



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del Factor Liberador de Corticotropinas
sobre las acciones del Factor de Crecimiento
Relacionado con la Insulina-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA EVANGELINA ÁVILA MUÑOZ

TUTOR: Dr. JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis está totalmente dedicada a las dos personas más importantes en mi vida:

Mis padres

Sin ustedes la vida no tendría el mismo significado. Fueron, son y serán siempre el ejemplo más hermoso e importante para que yo sea una mejor persona.

Los quiero profundamente.....

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis fue realizada bajo la tutoría del *Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes*.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el **CONACYT: CONACYT/SEP BASICAS-2005 No.48777-Q** y **CONACYT-BASICAS-2002 No. 39485-Q**, y se realizó en el **Laboratorio 17 del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN**, con el apoyo técnico de:
Judith Hernández Aranda y Patricia Ávila Velásquez.

Mi profundo agradecimiento a mis sinodales:

Dr. Jesús Adolfo García Sainz, Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Rosario Ortiz Hernández y M en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

A mi tutor:

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

A la máxima casa de estudios y Patrimonio Cultural de la Humanidad:

Universidad Nacional Autónoma de México

y especialmente a la: *Facultad de Ciencias*

Agradezco infinitamente a:

Mi Familia

A mis primos: Mari, Ale y Marco por compartir conmigo su amor por la ciencia.

A mis tíos: Tatz, por ser más que una tía y por todo su cariño y a Abe por todas esas tardes de platicas enriquecedoras en su casa.

A las personas especiales en mi vida

A Mirn, Mónica, Rocío y Mani con quienes el paso por la universidad y esta vida ha sido infinitamente más divertido y feliz.

A todos mis amigos del CIE, años y años de amistad nos unen profundamente.

A Daniel, sabes lo mucho que significas y significarás en mi camino.

A Julia, Luisa y Mariana, fue un placer tantas tardes de trabajo con ustedes en el laboratorio.

A todos aquellos que han estado y estarán junto a mí, los quiero.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Ávila Muñoz María Evangelina 56 78 51 90 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30001254-9</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Jesús Alberto Olivares Reyes</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Jesús Adolfo García Sainz</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra Marcia Hiriart Urdanivia</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra Rosario Ortiz Hernández</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Julio Alejandro Prieto Sagredo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Efecto del Factor Liberador de Corticotropinas sobre las acciones del Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 84 p 2009</p>

ÍNDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
2.1 El Factor Liberador de Corticotropinas (CRF) y sus acciones	2
2.2 El CRF y sus análogos (UcnI, UcnII y UcnIII)	4
2.3 Los receptores (CRF ₁ y CRF ₂) para el CRF y sus análogos	4
2.4 La estructura del receptor CRF ₁	8
2.5 Las rutas de señalización del receptor CRF ₁	9
2.6 El Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 (IGF-1) y sus acciones	13
2.7 El Receptor para IGF-1 (IGF-1R)	14
2.8 Las rutas de señalización del IGF-1	15
a) El Sustrato del Receptor de Insulina -1 (IRS-1) y su papel en la vía de señalización del IGF-1	17
b) El papel de la proteína Shc y su papel en la vía de señalización del IGF-1	21
c) El papel de mTOR en la regulación de la vía del IGF-1	22
III. Antecedentes	25
IV. Hipótesis	28
V. Objetivos	29
VI. Materiales y Métodos	30
6.1 Cultivo Celular	31
6.2 Transfección Celular	31
6.3 Detección de proteínas mediante ensayos de Western Blot	32
a) Detección de fosfo-MAPK por Western Blot	32
b) Detección de fosfo-IR/IGF1R por Western Blot.....	32
c) Detección de fosfo-IRS-1 (Ser 302) y (Ser 636/639) por Western Blot	32
d) Detección de fosfo-p70S6K por Western Blot	32

