



REVISÃO

FISIOLOGIA DOS ADRENOCEPTORES CARDÍACOS

PHYSIOLOGY OF CARDIAC ADRENOCEPTORS

Wagner Jesus PINTO¹

Silvana Maria GUIDA-CARDOSO¹

Miguel Arcanjo AREAS¹

RESUMO

Adrenoceptores (receptores adrenérgicos ou AR.'s) são proteínas de sete alças ancoradas à membrana plasmática, que respondem a estímulos catecolaminérgicos. São classificados em α -adrenoceptores e β -adrenoceptores, sendo que há dois subtipos principais de α receptores adrenérgicos (α_1 e α_2) e três subtipos de β -adrenoceptores (β_1 , β_2 e β_3), embora se especule sobre a existência de um receptor β_4 . Os receptores adrenérgicos- α_1 ativam a maquinaria da fosfolipase C, gerando inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol como segundos mensageiros intracelulares, enquanto que os receptores adrenérgicos- α_2 estão acoplados à adenilato ciclase e, no meio intracelular, reduzem a formação de adenosina monofosfato cíclico, inibindo o canal de cálcio, de maneira que a ativação dessa subclasse de receptores promove efeitos inibitórios na célula onde está presente. Em contrapartida, todos os receptores adrenérgicos β aumentam a formação de adenosina monofosfato cíclico intracelular. Na vigência de estímulos prolongados, os receptores adrenérgicos sofrem dessensibilização, assim como vários outros sistemas biológicos de sinalização. A dessensibilização pode se dar pelos seguintes meios: fosforilação via cinases específicas; fosforilação por cinases efetoras; por endocitose do receptor; *down-regulation*, via fosforilação da subunidade α da proteína G; e, finalmente, por redução da transcrição intracelular de RNA-mensageiro. A integridade fisiológica dos receptores adrenérgicos é dependente de um meio ideal que pode sofrer alterações em função de diversos fatores, tais como a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo.

Termos de indexação: colesterol, fisiologia, fisiologia cardiovascular, receptores adrenérgicos.

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: WJ. PINTO. E-mail: <wagnerjp70@directnet.com.br>.

ABSTRACT

Adrenoceptors (adrenergic receptors, AR.'s) are seven-loop proteins which, docked in the plasmatic membrane, respond to catecholaminergic stimuli. They are classified in alpha-adrenergic receptors (α -adrenoceptors or α AR.'s) e beta-adrenergic receptors (β -adrenoceptors or β AR.'s). There are two main subtypes of alpha-adrenergic receptors (α_1 and α_2) and three subtypes of beta-adrenergic receptors (β_1 , β_2 and β_3); besides, there's speculation about the existence of the receiver β_4 . The α_1 - adrenergic receptors activates the intracelular mechanism of phospholipase C, generating inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol as intracellular second-messengers, while the α_2 - adrenergic receptors is coupled to the adenylate cyclase generating mechanism and, in intracellular milieu, reduce the formation of adenosine monophosphate cyclic, inhibiting the calcium channel, so that the activation of this subclass receptor promotes inhibitory effects in the cell where it is present. Nevertheless, all β -adrenoceptors increase the formation of intracellular adenosine monophosphate cyclic. When there are prolonged stimuli, they trigger desensitization of adrenergic receptors, as well as of several other biological signaling systems. The desensitization may happen by the following mechanisms: phosphorylation by specific kinase, phosphorylation by effector kinase, endocytosis of the receptor; down-regulation, by phosphorylation of the G protein subunity and, finally, by reduction of the RNA-messenger intracellular transcription. The physiologic integrity of adrenergic receptors is dependent on an ideal environment, which may, however, undergo alterations due to diverse factors, such as hypercholesterolemia and exposure to free radicals.

Indexing terms: cholesterol, physiology, cardiovascular physiology, adrenergic-receptors.

INTRODUÇÃO

Os adrenoceptores (receptores adrenérgicos ou AR.'s) fazem parte da superfamília de receptores de sete alças transmembrânicas acopladas à proteína G. Os receptores desta superfamília apresentam um segmento N-terminal-extracelular, 7 domínios transmembranares (TMs), 3 alças extracelulares, 3 alças intracelulares, mais um segmento C-terminal-intracelular¹. Uma quarta alça citoplasmática é formada quando o segmento C-terminal é palmitoilado numa cisteína, função necessária no fenômeno de dessensibilização. Cada uma das 7 TMs é geralmente composta por 20-27 resíduos de aminoácidos; o segmento N-terminal, de 7 a 595 resíduos; as alças, de 5 a 230; e os segmentos C-terminal, de 12 a 359². Esses domínios variam muito no seu tamanho, indicando estruturas e funções diversas. Curiosamente, há alguma correlação positiva entre o comprimento do segmento N-terminal e o tamanho do ligante,

sugerindo um papel ativo deste segmento no acoplamento do agonista, especialmente para grandes polipeptídeos e hormônios glicoprotéicos.

Os efeitos biológicos das catecolaminas são mediados por dois tipos de receptores adrenérgicos, α e β . As catecolaminas são compostos que apresentam um núcleo catecol (um anel benzênico com dois grupamentos hidroxilas adjacentes) e uma cadeia lateral contendo um radical amina. Do ponto de vista farmacológico, as principais catecolaminas são: adrenalina, noradrenalina, dopamina e isoprenalina (Figura 1).

A noradrenalina é liberada por terminações simpáticas pós-ganglionares, enquanto que a adrenalina é liberada pela medula da glândula supra-renal. Já a dopamina é um precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, o qual atua como neurotransmissor no cérebro e possivelmente também no sistema nervoso periférico. A isoprenalina é uma catecolamina sintética, derivada

da noradrenalina. Os receptores adrenérgicos podem ser classificados em termos de potência do agonista, a saber:

Receptores do tipo $\alpha \rightarrow$ Noradrenalina > Adrenalina > Isoprenalina

Receptores do tipo $\beta \rightarrow$ Isoprenalina > Adrenalina > Noradrenalina

Existem dois subtipos principais de receptores adrenérgicos do tipo α (α_1 e α_2) e três subtipos de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3) embora se especule sobre a existência de um receptor β_4 . Estudos de clonagem comprovam que todos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, sendo que os receptores α_1 ativam a maquinaria da fosfolipase C gerando assim inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros, enquanto que os receptores α_2 estão acoplados negativamente à adenilato ciclase, promovendo sua inibição e reduzindo assim a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) no meio intracelular e inibindo o canal de cálcio, de maneira que a ativação dessa subclasse de receptores, promove efeitos inibitórios na célula onde está presente.

Em contrapartida, todos os receptores do tipo β aumentam a formação de AMPC intracelular. No coração, os adrenoceptores respondem às catecolaminas geralmente de forma oposta: enquanto os adrenoceptores deprimem a atividade cardíaca, os β -adrenérgicos a estimulam. Estão

distribuídos em diversos tecidos e órgãos, exercendo efeitos inibitórios ou estimuladores em função da maquinaria bioquímica enzimática que acionam no meio intracelular (Quadro 1).

Configuração espacial dos adrenoceptores

Os adrenoceptores apresentam sete alças transmembrânicas (TMs) por uma razão estrutural e funcional. Sete alças podem ser o mínimo necessário para se formarem 6 alças e um núcleo transmembranar, com tamanho e versatilidade suficientes para oferecer um grande repertório de especificidades, mecanismos de regulação e locais de contato para proteínas G e outras moléculas sinalizadoras, como por exemplo, cinases, fosfolipase C, cinases acopladas às proteínas G, arrestina, calmodulina, e/ou proteína cinase C.

Em contraste, cinco alças TMs podem ser insuficientes para formar um núcleo transmembranar estável e flexível, enquanto que nove seria mais que o necessário.

