor pair for schizophrenia. *Pediatr. Res.* 2008; 64:1. [
192. Gonzalez-Maeso J, et al. Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2003; 23:8836–8843.
193. Gonzalez-Maeso J, et al. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 2007; 53:439–452.
194. Patil ST, et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat. Med.* 2007; 13:1102–1107.
195. Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000; 31:302–312.
196. Marek GJ. Metabotropic glutamate 2/3 receptors as drug targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004; 4:18–22.
197. Milligan G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov. Today.* 2006; 11:541–549.
198. Kent T, McAlpine C, Sabetnia S, Presland J. G-protein-coupled receptor heterodimerization: assay technologies to clinical significance. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2007; 10:580–589.
199. Dalrymple MB, Pflieger KD, Eidne KA. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol. Ther.* 2008; 118:359–371.
200. Waldhoer M, et al. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102:9050–9055.
201. Daniels DJ, et al. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102:19208–19213.
202. Xie Z, et al. Interaction of bivalent ligand KDN21 with heterodimeric delta-kappa opioid receptors in human embryonic kidney 293 cells. *Mol. Pharmacol.* 2005; 68:1079–1086.

203. Breit A, et al. Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol. Pharmacol.* 2006; 70:686–696.
204. Zhang ZJ, et al. The paradoxical effects of SKF83959, a novel dopamine D1-like receptor agonist, in the rat acoustic startle reflex paradigm. *Neurosci. Lett.* 2005; 382:134–138.
205. Natesan S, et al. The antipsychotic potential of l-stepholidine--a naturally occurring dopamine receptor D1 agonist and D2 antagonist. *Psychopharmacology (Berl.)* 2008; 199:275–289.
206. Abadir P M., et al. Angiotensin II Type 2 Receptor–Bradykinin B2 Receptor Functional Heterodimerization. *Hypertension.* 2006; 48:316-322
207. Abadir PM, et al. Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. *Hypertension.* 2003; 42: 600–604.
208. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1978–1982.
209. Siragy HM, et al. Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension.* 2000; 35: 1074–1077.
210. Angers D, et al. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42: 409–435.
211. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2: 274–286.
212. Gomes I, et al. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med.* 2001; 79: 226–242.
213. Kenakin T. Efficacy at G-protein–coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1: 103–110.
214. Tan Y, et al. Mechanisms of angiotensin II-induced expression of B2 kinin receptors. *Am J Physiol.* 2004; 286: H926–H932.
215. Zhao C, et al. Gene therapy with human tissue kallikrein reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-induced hypertensive rats. *Hypertension.* 2003; 42: 1026–1033.
216. AbdAlla S, et al. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001; 276: 39721–39726.
217. Quitterer U, et al. AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2004; 24: 115–119.
218. AbdAlla S, et al. Increased AT (1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.* 2001; 7: 1003–1009. [CrossRefPubMed](#)
219. AbdAlla S, et al. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 2000; 407: 94–98.

220. Liu Z, Zhang J, Zhang A. Design of multivalent ligand targeting G-protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15:682–718.
221. Soriano A, et al. Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J. Med. Chem.* 2009; 52:5590–5602.
222. Franco R, et al. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 153 Suppl 1:S90–S98.
223. Springael JY, et al. Allosteric properties of G protein-coupled receptor oligomers. *Pharmacol. Ther.* 2007; 115:410–418.
224. Zhang A, Liu Z, Kan Y. Receptor dimerization--rationale for the design of bivalent ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007; 7:343–345.
225. Franco R, Casado V, et al (2008b) Novel pharmacological targets based on receptor heteromers. *Brain Res Rev* 58:475-482.
226. Maggio R, Vogel Z and Wess J (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3103- 3107.
227. Bai M, Trivedi S and Brown EM. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 273:23605-23610.
228. Zhu X and Wess J. (1998). Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* 37:15773-15784.
229. Benkirane M, et al. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* 272:30603-30606.
230. Hebert TE, et al (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271:16384-16392.
231. Romano C, Yang WL and O'Malley KL. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271:28612-28616.

232. Jones KA, Borowsky B, et al. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396:674-679.
233. Moreno E, et al. (2011). Dopamine D1/histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem.* 286(7):5846-54.
234. De A. (2011). The new era of bioluminescence resonance energy transfer technology. *Curr Pharm Biotechnol.* 12(4):558-68.
235. Schäferling M, Nagl S. (2011). Förster resonance energy transfer methods for quantification of protein-protein interactions on microarrays. *Methods Mol Biol.* 723:303-20.
236. Ciruela F, et al. (2010). Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1798(1):9-20.
237. Ferré S, et al. (2010). G protein-coupled receptor heteromers as new targets for drug development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 91:41-52
238. Gandía J, et al. (2008). Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays.* 30(1):82-9.
239. Bouvier M, et al. (2007). BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nat Methods.* 4(1):3-4.
240. Pflieger KD and Eidne KA. (2005). Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem. J.* 385:625-637.
241. Zimmermann T., et al. (2002). Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair. *FEBS Lett.* 531:245-249.
242. Angers S, et al. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3684-3689.

243. McVey M, et al. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta - opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* 276:14092- 14099.

244. Canals M, et al. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 278:46741-46749.

245. Carriba P, et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32:2249- 2259.

246. Ferrada C, et al. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 157(1):64-75.

247. Vidi PA and Watts VJ. (2009). Fluorescent and Bioluminescent Protein-Fragment Complementation Assays in the Study of G Protein-Coupled Receptor Oligomerization and Signaling. *Mol Pharmacol* 75:733–739.

248. Bonanomi D, et al. (2012). Ret Is a Multifunctional Coreceptor that Integrates Diffusible- and Contact- Axon Guidance Signals. *Cell.* 148(3):568-82.

249. Carmena M, et al. (2012). The chromosomal passenger complex activates polo kinase at centromeres. *PLoS Biol.* 10(1):e1001250.

250. Hervouet E, et al. (2011). Proximity ligation in situ assay for monitoring the global DNA methylation in cells. *BMC Biotechnol.* 11:31.

251. Renfrow JJ, et al. (2011). Gene-protein correlation in single cells. *Neuro Oncol.* 13(8):880-5.

252. Vuoriluoto M, et al. (2010). Spatio-temporal composition of the mitotic Chromosomal Passenger Complex detected using in situ proximity ligation assay. *Mol Oncol.* 5(1):105-11.

253. Soriano A, et al. (2009). Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J Med Chem.* 52(18):5590-602.

254. Waldhoer M, et al. (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(25):9050-5.

255. Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman KP. (2006). Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol Pharmacol.* 69(1):45-55.

256. Milligan G. (2006). G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov Today.* 11(11-12):541-9.