e) Detección de fosfo-Shc por Western Blot	32
6.4 Análisis de resultados	32
VII. Resultados	33
7.1. El CRF induce la activación de ERK1/2	33
7.2. Efecto de distintos inhibidores en la activación de ERK1/2 inducida por CRF	35
7.3. El IGF-1 induce la activación de ERK1/2	37
7.4. El IGF-1 activa a ERK1/2 a través de PI3K	39
7.5. El IGF-1 activa a su receptor	40
7.6. La activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es mediada a través de la activación de su receptor	41
7.7. El CRF inhibe la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1	43
7.8. La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es inhibida por CRF posiblemente a través de mTOR, mientras que Src, PI3K y PKC parecen no estar involucradas	45
7.9. El CRF no induce ni la fosforilación de IRS-1 en la Ser636/639 ni la fosforilación de p70S6K	47
7.10. El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser302	49
7.11. El CRF inhibe la fosforilación de Shc inducida por IGF-1	51
7.12. El CRF inhibe la fosforilación del receptor de IGF-1	52
VIII. Discusión	54
IX. Conclusiones	59
X. Perspectivas	61
XI. Bibliografía	62

FIGURAS Y TABLAS

Página

- **Introducción**

Figuras

1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)	3
2. Los receptores CRF ₁ y CRF ₂ , y sus ligandos	5
3. Esquema general de los Receptores acoplados a proteínas G	6
4. Secuencia del CRF ₁ R y CRF ₂ R en humanos	9
5. Rutas de señalización activadas por de los receptores CRF ₁ y CRF ₂	10
6. Vías de señalización de MAP cinasas	11
7. Esquema del receptor para IGF-1	15
8. Rutas de señalización activadas por IGF-1	17
9. Dominios del IRS-1 y su fosforilación en residuos de serina (Ser 307/302, Ser 616/612, Ser 632/636)	18

Tablas

1. Fosforilación de IRS-1 en distintas serinas	20
--	----

- **Materiales y Métodos**

Figuras

6.1 Células CHO-K1. Células de ovario de hamster chino.....	30
---	----

- **Resultados**

Figuras

7.1 El CRF tiene un efecto dependiente del tiempo y de la concentración sobre la activación de ERK1/2	34
--	----

7.2 El CRF lleva a cabo sus efectos sobre la activación de ERK1/2 a través de Src, PI3K y PKA	36
7.3 El IGF-1 induce la activación de ERK1/2 de una manera dependiente del tiempo	38
7.4. El IGF-1 induce la fosforilación de ERK1/2 parcialmente a través de PI3K	39
7.5 El IGF-1 activa a IGF-1R	40
7.6 El IGF-1 induce la activación de ERK1/2 a través de IGF-1R	42
7.7 El CRF inhibe la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 de manera dependiente del tiempo y la dosis	44
7.8 La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es inhibida por CRF posiblemente a través de mTOR, mientras que Src, PI3K y PKC parecen no estar involucradas	46
7.9 El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser636/639 y de p70S6K	49
7.10 El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser302	50
7.11 El CRF inhibe la fosforilación de la proteína Shc inducida por IGF-1	52
7.11 El CRF inhibe la fosforilación del IGF-1R	53

- **Conclusiones**

Figuras

Modelo General Propuesto	60
--------------------------------	----

ABREVIATURAS

AC	Adenil Ciclasa
ACTH	Hormona Adenocorticotropa (del inglés <i>Adenocorticotropic Hormone</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
BIM	Bisindolilmaleilimida
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CH	Dominio de Homología a Colágena (del inglés <i>Colagen Homology Domain</i>)
CRF	Factor Liberador de Corticotropinas (del inglés <i>Corticotropin Releasing Factor</i>)
CRF ₁ y CRF ₂	Receptor tipo 1 para CRF y Receptor tipo 2 para CRF
CREB	Proteína de Unión al Elemento de Respuesta al AMPcíclico
C-terminal	Extremo Carboxilo Terminal
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>)
ERK	Cinasas Reguladoras de Señales Extracelulares (del inglés <i>Extracellular-signal-regulated kinases 1 y 2</i>)
GAP	Proteína Activadora de GTPasas (del inglés <i>GTPase Activating Protein</i>)
GEF	Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina (del inglés <i>Guanine Exchange Factor</i>)
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G (del inglés <i>G-Protein Coupled Receptor</i>)
Grb2	Proteína 2 de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento (del inglés <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GRK	Cinasa de los Receptores Acoplados Proteínas G (del inglés <i>G-Protein-coupled Receptor Kinase</i>)
HPA	Eje Hipotalámico-Pituitaria-Suprarrenales (del inglés <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis</i>)
IGF-1	Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 (del inglés <i>Insulin Like Growth Factor-1</i>)