Algumas α -hélices TM estão inclinadas na membrana. Por exemplo, o domínio TM-3 da rodopsina animal é o mais inclinado ($\sim 30^\circ$) enquanto que os TMs 4, 6 e 7 são os menos inclinados. Os TMs 3, 5 e 6 são projetados da bicamada lipídica para a superfície extracelular mais que os outros. Os adrenoceptores estão arranjados como uma estrutura fechada no sentido anti-horário desde o TM1 até

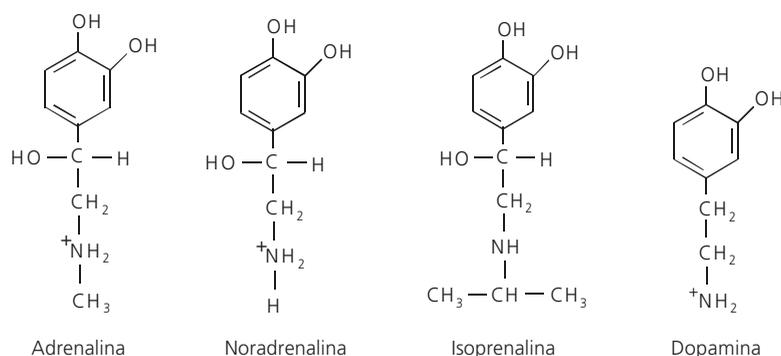
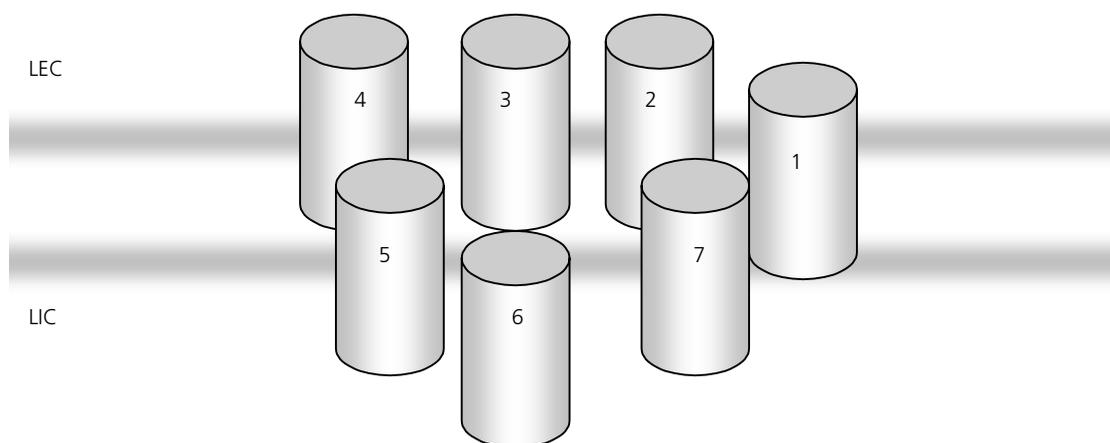


Figura 1. As principais catecolaminas, adrenalina, noradrenalina, dopamina e isoprenalina.

Quadro 1. Efeitos desencadeados em função da estimulação de diferentes tipos de receptores adrenérgicos.

Efeitos sobre	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
Vasos sanguíneos	Vasoconstrição	Vasoconstrição		Vasoconstrição	
Pulmões	Broncoconstrição			Broncodilatação	
Musculatura do TGI	Relaxamento	Relaxamento			
Miométrio	Contração			Relaxamento	
Músculo detursor				Relaxamento	
Íris	Contração				
Frequência cardíaca			Aumento		
Inotropismo cardíaco			Aumento		
Músculos esqueléticos				Tremor	Termogênese
Glicogênio hepático	Glicogenólise			Glicogenólise	
Tecido adiposo					Lipólise
Secreção de insulina		Redução			
Terminações adrenérgicas		Redução da extrusão de vesículas	Aumento da extrusão de vesículas		
Terminações colinérgicas		Redução da extrusão de vesículas			
Saliva	Aumento da concentração de K^+		Aumento da concentração de ptialina		
Agregação plaquetária		Aumento			
Liberação de histamina via mastócitos				Inibição	

**Figura 2.** Disposição de um receptor de sete alças transmembrânicas. Arranjo anti-horário dos domínios transmembrânicos.

TM7, quando observados a partir da face extracelular (Figura 2). Tal orientação dos domínios TMs impõe especificidades estereoquímica e geométrica por parte do ligante, tanto ao núcleo TM, como à sua

ligação. Neste arranjo, o núcleo é constituído principalmente pelas porções TM-2, 3, 5, 6, e talvez 7, enquanto que os TM-1 e 4 são mantidos na periferia. Este arranjo é consistente com a percepção

de que, quanto mais hidrofílicos os domínios (TM-1, 4 e 7), mais expostos à bicamada lipídica, em contraste com os domínios mais hidrofóbicos (TM-2, 3, 5 e 6).

Desconhece-se a existência de proteínas de sete alças cujas porções TM assumam uma configuração aberta de TM-1 a TM-7. Arranjos diferentes podem prover mecanismos distintos para a interação agonista-receptor. Por exemplo, se o domínio TM-7 se associar, mais fortemente com o TM-2 do que com o TM 1, um espaço profundo surgirá entre TMs 1 e 7. Este espaço pode fornecer um local de ligação para a cadeia de ácido graxo do ácido lisofosfatídico.

Adicionalmente, os TMs 1 e 7 de um receptor TM de sete alças podem associar-se com os TMs 1 e 7 de outro receptor para formar um dímero. Assim, ao que parece, a evolução direcionou o desenvolvimento estrutural dos adrenoceptores para um arranjo que fosse mais energeticamente adequado.

Os β -Adrenoceptores

O gen que expressa o β -adrenoceptor humano (AR- β) localiza-se no braço longo do cromossomo 5, apresentando aproximadamente 1200 pares de bases. O β -adrenoceptor apresenta cerca de 413 resíduos de aminoácidos em sua seqüência, com um peso de 46 mil daltons. No coração, sua estimulação promove taquicardia e inotropismo positivo, aumentando a demanda de oxigênio e nutrientes para os demais tecidos e órgãos. β_1 , β_2 e β_3 encontram-se no átrio, enquanto que β_1 está mais presente nos ventrículos.

Especula-se que um quarto subtipo de receptor β , denominado β_4 (ainda não clonado), parece também estar presente no coração. Os adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3 diferem entre si principalmente quanto à afinidade pelas catecolaminas; enquanto o receptor β_1 apresenta a mesma afinidade tanto para adrenalina quanto para noradrenalina, o receptor β_2 tem muito mais afinidade pela adrenalina do que pela noradrenalina.

Diversos autores demonstraram que o adrenoceptor β_2 apresenta dois domínios principais: o

primeiro é constituído pelo terminal amina até o centro da terceira hélice transmembrânica; o segundo, compreende o intervalo que vai do centro da terceira hélice transmembrânica até a porção carboxiterminal intracelular (Figura 3). Quando sintetizadas separadamente, essas duas porções podem ser unidas de forma não covalente, dando origem a um receptor β_2 funcional.

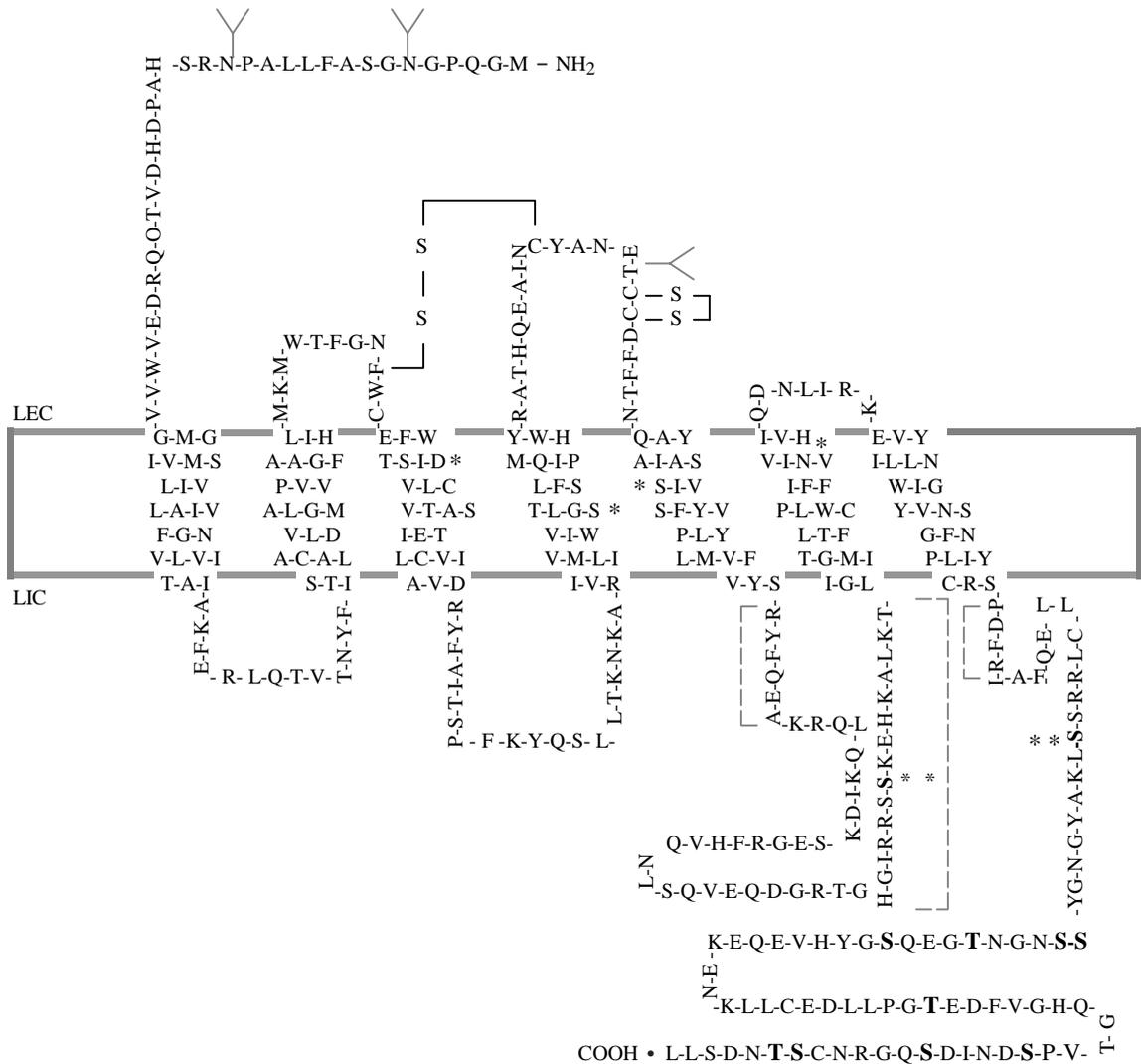
Assim sendo, supunha-se que a presença do agonista, por interagir com aminoácidos específicos do receptor, promoveria uma condição conformacional que seria reconhecida pela proteína G. Em contrapartida, o antagonista estabeleceria um arranjo conformacional que não viabilizaria esse reconhecimento, tornando o receptor irresponsivo. Contudo, recentemente surgiram evidências de que, na ausência do ligante, a conformação espacial do receptor poderia alternar entre duas formas ativa e inativa, privilegiando porém, a forma inativa³.

No caso do receptor β_2 , por exemplo, estaria na forma ativada quando seu domínio intracelular estivesse associado à subunidade α da proteína G, juntamente com a molécula de guanosina trifosfato (GTP). Assim, o complexo subunidade α -GTP, ativando a adenililciclase, converteria o ATP em AMPc, ao passo que, neste momento, o GTP ligado à subunidade α da proteína G é convertido a GDP. O aumento intracelular dos níveis de AMPc causaria redução da afinidade da subunidade α da proteína G para com a adenililciclase, culminando com o retorno do receptor β_2 a seu estado inativo. É provável que o agonista β_2 exerça seus efeitos, não através da mudança conformacional do receptor, mas sim por meio da alteração temporária do estado inativo para o estado ativo do receptor.

Assim, a função do agonista seria amplificar o estado ativo inerente do receptor. Há muitas evidências de que esse mecanismo realmente ocorra, uma vez que as mutações em aminoácidos específicos na seqüência do receptor β_2 conduzem a alterações do estado de equilíbrio do receptor. Este passa a permanecer no estado ativado, apresentando aumentos intracelulares de segundos mensageiros (AMPc), ainda que na ausência do agonista.

Mutações em determinados sítios do receptor β_2 nos possibilitam identificar regiões de importância na ligação agonista-receptor e receptor-proteína G. Alguns resíduos são de importância capital no

acoplamento do agonista ao sítio ativo do receptor β_2 , são eles: o aspartato (Asp), resíduo 29 contado a partir do grupamento amina extracelular, dois resíduos de serina (Ser), 204 e 207, ambos presentes



[] = Destaca as regiões onde o receptor liga-se à proteína G; * Indica os sítios de ligação do agonista; ** Sítios de fosforilação pela PKA; Y = indica glicosilação; T-S.... resíduos em destaque (letras maiores e em negrito) são locais de fosforilação pelo β ARK.

Figura 3. Topologia do adrenoceptor β_2 com suas regiões ou domínios relevantes indicados. O receptor adrenérgico- β_2 apresenta sete domínios transmembrânicos em α -hélice com 24 resíduos hidrofóbicos cada, apresenta no segmento extracelular amino-terminal dois sítios de glicosilação. As alças hidrofílicas que conectam os sete domínios hidrofílicos não são necessárias para a conexão com o ligante (adrenalina), uma vez que o acoplamento se dá no núcleo hidrofóbico do receptor. A ligação da adrenalina com o receptor adrenérgico- β_2 inicia a cascata da proteína G ativando a adenilciclase e com isso gerando AMPc como segundo mensageiro intracelular. A substituição do aminoácido Asp 113 no terceiro domínio transmembrana por um Asn ou Gln resulta em um dramático efeito de redução de afinidade do receptor para com o agonista. Esse resíduo de Asp parece ser conservado em todos os receptores que se ligam a aminas biogênicas e que são modulados por mecanismo de proteína G, mas encontra-se ausente nos receptores cujos ligantes não são aminas. Adaptado de Johnson⁴.

no quinto domínio transmembrânico, e duas fenilalaninas (Phe), resíduos 259 e 290, presentes no sexto domínio transmembrânico³.

Assim sendo, estabeleceu-se que o agonista liga-se ao receptor β_2 em sítios hidrofóbicos localizados no terceiro, quarto e quinto domínios transmembrânicos. O resíduo de aspartato liga-se ao nitrogênio do agonista do receptor β_2 , enquanto que os dois resíduos de serina interagem com o radical hidroxil, do anel de fenil. Outros resíduos podem também ser importantes no reconhecimento do agonista, como é o caso do aspartato (79) presente na segunda hélice transmembrânica e da treonina (164). Os antagonistas β_2 por sua vez não interagem com os mesmos resíduos de aminoácidos que os agonistas. Embora especule-se que os agonistas possam estar ligados ao aspartato-113, parece que não interagem com os dois resíduos de serina no quinto domínio transmembrânico, mas sim com a asparagina, resíduo 312 no sétimo domínio transmembrânico⁴.

Embora a fisiologia dos adrenoceptores β_3 não esteja completamente estabelecida, parecem estar acoplados a uma proteína G a qual modula o influxo de potássio, visto que, sob estímulo de agonistas seletivos, promove cardiodepressão com redução da amplitude do potencial de ação. O adrenoceptor β_3 é uma proteína de 408 resíduos de aminoácidos, que não apresenta sítios intracelulares de fosforilação pela PKA ou β ARK, como é o caso do β_1 e β_3 .

Estudos comparativos mostram que o receptor β_3 apresenta seqüência de aminoácidos similar à dos adrenoceptores β_1 e β_2 , sendo que as porções homólogas entre esses três receptores restringem-se à região das hélices transmembrânicas, próximas das alças intracelulares. Tem-se demonstrado que é nessas regiões que ocorre tanto o acoplamento do agonista ao receptor como a interação do receptor com a proteína G⁵. Os aminoácidos envolvidos no acoplamento com o ligante foram identificados; são eles: (a) Asp-117, presente na terceira hélice transmembrânica, um resíduo essencial para a ligação de todas as aminas biogênicas (a porção acíclica da cadeia, provavelmente forma uma ponte

salina como o grupamento básico do ligante); (b) Ser-169, presente na quarta hélice, parece formar uma ponte de hidrogênio com o radical hidroxil da etanolamina; (c) Ser-209 e Ser-212 na quinta hélice, também encontradas em diversos receptores de aminas biogênicas, formam pontes de hidrogênio com o radical hidroxil do catecol; e, (d) Fen-309, localizada na sexta hélice, estaria envolvida em uma interação hidrofóbica com o anel aromático da catecolamina (Figura 4). Dois domínios transmembrânicos estão envolvidos na ativação da subunidade α da proteína G: o segundo, o qual apresenta um resíduo de Asp-83, e o sétimo, que apresenta a Tyr-336⁴.