IP3	1,4,5-inositol trisfosfato
IRS-1	Sustarto del Receptor de Insulina-1 (del inglés <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>)
JNK	Cinasa de la proteína c-Jun (del inglés <i>c-Jun Kinase</i>)
MAPK	Cinasa de Proteínas Activadas por Mitógenos (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MEK	Cinasa de la proteína MAPK (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>)
MEKK	Cinasa de la proteína MEK (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>)
mTOR	Cinasa Blanco de la Rapamicina en Mamíferos (del inglés <i>Mammalian target of rapamycin</i>)
N-terminal	Extremo Amino Terminal
PDK	Cinasa Dependiente de Fosfoinosítidos (del inglés <i>Phosphoinositide-dependent Kinase</i>)
PH	Dominio de Homología a Pleckstrina (del inglés <i>Pleckstrin HomologyDomain</i>)
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa
PKA	Proteína cinasa A (del inglés <i>Protein Kinase A</i>)
PKC	Proteína cinasa C (del inglés <i>Protein Kinase C</i>)
PLC	Fosfolipasa C (del inglés <i>Phospholipase C</i>)
PTB	Dominio de unión a fosfotirosinas (<i>Phosphotyrosine Binding Domain</i>)
Pyk2	Cinasa de tirosinas rica en prolinas 2 (del inglés <i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>)
P70S6K	Cinasa de la Proteína Ribosomal S6 de 70KDa
RTKs	Receptores con actividad de cinasa de tirosina (del inglés <i>Tirosin Kinases Receptors</i>)
Shc	Proteína con homología a Src y parecida al Colágeno (del inglés <i>Src Homologous and Collagen-Like Protein</i>)
SH2	Dominio con homología a Src 2 (del inglés <i>Src Homology 2 domain</i>)
SH3	Dominio con homología a Src 3 (del inglés <i>Src Homology 3 domain</i>)

SVG	Sauvagine
URO	Urotensina I
UCN I-III	Urocortina tipo 1-3

Palabras clave: *estrés, CRF, IGF-1, ERK1/2, IRS-1, Shc, Receptor para IGF-1, Receptor tipo 1 para CRF, mTOR.*

I. RESUMEN

El Factor Liberador de Corticotropinas (CRF) participa en la regulación de la respuesta al estrés, en procesos patológicos como la depresión y la anorexia, y en los mecanismos de aprendizaje y memoria. Dichos efectos son mediados a través de su receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G o GPCR, cuya activación estimula la vía de MAPK. Por otro lado, el Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 (IGF-1) se encuentra relacionado con mecanismos de metabolismo de la glucosa, aprendizaje y memoria y promoción de la sobrevivencia celular e inhibición de la apoptosis en el Sistema Nervioso Central. Además, al igual que el CRF, está involucrado en enfermedades como la anorexia. Las acciones del IGF-1 al interior de la célula son mediadas a través de su receptor con actividad de cinasa de tirosinas (RTK), que activa las rutas de PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2. Existen evidencias que sugieren el posible efecto del CRF sobre las acciones del IGF-1, sin embargo no existen trabajos que lo hagan a nivel molecular. En el presente trabajo se pretende determinar los posibles efectos inhibitorios que tiene el CRF sobre las acciones del IGF-1, tratar de establecer a qué nivel se están llevando a cabo y cuáles son las proteínas que participan. Para ello, se utilizaron células CHO-K1 transfectadas con el receptor CRF₁ donde se encontró que: en este modelo celular el CRF activa la vía de las MAPK mediante la participación de las proteínas Src, PI3K y PKA. Además de que inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida IGF-1. Se observó también, que la fosforilación en residuos de serina de IRS-1 no parece ser el mecanismo principal por el cual CRF esté llevando a cabo sus efectos, ya que no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser^{636/639} y la Ser³⁰², ni la fosforilación de la cinasa p70S6K que fosforila a IRS-1 en dichos residuos para apagar la vía de señalización del IGF-1. Al parecer los efectos del CRF se llevan a cabo a través de la inhibición de la fosforilación del receptor de IGF-1 y por consiguiente de la fosforilación de la proteína adaptadora Shc. Al parecer en esta inhibición mediada por CRF, la proteína mTOR tiene algún papel.