Busca-se ainda uma explicação razoável do porquê vários antagonistas β_2 comportam-se como agonistas β_3 (Figura 5). Modelos elaborados em computadores mostraram que o receptor β_3 apresenta um maior sítio de ligação ao agonista em relação aos receptores β_1 e β_2 , em função da menor quantidade de resíduos de aminoácidos que formam esse sítio. Assim sendo, o β_3 seria capaz de acomodar agonistas que para β_1 e β_2 seriam muito grandes⁷. A região de interação do receptor β_3 com a subunidade α da proteína G muito provavelmente deve estar situada no mesmo local proposto para o receptor β_2 , ou seja, entre a segunda e terceira alça intracelular e também no domínio carboxiterminal.

Embora todos os receptores do tipo β estejam ligados à proteína G e deflagrem a cascata da adenililciclase, tem-se proposto que os receptores do tipo β possam também interagir com diferentes subtipos de subunidades α da proteína G ou com algum dos cinco ou doze gens que codificam a subunidade β ou γ , respectivamente, dessa proteína.

Outros estudos propõem ainda que o receptor β_3 possa desencadear mais que um segundo mensageiro intracelular. No caso do tecido adiposo de ratos, foi demonstrado que o receptor β_3 pode interagir com as subunidades Gs e Gi. Gauthier et al.⁸ demonstraram, no septo de corações humanos, a presença do receptor β_3 acoplado à Gi, resultando em efeito inotrópico negativo. Portanto, em contraste com observações anteriores por parte

de Kaumann⁹, que descreveu inotropismo positivo no coração quando há estimulação do receptor adrenérgico β_3 . O adrenoceptor β_3 é também sensível à toxina pertussis secretada pela bactéria *Bordetella pertussis* que causa coqueluche. A toxina pertussis é uma proteína homóloga à toxina do cólera e liga um ADP-ribose a um resíduo específico de cisteína na porção α da proteína G. Por sua vez, o grupamento α modificado, é incapaz de trocar seu GDP por GTP, sendo que nessa condição não consegue inibir a adenilato ciclase⁹.

Discute-se ainda a existência de adrenoceptores β_4 (Figura 6) que, quando estimulados, desencadeariam efeitos cardio-estimulantes, utilizando o AMPc como segundo mensageiro. A

responsividade do coração às catecolaminas é dependente da concentração da mesma, da população de receptores e também da sensibilidade desses receptores ao agonista.

Os α -Adrenoceptores

Os adrenoceptores α -1 ($AR\alpha$ -1) são subdivididos em $AR\alpha$ -1_A, $AR\alpha$ -1_B e $AR\alpha$ -1_D e suas formas clonadas são representadas por $AR\alpha$ -1 α , $AR\alpha$ -1b e $AR\alpha$ -1d respectivamente. Os $AR\alpha$ -1 mediam várias ações cardiovasculares de aminas simpaticomiméticas tais como: vasoconstrição, inotropismo cardíaco positivo, hipertrofia, metabolismo e remodelamento cardíaco. Os subtipos α -1 são decorrentes da expressão de diferentes gens,

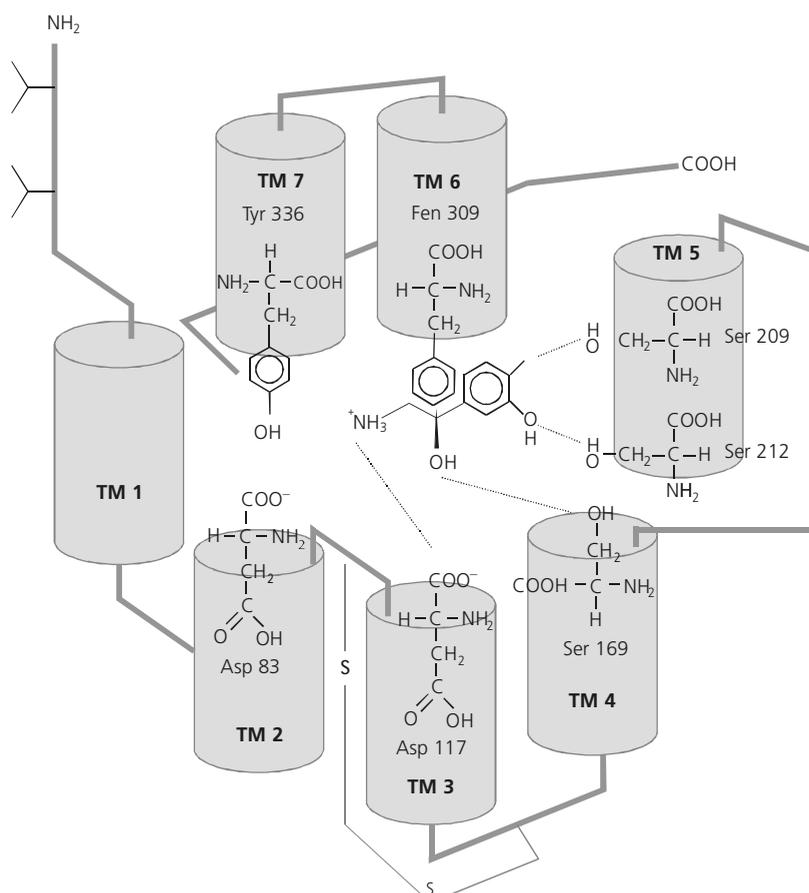


Figura 4. Modelo da região de acoplamento do agonista com o receptor adrenérgico β_3 . O agonista (noradrenalina) é mostrado envolvido por diversos aminoácidos que compõem o sítio de acoplamento do receptor formado por: Asp-117, em TM3; Ser-209 e Ser-212 em TM5; Tir-336 em TM7. Note a suposta ponte dissulfeto (-S-S-) que conecta o resíduo de Cis-110 presente no domínio extracelular 2 a outro resíduo de Cis-189 presente no domínio extracelular 3. TM=região transmembrânica do receptor. Adaptado de Nagamoto⁶.

sendo, portanto, diferentes quanto à estrutura, acoplamento à proteína G, distribuição tissular, afinidades com antagonistas e agonistas, regulação e sistema de sinalização. $AR\alpha-1_A$ e $AR\alpha-1_B$ mediam

respostas inotrópicas positivas, mas, a hipertrofia cardíaca está relacionada principalmente a $AR\alpha-1_A$. Quanto ao $AR\alpha-1_D$, a única função relacionada a ele é a vasoconstrição.

Substâncias agonistas β_1 , β_2 e antagonistas β_3

Nome	Estrutura química	Nome	Estrutura química
Noradrenalina		Adrenalina	
Isoproterenol		Salbutamol	
Clenbuterol		SR 58611 A	
BRL 37344			

Substâncias agonistas β_1 , β_2 e antagonistas β_3

Nome	Estrutura química
Bupranolol	
ICI 118551	
CGP 20712A	

Figura 5. Comparação das várias estruturas antagonistas β_1 e β_2 com os agonistas seletivos β_3 .

Continuação

Substâncias agonistas β_1 , β_2 e antagonistas β_3

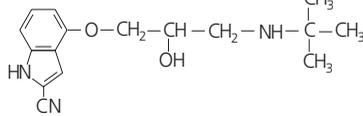
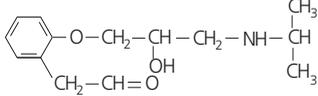
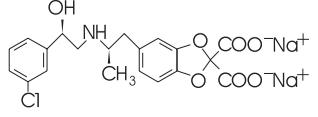
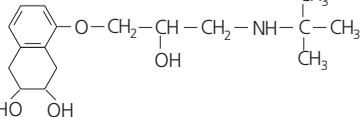
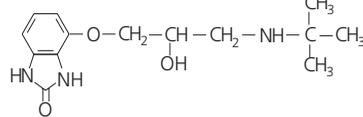
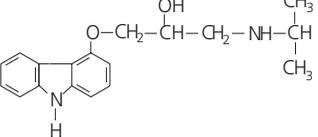
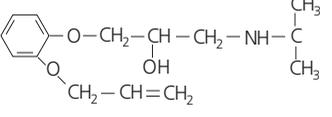
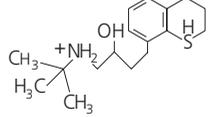
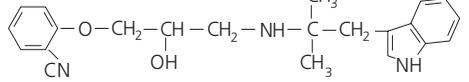
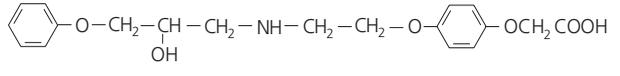
Nome	Estrutura química	Nome	Estrutura química
Cyano-Pindolol		Alprenolol	
CL 316243		Nadolol	
CGP 12177 A		Carazolol	
Oxprenolol		Tertatolol	
Bucindolol			
ICI 201651			

Figura 5. Comparação das várias estruturas antagonistas β_1 e β_2 com os agonistas seletivos β_3 .

Os adrenoceptores α -1 apresentam certo grau de homologia entre si (Figura 7) e dispõem de cerca de 20 a 25 aminoácidos hidrofóbicos que correspondem às 7 alças transmembrânicas; estas, por sua vez, estão conectadas por 6 domínios hidrofílicos, sendo 3 presentes no meio intracelular

e 3 no meio extracelular¹¹. Essas alças são muito similares entre os subtipos em relação ao tamanho; a primeira e a segunda alça extracelular apresentam um único resíduo de cisteína, conservado em todos os receptores de sete alças acoplados à proteína G¹¹. Ao que parece, esse resíduo é importante no

TM-1								
AR α -1a	ILL	G	VI	L	GGL	IL	FGVL	GNILVLSVAC
AR α -1b	ISV	G	LLV	L	GAF	IL	FAIV	GNILVLSVAC
AR α -1d	VGW	G	VF	L	AAF	IL	MAVA	GNILVLSVAC

TM-2								
AR α -1a	Y	Y	IVNLA	V	ADLLL	TS	TVLPFSA	IF
AR α -1b	Y	F	IVNLA	M	ADLLL	SF	TVLPFSA	AL
AR α -1d	Y	F	IVNLA	V	ADLLL	SA	TVLPFSA	TM

TM-3									
AR α -1a	WAAVDVLCCTAS	MG	LC	I	IS	I	DRY	I	GV
AR α -1b	WAAVDVLCCTAS	LS	LC	A	IS	I	DRY	I	GV
AR α -1d	WAAVDVLCCTAS	LS	LC	T	IS	V	DRY	V	GV

TM-4												
AR α -1a	LMA	L	LCV	W	ALSL	V	I	S	I	GPL	F	G
AR α -1b	ILA	L	LSV	W	VLST	V	I	S	I	GPL	L	G
AR α -1d	AAI	L	ALL	W	VVAL	V	V	S	V	GPL	L	G

TM-5																			
AR α -1a	G	Y	VL	FS	ALG	SFY	L	P	L	A	I	L	V	M	Y	C	R	V	
AR α -1b	R	Y	AL	FS	SLG	SFY	I	P	L	A	V	I	L	V	M	Y	C	R	V
AR α -1d	G	Y	AV	FS	SVC	SFY	L	P	M	A	V	I	L	V	M	Y	C	R	V

TM-6														
AR α -1a	TL	G	IVVG	C	F	V	L	C	W	L	PFF	LVM	P	I
AR α -1b	TL	G	IVVG	M	F	I	L	C	W	L	PFF	IAL	P	L
AR α -1d	TL	A	IVVG	V	F	V	L	C	W	F	PFF	FVL	P	L

TM-7																
AR α -1a	VFK	IV	F	W	L	G	Y	L	NSQ	I	NP	I	I	Y	P	C
AR α -1b	VFK	VV	F	W	L	G	Y	F	NSQ	L	NP	I	I	Y	P	C
AR α -1d	VFK	VI	F	W	L	G	Y	F	NSQ	C	NP	L	I	Y	P	C

E-1							
AR α -1a	MVFLSGNASDSS	N	CTQPPAP-VNISKA				
AR α -1b	ANFTGPNQTSS N KLEGWHPA S PDLDTGHNT N M	N	STLPQ---LDITRA				
AR α -1d	GEPGSAGAGGDV A S SRNDEGSGAGVGGGGGAGGPVGGVAPGESPAAGGASGGGGGASSGGASSDPRPGEFSVLLDRFTM	N	GTAA VGGLVWSAQQ				

AR α -1a	EVLGYW	AF	GR	V	FC	NI
AR α -1b	EVLGYW	VL	GR	I	FC	DI
AR α -1d	EVLGFV	AF	GR	A	FC	DV

E-3												
AR α -1a	W	R	P	A	P	E	D	ETI	C	QIN	EE	P
AR α -1b	W	K	P	A	P	N	D	DKE	C	GVT	EE	P
AR α -1d	W	K	P	V	P	P	D	ERF	C	GIT	EE	A

E-4							
AR α -1a	GS	F	F	PDF	KP	SET	
AR α -1b	GS	L	F	STL	KP	PDA	
AR α -1d	GS	L	F	PQL	KP	SEG	

Figura 7. Sequência de aminoácidos das formas clonadas dos adrenoceptores α 1. Os resíduos que são homólogos nos três subtipos estão em destaque nas caixas com linhas descontínuas, os espaços entre os resíduos foram colocados para otimizar a organização. Os traços entre os resíduos indicam que o aminoácido daquela posição não foi ainda identificado. TM=domínio transmembrânico I=alça intracelular E=alça extracelular. Adaptado de Graham¹¹.

Mecanismos moleculares de dessensibilização dos adrenoceptores

Uma característica dos sistemas biológicos de sinalização consiste na adaptação a estímulos de longa duração, por meio da redução da resposta a eles desencadeada, um processo chamado dessensibilização. Esses sistemas, portanto, respondem a alterações nos níveis de estimulação, e não aos seus valores absolutos. O processo de dessensibilização pode ser dividido quanto ao estímulo causal, quanto à duração e quanto ao mecanismo envolvido. Divide-se, quanto ao estímulo causal, em heterólogo (ou receptor generalizado) e homólogo (ou receptor específico); quanto à duração, em rápido (minutos) ou lento (horas ou dias); e, finalmente, quanto ao mecanismo envolvido, perda da função sinalizadora receptora, redução do número de receptores ou *down-regulation*.

A dessensibilização homóloga envolve a fosforilação do receptor por cinases acopladas à proteína G, aumentando a afinidade do receptor às moléculas de β -arrestina, cuja ligação ao receptor impede a interação deste com a proteína G, estabilizando o estado inativo (Figura 8). Em adição, a β -arrestina, uma proteína citoplasmática, liga-se com alta afinidade às moléculas de clatrina, iniciando a internalização do receptor fosforilado em uma vesícula de clatrina, cuja formação é regulada por uma GTPase¹⁷. Embora a fosforilação seja o passo principal da dessensibilização do receptor via internalização, recentes dados mostram que a arrestina pode ligar-se à proteína G do receptor, constituindo assim uma via de dessensibilização independente da fosforilação do receptor¹⁸.

Muitos receptores acoplados às proteínas G sofrem dessensibilização via retroalimentação negativa por segundos mensageiros desencadeados por cinases, tais como proteínas cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC). Este tipo de fosforilação é heteróloga, uma vez que, qualquer estímulo que seja capaz de aumentar níveis intracelulares de AMPc ou diacilglicerol, apresenta potencial para induzir dessensibilização. Assim sendo, na dessensibilização

homóloga, a redução da responsividade está relacionada exclusivamente com o agente que promoveu o estímulo na célula (agonista), enquanto que na dessensibilização heteróloga, essa redução se dá por agentes não-relacionados com o estímulo inicial, sendo que podem ser afetados o receptor e outras vias posteriores de sinalização. Contudo, essa aparente divisão entre os processos, resulta apenas de uma estratégia descritivo-operacional, pois ambos os processos podem ocorrer simultaneamente na célula.