II. INTRODUCCIÓN

La vida existe a través del mantenimiento de un equilibrio dinámico y complejo, llamado homeostático, el cual está en constante cambio debido a la influencia de fuerzas intrínsecas o extrínsecas, reales o percibidas, denominadas estresores (Charmandari et al., 2005).

El cuerpo humano y la mente reaccionan al estrés activando una serie de respuestas fisiológicas y conductuales adaptativas del sistema nervioso central (SNC), las cuales pueden afectar el desarrollo de la personalidad y el comportamiento si son inadecuadas, excesivas o prolongadas, además de tener consecuencias adversas en funciones fisiológicas como el crecimiento, el metabolismo, la circulación, la reproducción y las respuestas inmunes (Charmandari et al., 2005).

Muchas hormonas centrales influyen la regulación de la homeostasis y son de vital importancia en la habituación, termogénesis, y metabolismo. Uno de estos factores es el factor liberador de corticotropina o CRF, el cual moviliza rápidamente al organismo para responder ante estresores y para estimular al sistema nervioso central para responder ante cambios del ambiente (Hillhouse and Grammatopoulos, 2006).

2.1 El Factor Liberador de Corticotropinas (CRF) y sus acciones

Para el año de 1950, ya era bien conocido que el hipotálamo contenía un factor que era capaz de activar al eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA); sin embargo, no fue hasta 1981 que este factor, nombrado factor liberador de corticotropina o CRF, por sus siglas en inglés, fue aislado del hipotálamo de ovino. El CRF es un péptido sintetizado a partir de un precursor de 91 aminoácidos denominado pre-pro-CRF que es procesado en un péptido de 41 aminoácidos (Vale et al., 1981; Rivier et al., 1982).

Después de la exposición a un estímulo estresante, el CRF es secretado y transportado vía axonal del hipotálamo hacia la eminencia media, en donde es liberado a la circulación portal. Subsecuentemente induce la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de la glándula pituitaria. La ACTH es transportada vía la circulación sistémica a la corteza suprarrenal, en donde estimula la liberación de glucocorticoides como el cortisol en humanos (Figura1) (Bruijnzeel et al., 2005).

Los glucocorticoides son los efectores finales del eje HPA y al mismo tiempo juegan un papel importante en la regulación de la actividad basal del mismo eje, así como en la terminación de la respuesta al estrés actuando en centros extrahipotalámicos, el hipotálamo y la pituitaria. La regulación negativa que llevan a cabo los glucocorticoides

sobre la secreción de CRF y la ACTH sirve como límite para la duración de la exposición de diferentes tejidos del organismo a ellos mismos, minimizando los efectos catabólicos, lipogénicos, antirreproductivos e inmunosupresores de estas hormonas (Figura 1) (Charmandari et al., 2005).