Entre os adrenoceptores, β_2 foi o melhor estudado uma vez que foi o primeiro receptor dessa classe a ser purificado em quantidades significativas e a ter a sua seqüência elucidada^{16,19,20}. Devido a isso, muitas das hipóteses de dessensibilização dos receptores acoplados à proteína G são baseadas nos estudos efetuados no AR- β_2 . Os mecanismos individuais que têm sido propostos para a dessensibilização do AR- β_2 estão listados na Tabela 1, juntamente com seu tempo de ocorrência ($t_{1/2}$), a extensão de sua dessensibilização e sua sensibilidade ao agonista. Vários desses mecanismos operam também em outros receptores acoplados à proteína G, embora existam também muitos receptores que não estão sujeitos a todos esses mecanismos regulatórios.

Dessensibilização via cinases específicas

O mais rápido e quantitativamente mais importante mecanismo de inativação do receptor é sua fosforilação por meio de uma proteína cinase ligada à proteína G, genericamente denominada *cinase do receptor β -adrenérgico*, ou β ARK. A fosforilação aumenta a afinidade do receptor para a proteína β -arrestina. A ligação da β -arrestina ao receptor fosforilado inibe a interação do receptor com a proteína G, criando, portanto, um estado desacoplado ou dessensibilizado do receptor.

Diversos autores identificaram isoformas de β ARK e de β -arrestina²², concluindo que possivelmente existam variantes de β -arrestina; entretanto, desafortunadamente, a especificidade dessas

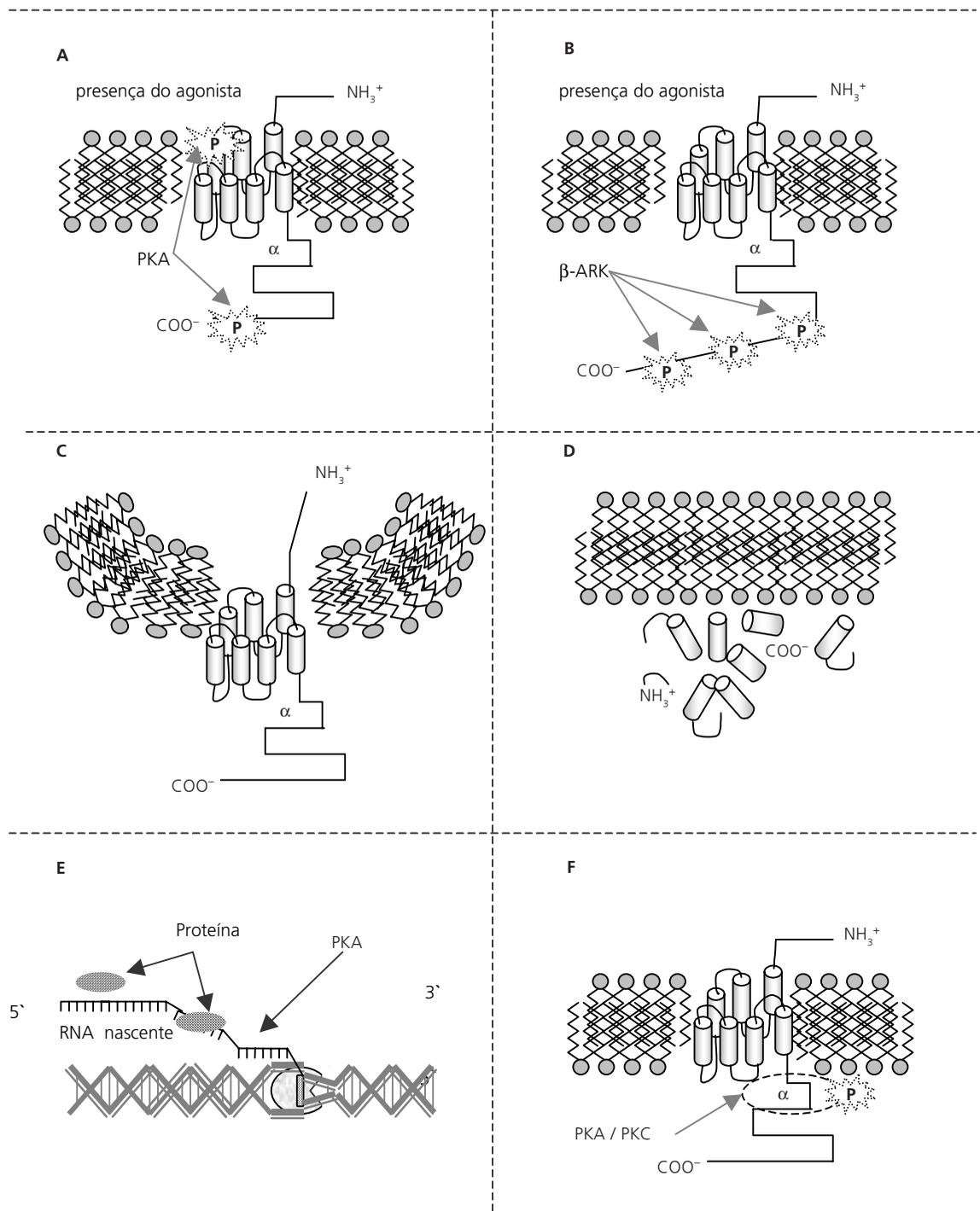


Figura 8. Mecanismos de dessensibilização dos adrenoceptores. Modelos propostos para o receptor β_2 . Em "A" dessensibilização via PKA, que fosforila preferencialmente a terceira alça transmembrânica e não é seletiva em sua fosforilação, também apresenta a propriedade de reduzir a capacidade do receptor em ativar a cascata de proteína G. Em "D" dessensibilização via endocitose do receptor, esse evento pode ser facilitado pela fosforilação mas pode ocorrer sem que essa se processe. Em "D" dessensibilização via *down regulation* por meio de degradação lisossomal. Em "E" mecanismo de dessensibilização de adrenoceptores por meio da desestabilização da molécula de RNA mensageiro. Em "F" dessensibilização via fosforilação de subunidades da proteína G.

Tabela 1. Mecanismos propostos para a dessensibilização do receptor adrenérgico β_2 .

Mecanismo	t ^{1/2}	% de receptores funcionantes	Sensibilidade (EC ₅₀ para isoproterenol)	Especificidade
<i>Desacoplamento</i>				
β -AR/ β -arrestina	0.1 – 1 min	50 – 70	30 – 1000 nM	Homólogo
PKA	1 – 3 min	20 – 50	1 – 30 nM	Heterólogo
Seqüestro	1 – 60 min	10 – 60	30 – 1000 nM	Homólogo
<i>Down-regulation</i>				
Degradação do receptor				
Agonista-específico	0.5 – 24 h	20	1 – 100 nM ?	Homólogo
PKA-mediada	0.5 – 24 h	20	1 – 100 nM ?	Heterólogo
Desestabilização do RNAm	0.5 – 24 h	50	?	Heterólogo ?

Fonte: Lohse²¹.

isoformas não são conhecidas. A meia vida do mecanismo β ARK/ β -arrestina foi estimada em cerca de 15 segundos, de maneira que esse mecanismo é bastante lento para cessar o sinal por parte do receptor²³, o que deve ocorrer pela própria dissociação do complexo agonista-receptor. De fato, em muitos sistemas receptores, essa dissociação é bastante frágil em função da afinidade fisiológica do agonista com o receptor (da ordem de 10^{-6} M) e a taxa de dissociação é tão rápida que não pode ser mensurada por meio de técnicas convencionais.

No caso dos receptores β -adrenérgicos, a exposição contínua às catecolaminas, provoca a fosforilação de um ou mais resíduos de serina do receptor por diversas cinases, incluindo a PKA. Essa fosforilação atua somente sobre o complexo ligante-receptor e reduz a afinidade do receptor pelo agonista. Tanto o receptor β_1 quanto o β_2 apresentam sítios de fosforilação em seu domínio citosólico, os quais são reconhecidos por duas cinases: PKA e β ARK. A cinase PKA não é seletiva em sua fosforilação, ela tem a propriedade de reduzir a capacidade do receptor de ativar a cascata de proteína G, entretanto, a segunda cinase (β ARK) é seletiva, visto que fosforila somente os receptores ocupados por agonistas. Esse evento inclui a fixação da β -arrestina no receptor, resultando no desacoplamento do receptor do complexo da proteína G.