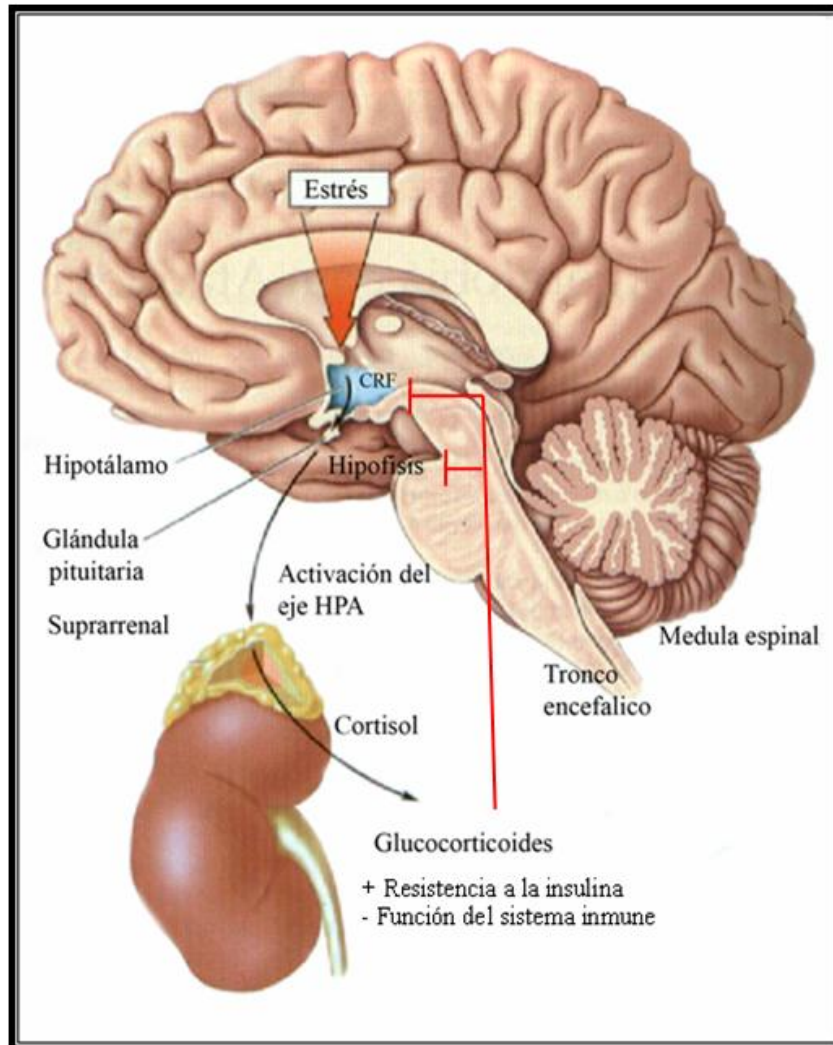


Figura 1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). El CRF es secretado en el hipotálamo por las neuronas del núcleo paraventricular y posteriormente es transportado vía circulación portal hacia la glándula pituitaria donde se estimula la secreción de la adrenocorticotropina (ACTH) la cual entra a circulación periférica y estimula la secreción de glucocorticoides en la corteza adrenal, generando de esta forma, retroalimentación negativa sobre la pituitaria anterior, el hipotálamo y el hipocampo (líneas rojas) (imagen modificada de Arborelius et al., 1999).

El CRF no sólo controla el eje HPA, sino que también integra algunas de las respuestas autonómicas y del comportamiento a través del CNS, cuando sucede un evento de estrés. Sin embargo, estudios histoquímicos han demostrado que el CRF no

sólo se sintetiza en el núcleo paraventricular hipotalámico, sino también en sitios extrahipotalámicos del cerebro. Esta distribución anatómica del CRF, sugiere el papel de este neuropéptido en respuestas a estresores, en el control autonómico, en la toma de alimento, y en los procesos de aprendizaje (Bruijnzeel et al., 2005).

2.2 El CRF y sus análogos (UcnI, UcnII y UcnIII)

El CRF pertenece a una familia de péptidos entre los cuales se encuentran las urocortinas I, II y III (UcnI, UcnII y UcnIII, respectivamente) en mamíferos (Figura 2), la sauvagina (SVG) en anfibios y, la urotenisina en peces. Estos péptidos poseen una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 40 aminoácidos (Dautzenberg and Hauger, 2002; Hauger et al., 2006). La UcnI parece participar en respuestas del comportamiento y neuroendócrinas ante estresores, y posiblemente en la regulación de la toma de alimento. Este péptido se encuentra en el tracto intestinal, glándulas suprarrenales, corazón y testículos (Bruijnzeel et al., 2005); mientras que la UcnII puede detectarse en corazón, glándula suprarrenal, placenta, piel, ovario, tracto gastrointestinal, útero, músculo esquelético, estómago y en células sanguíneas, además de regiones específicas del cerebro (Spina et al., 1996). Por otra parte, la UcnIII ha sido detectada en hipotálamo, septo lateral, tracto gastrointestinal, glándulas adrenales y piel (Bruijnzeel et al., 2005). Hallazgos en células de mamífero muestran los efectos citoprotectores y proliferativos del CRF y sus análogos (Boorse et al., 2006).

Las respuestas neuroendócrinas, autonómicas y conductuales que llevan a cabo estos péptidos ante el estrés, se dan mediante su interacción con dos receptores de membrana: CRF₁ y CRF₂ (Figura 2) (Dautzenberg and Hauger, 2002; Hauger et al., 2006).

2.3 Los receptores (CRF₁ y CRF₂) para el CRF y sus análogos

Las acciones biológicas del CRF y sus análogos son mediadas por receptores de membrana plasmática pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G clase B. En mamíferos se han caracterizado dos tipos de receptores: el receptor CRF₁ y el CRF₂, que presentan diferencias en su secuencia (porcentaje de identidad), su distribución tisular, su especificidad farmacológica y las respuestas que regulan (Chalmers et al., 1995; Lovenberg et al., 1995; Steckler and Holsboer, 1999; Keck, 2006) .

El receptor CRF₁ se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, principalmente en la pituitaria anterior, la neocorteza y el cerebelo (Charmandari et al.,

2005); mientras que en tejidos periféricos de humanos, el receptor CRF₁ se expresa en testículos, ovarios, endometrio, miometrio, placenta, sistema suprarrenal, tejido adiposo, piel, bazo, corazón y en células del sistema inmune (Charmandari et al., 2005). Por su parte, el receptor CRF₂ es expresado en cerebro mayoritariamente en el núcleo del septo lateral, núcleo ventromedial del hipotálamo, bulbo olfatorio y núcleo mesencefálico y, en tejidos periféricos se encuentra en piel, músculo esquelético, liso y cardíaco (Hillhouse and Grammatopoulos., 2006).

Ambos receptores son entonces, mediadores cruciales de las respuestas fisiológicas y del comportamiento ante el estrés y poseen influencias opuestas en los mecanismos de procesamiento de información que regulan las respuestas a estresores (Risbrough et al., 2003). Se ha encontrado que el receptor CRF₁ se encarga de regular los efectos del CRF sobre el eje HPA y las conductas relacionadas a la ansiedad (Liebsch et al., 1995; Skutella et al., 1998; Liebsch et al., 1999), mientras que el receptor CRF₂ se encuentra principalmente asociado con la regulación de conductas relacionadas a la alimentación y al igual que el receptor CRF₁, a la ansiedad; además se ha observado que regula la función cardiovascular y al eje HPA (Spina et al., 1996; Coste et al., 2000; Keck, 2006).

Estudios recientes han demostrado que el CRF y sus análogos presentan distintas afinidades por los receptores CRF₁ y CRF₂: UcnI>CRF para el receptor CRF₁, y UcnI>UcnII>UcnIII>>CRF para el receptor CRF₂ (Lovenberg et al., 1995; Donaldson et al., 1996; Grigoriadis et al., 1996). Estos estudios sugieren que el CRF y UcnI son los ligandos naturales para el receptor CRF₁, mientras que UcnI, UcnII y UcnIII lo son para el receptor CRF₂ (Figura 2).