Os adrenoceptores não são todos igualmente sensíveis à dessensibilização; o mais sensível é o β_2 , depois o β_1 que, em relação ao β_2 , não apresenta

tantos sítios de fosforilação e ainda lhe faltam resíduos de tirosina relacionados à *down-regulation*. No caso do β_3 , pode-se dizer que é quase resistente à dessensibilização, pois não sofre fosforilação induzida por nenhuma das cinases PKA ou β -ARK, visto que não apresenta sítios para serem fosforilados no domínio C-terminal²⁴.

Dessensibilização via cinases efetoras

Muitos receptores acoplados à proteína G são também fosforilados via cinases efetoras, as quais são: cinase A e cinase C (PKA e PKC respectivamente).

Esse tipo de fosforilação promove um *feedback* negativo direto por meio da enzima efetora (PKA), ao mesmo tempo em que permite uma dessensibilização generalizada e não específica do receptor. Uma vez que mais estudos foram conduzidos no receptor β_2 , há consenso sobre dois sítios para a fosforilação via PKA²⁵: o primeiro, localizado na terceira alça transmembrânica, e o outro, no domínio C-terminal intracelular²⁶. Ao que parece, a PKA opta por fosforilar preferencialmente o sítio presente na terceira alça transmembrânica, o que *per se* é suficiente para abolir a ativação da proteína G por parte do receptor; isto foi comprovado por meio de experimentos com seqüências de peptídeos correspondentes ao segmento C-terminal da terceira alça transmembrânica²⁶.

A PKC também pode fosforilar o $AR\beta_2$, talvez nos mesmos sítios utilizados pela PKA e, igualmente à PKA, a PKC prefere o sítio presente na terceira alça transmembrânica, desencadeando efeitos similares aos descritos para a PKA²⁷. Em resumo, dois diferentes mecanismos fosforilativos desencadeiam dessensibilização dos receptores acoplados à proteína G: O primeiro, é mediado por uma cinase específica, é rápido, estritamente homólogo e possivelmente limitado a receptores sinápticos. O segundo, mediado por cinases efetoras, PKA ou PKC, é mais lento que o primeiro, é geral e heterólogo. O grau em que esses dois mecanismos irão operar em uma determinada célula, dependerá de múltiplos fatores, tais como o número de sítios de fosforilação presentes no receptor para diferentes cinases, os níveis celulares das diferentes cinases e β -arrestinas, e o grau de estimulação sofrida pelo receptor.

Modulação da sensibilidade do receptor via endocitose

Há vários motivos para crer que o seqüestro de receptores não constitui um mecanismo de dessensibilização: (a) o seqüestro de receptores é muito lento, comparado à fosforilação; (b) Em muitas células onde se observa o seqüestro de receptores, a extensão desse mecanismo é muito discreta, quando comparada com a magnitude da dessensibilização observada.

Assim sendo, tem-se atribuído ao mecanismo de seqüestro de receptores a função de "ressensibilização", uma vez que receptores adrenérgicos β_2 captados, quando submetidos à estimulação por agonistas, são menos fosforilados do que aqueles presentes na membrana, que não sofreram captação²⁸. Em contrapartida, quando se inibe a captação de $AR\beta_2$ por diversos meios, observa-se ressensibilização do receptor após a remoção do agonista³. Os subtipos de receptores podem apresentar distinta capacidade para serem seqüestrados: por exemplo, o $AR\beta_2$ sofre captação enquanto que $AR\beta_1$ e $AR\beta_3$ não estão sujeitos a esse evento²⁹. Dentre os subtipos α_2 , o seqüestro de $AR\alpha_2C2$ e $AR\alpha_2C10$ é

mais pronunciado que o subtipo $AR\alpha_2C4$, o que foi confirmado por meio de estudos com radioligantes³⁰.

Dessensibilização via "down-regulation"

A redução da população de receptores em função de sua destruição lisossomal denomina-se *down-regulation*³¹. O *down-regulation* é um processo lento de dessensibilização, comparado com os anteriormente descritos ocorrendo ao longo de horas de exposição ao agonista e pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos: aumento da degradação dos receptores ou redução de sua síntese²¹.

Novamente o receptor melhor estudado nesse aspecto é o $AR\beta_2$; sua degradação apresenta duas fases: uma, iniciada pelo acoplamento do agonista; outra, mediada pela PKA³². Interessantemente, células que apresentam defeitos em componentes pós-receptores, tais como PKA ou adenililciclase, ainda exibem *down-regulation* induzido por agonistas. Contudo, o acoplamento do receptor à proteína G pode ser necessário, uma vez que, mutações no grupamento G_s da proteína G, ou mesmo no próprio receptor, podem prejudicar o fenômeno de *down-regulation*. No caso do receptor $AR-\beta_2$, a fosforilação induzida pela PKA parece aumentar sua taxa de degradação; em estudos com receptores mutantes, onde os sítios de fosforilação para PKA foram suprimidos, os receptores se degradaram mais lentamente, quando comparados com suas formas selvagens³². O mesmo não ocorre com os receptores, que são fosforilados pela β -ARK uma vez que receptores mutantes (faltando os sítios de fosforilação para β -ARK) sofrem degradação normalmente.

Não está claro ainda se os receptores a serem degradados sofrem internalização. Muito embora este pareça ser um modelo plausível, pelo menos em termos mecânicos, estudos mostram que mutações nos dois resíduos de tirosina localizados na porção C-terminal do receptor β_2 que sabidamente prejudicam a *down-regulation* do receptor, não os impedem de sofrer captação³³. Mutações na terceira hélice transmembrânica do $AR-\beta_2$ também não interferem no mecanismo de captação do receptor,

mas desencadeiam uma dessensibilização via *down-regulation* ineficiente. Tais dados têm sido interpretados como uma evidência a mais contra a existência do mecanismo de dessensibilização via internalização do receptor. Por outro lado, Zastrow & Kobilka³⁴, demonstraram que apenas pequenas porções dos receptores seqüestrados chegam a unir-se aos compartimentos lisossomais sendo que a maioria sofre reciclagem, retornando à membrana plasmática.

Dessensibilização mediada via redução de RNA-mensageiro

O processo de dessensibilização (*down-regulation*), pode ainda se dar via redução da síntese celular de RNA-mensageiro (RNAm), redução esta que se dá em função da desestabilização da molécula³⁵. Proteínas que são capazes de se ligar de forma específica ao RNAm do AR- β_2 foram sido identificadas. Não está claro ainda se essa desestabilização do RNAm é agonista específica ou se é mediada pela PKA. O mecanismo⁵ de redução da síntese de RNAm por parte de agonistas foi descrito em vários sistemas de receptores acoplados à proteína G tais como o receptor de TSH, AR- α_{1B} e receptores muscarínicos m1, m2 e m3.

Dentre uma família de receptores, os subtipos podem apresentar diferenças quanto ao grau de dessensibilização via *down-regulation*, por exemplo: AR- β_2 sofre expressivo efeito *down-regulation*; os AR- β_1 , apenas modestamente; enquanto os AR- β_3 quase não sofrem, ou mesmo, não sofrem *down-regulation*²⁹. Entre os subtipos a também há diferenças a esse respeito: os AR- α_{10} e AR- α_{2} sofrem *down-regulation* induzida por agonistas, enquanto que o subtipo AR- α_{4} não³⁶. Essas observações sugerem que os mecanismos que regulam os receptores atuam de maneira extremamente coordenada.

Dessensibilização envolvendo a proteína G

Recentes dados indicam que a dessensibilização pode também ocorrer no nível pós-receptor,

mais precisamente na proteína G. O fenômeno de fosforilação da subunidade α da proteína G por cinases tem sido vastamente discutido como sendo uma via de regulação da função da proteína G. A PKC pode fosforilar a subunidade α da proteína G e tem-se sugerido que tal fosforilação pode interferir no acoplamento com a adenilciclase³⁷. Hausdorff³⁸ descreveu outra via para regulação da proteína G, sugerindo que a subunidade α da proteína G constitui um substrato para a fosforilação de tirosinas por meio da cinase pp60^{c-src}.