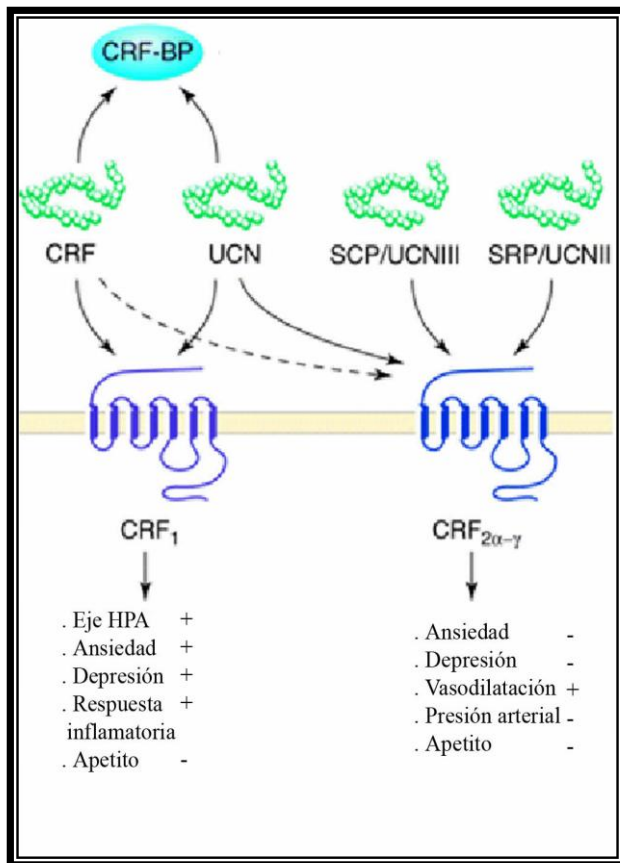


Figura 2. Los receptores CRF₁ y CRF₂, y sus ligandos. El CRF puede unirse tanto al receptor CRF₁ como al receptor CRF₂, sin embargo, tiene una mayor afinidad por el receptor CRF₁. Por su parte, la UcnI tiene igual afinidad por ambos receptores, mientras que la UcnII y la UcnIII son selectivas para el receptor CRF₂. La activación de ambos receptores por sus ligandos estimula repuestas fisiológicas como la ansiedad, la depresión, el apetito; las cuales son reguladas de manera diferencial por ambos receptores (imagen modificada de (Grammatopoulos and Chrousos, 2002)).

Los receptores CRF₁ y CRF₂ pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G o GPCRs (Figura 3). La característica estructural común para todos ellos es la presencia de siete hélices α que atraviesan la membrana y que están conectadas por tres asas intracelulares y tres extracelulares. Esta composición permite que el dominio N-terminal quede orientado hacia la región extracelular y el C-terminal hacia la intracelular (Ulloa-Aguirre et al., 1999).

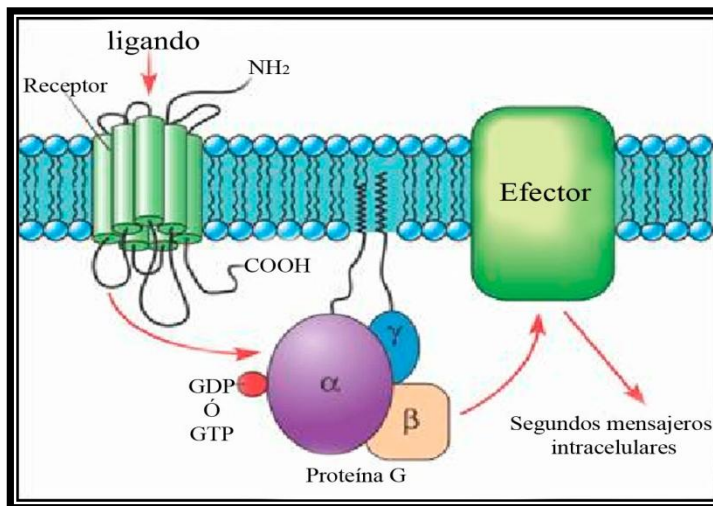


Figura 3. Esquema general de los Receptores Acoplados a Proteínas G. Receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G. La unión del ligando a dicho receptor produce la activación del sistema efector y la posterior generación de mensajeros intracelulares (imagen modificada de www.jenabioscience.com).