Neste caso, como a atividade da proteína G parece aumentar, foi sugerido que este pode ser o mecanismo por meio do qual os receptores de fatores atuam. Alterações na expressão gênica da subunidade α da proteína G também estão relacionadas à dessensibilização de receptores acoplados a proteínas G, uma vez que estudos demonstram que a ativação dos três subtipos de adrenoceptores α_2 reduzem níveis intracelulares de proteína Gi³⁹.

Muito provavelmente, este fenômeno esteja envolvido com o AMPc que inibiria a transcrição de Gi. As alterações na expressão da Gi, induzidas por agonistas em determinados receptores como, por exemplo, o AR α_2 -C4, parecem ser bastante relevantes para a dessensibilização, já que esses receptores quase não apresentam, ou mesmo, não apresentam autofosforilação. O mecanismo esboçado acima sugere que as alterações induzidas pelo agonista podem também afetar os efetores da proteína G. Um exemplo é a ativação da adenilciclase pela PKC³⁶. Em resumo, a dessensibilização modulada pela proteína G, é uma complexa cadeia de eventos, envolvendo alterações na função do receptor, na localização intracelular e na expressão gênica da subunidade α .

CONCLUSÃO

Nas duas últimas décadas, duas técnicas têm revolucionado o conhecimento da farmacologia adrenérgica no nível molecular. A primeira delas é o emprego de radioligantes, que tem permitido a detecção, a caracterização e a quantificação das proteínas de receptores em base molecular; a outra

é a tecnologia do DNA recombinante. Estas técnicas têm permitido o isolamento e a clonagem de cDNA e genes para subtipos de adrenoceptores; as sondas derivadas de tais receptores clonados têm sido usadas para estudar a expressão do RNAm dos adrenoceptores e sua regulação. Essas técnicas aumentaram consideravelmente nossos conhecimentos sobre as características, a função e a regulação dos adrenoceptores, promovendo evolução no campo do desenvolvimento de drogas adrenérgicas.

Embora as técnicas da biologia molecular tenham já estabelecido a correspondência entre as formas clonadas e as nativas dos adrenoceptores, tipos alfa e beta, vários aspectos da farmacologia desses receptores permanecem obscuros como, por exemplo, a relação entre os $AR\alpha_1$ e a hipertrofia cardíaca. Há evidências de que esse subtipo medeia a hipertrofia cardíaca, mas é incerto o papel dos demais receptores-alfa nesse evento. A homeostase cardíaca parece estar diretamente relacionada à integridade fisiológica dos adrenoceptores, sendo que tal integridade pode ser alterada por diversos fatores como, por exemplo, a hipercolesterolemia.

A estrutura e os mecanismos fisiológicos de ação dos adrenoceptores cardíacos são de grande interesse para a área médica, pois conhecê-los mais profundamente possibilitará, com grande eficácia, o planejamento de fármacos moduladores da função cardíaca, melhorando significativamente a qualidade de vida de pessoas portadoras de cardiopatias, como por exemplo, as insuficiências cardíacas.

REFERÊNCIAS

1. Strosberg D. Biotechnology of beta-adrenergic receptors. *Pathol Biol.* 1992; 40(8):767-72.
2. Kurose H, Isogaya M, Kikkawa H, Nagao T. Domains of beta1 and beta2 adrenergic receptors to bind subtype selective agonists. *Life Sci.* 1998; 62(17-18):1513-7.
3. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1983; 268: 337-41.
4. Johnson M. The β -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Méd.* 1998; 158:S146-S53.
5. Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Hill WS, Dixon RAF. Conserved aspartic residues 9 and 113 of the β -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem.* 1989; 264:13572-80.
6. Nagamoto T, Koike K. Minireview: Recent advances in structure, binding sites with ligands and pharmacological function of β -adrenoceptors obtained by molecular biology and molecular modeling. *Life Sci.* 2000; 66:2419-26.
7. Blin N, Federici C, Koscielniak T, Strosberg AD. Predictive quantitative structure-activity relationships (QSAR) analysis of beta 3-adrenergic ligands. *Drug Des Discov.* 1995; 12(4):297-311.
8. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.* 1996; 98(2):556.
9. Kaumann AJ. CGP 12177-induced increase of human atrial contraction through a putative third beta-adrenoceptor. *Br J Pharmacol.* 1996; 117(1): 93-8.
10. Strosberg AD. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:421-50.
11. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. α -adrenergic receptor subtypes: Molecular structure, function and signaling. *Am Heart Assoc.* 1996; 78:737-49.
12. Dowell SJ, Brown AJ. Yeast assays for G-protein-coupled receptors. *Receptors Channels.* 2002; 8(5-6):343-52.
13. Kost T, Kadwell S, Watson M, Clay W, Goetz A, King H, et al. Control of α_1 -adrenergic receptor expression by NH_2 terminal extracellular domain sequences: pharmacology of adrenoceptors. In: *Satellite Symposium of the 12th UIPHAR Congress; 1994 July 21-3; King of Prussia, Pa.*
14. Garcia-Sainz JA. α_1 -adrenergic caion: Receptor subtypes, signal transduction and regulation. *Cell Signal.* 1993; 5:539-47.
15. Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, Cotecchia S. The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: Potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(3):808-13.
16. Hwa J, Gperez DM. Identification of critical determinants of α_1 adrenergic receptor subtype selective agonist binding. *J Biol Chem.* 1995; 270:(23)189-95.
17. Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menárd L, Caron MG. Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G-protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem.* 1996; 271:18302-5.
18. Murkherjee S, Palczewski K, Gurevic V, Benovic JL, Banga JP, Hunzicker-Dunn M. A direct role of arrestins

- in desensitization of the luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:493-8.
19. Benovic JL, Shorr RGL, Caron MG, Lefkowitz RJ. The mammalian beta 2-adrenergic receptor: Purification and characterization. *Biochemistry*. 1984; 23: 4519-25.
 20. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, et al. - Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 1986; 321(6065):75-9.
 21. Lohse JM. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochem Biophys Acta*. 1993; 1179:171-88.
 22. Attramada H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kawatra MM, et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *Biochem*. 1992; 267:17882-90.
 23. Roth N, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:6201-4.
 24. Strosberg AD. Structure, function, and regulation of the three beta-adrenergic receptors. *Obes Res*. 1995; (3 Suppl 4):501S-5S.
 25. Clark RB, Friedman J, Dixon RAF, Strader CD. Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the beta-adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*. 1989; 36:343-8.
 26. Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Ynagaki M, Ogata E, Nishimoto I. Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell*. 1992; 67:723-30.
 27. Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry*. 1992; 31:3193-7.
 28. Silbley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ. Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 9408-12.
 29. Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol*. 1993; 43:548-55.
 30. Eason MG, Liggett SB. Subtype-selective desensitization of alpha 2-adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist-promoted desensitization of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2. *J Biol Chem*. 1992; 267:25473-9.
 31. Collins S, Bouvier M, Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Mechanisms involved in adrenergic receptor desensitization. *Biochem Soc Trans*. 1990; 18:541-4.
 32. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, De-Blasi A, Kobilka BK, et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem*. 1989; 264:16786-92.
 33. Valiquette M, Bonin H, Hhnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:5089-93,
 34. Von Zastrow M, Kobilka BK. Antagonist-dependent and independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem*. 1994; 269(28):18448-52.
 35. Hadcock JR, Wang HY, Malbon CC. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1989; 264(33):19928-33.
 36. Bertin B, Jockers R, Strosberg AD, Marullo S. Activation of a beta 2-adrenergic receptor/Gs alpha fusion protein elicits a desensitization-resistant cAMP signal capable of inhibiting proliferation of two cancer cell lines. *Receptors Channels*. 1997; 5(1):41-51.
 37. Clark R. Regulation of cellular signal transduction pathways by desensitization and amplification. *Trends Cell Biol*. 1994; 4(12):442-3.
 38. Hausdorff WP, Pitcher JÁ, Luttrell DK, Linder ME, Kurose H, Parsons SJ, et al. Tyrosine phosphorylation of G protein alpha subunits by pp60c-src. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(13):5720-4.
 39. Eason MG, LIGGETT SB. Subtype-selective desensitization of alpha 2-adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist-promoted desensitization of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2. *J Biol Chem*. 1992; 267:25473-9.
- Recebido para publicação em 23 de abril e aceito em 9 de agosto de 2004.