Los GPCRs se han clasificado según diferentes criterios; uno de estos los clasifica en tres familias en base a la homología en su secuencia de aminoácidos (Kolakowski, Jr., 1994). De esta manera, la primera familia (familia A), la más numerosa, incluye a los receptores relacionados con la rodopsina y los receptores β adrenérgicos. La homología global de los receptores de la familia A es baja y restringida a un número de residuos altamente conservados. En esta familia, el ligando es normalmente reconocido en un espacio formado por los dominios transmembranales, aunque para algunas subfamilias, activadas por péptidos pequeños, el reconocimiento se produce a nivel de las asas extracelulares y del dominio N- terminal (Fraser et al., 1988).

La segunda familia (familia B), contiene a los receptores relacionados con el receptor de glucagón e incluye a un número aproximado de 20 receptores diferentes para hormonas peptídicas y neuropépticas tales como la calcitonina, el glucagón y el CRF. Estos péptidos son reconocidos por el dominio N-terminal relativamente largo que presentan los receptores de esta familia.

La tercera familia (familia C), incluye a los receptores relacionados con los receptores metabotrópicos de glutamato, así como a los receptores sensibles a calcio y los receptores de GABA. Esta familia se caracteriza por sus dominios C-terminal y N-terminal que son excepcionalmente largos. En esta familia el dominio N- terminal es el que está involucrado en la unión del ligando.

Después de ser activados por su ligando, los GPCRs interaccionan con las proteínas G o proteínas heterotriméricas recambiadoras de nucleótidos de guanina. En su estado inactivo, la subunidad α de las proteínas G tiene unido GDP (α -GDP), sin embargo, cuando el ligando se une al receptor lo estabiliza para llevarlo a una

conformación activa, lo cual permite el contacto entre los dominios intracelulares del receptor y la subunidad α -GDP de la proteína G heterotrimérica. Esta interacción cataliza el recambio de GDP por GTP en la subunidad α y permite la disociación de la subunidad α -GTP del heterodímero $\beta\gamma$. Una vez disociados ambos, la subunidad α -GTP y el dímero $\beta\gamma$ regulan la actividad o la inhibición de efectores enzimáticos como la adenilato ciclasa (AC), la fosfolipasa C (PLC), así como la regulación de la actividad de canales de calcio y de potasio.

La similitud de las subunidades α , permite clasificar a las proteínas G en cuatro categorías: Gs, Gi, Gq y G_{12/13}. La estimulación de la subfamilia Gs activa a la enzima AC, mientras que la estimulación de la subfamilia Gi lleva a la inhibición. La estimulación de la subfamilia Gq activa a la enzima PLC y la subfamilia G_{12/13} está implicada en la regulación de proteínas G pequeñas.

Los GPCRs, dependiendo de su especificidad, pueden activar sólo un tipo de proteína G para llevar a cabo una transducción de señal específica, o bien pueden acoplarse a varias clases de proteínas G para generar múltiples cascadas de señalización. Además, los GPCRs pueden asociarse entre ellos para formar homodímeros o heterodímeros que inducen una compleja variedad de eventos de señalización (Minneman, 2007).

Tanto el receptor CRF₁ como el CRF₂ se pueden unir a la proteína Gs en la mayoría de las células, lo cual lleva a la activación de la AC y el incremento de cAMP. Sin embargo, en algunos tipos celulares los receptores pueden unirse a la proteína Gq (Dautzenberg et al., 2004; Hauger et al., 2006; Hillhouse and Grammatopoulos, 2006). Los sitios involucrados en la interacción con las proteínas G se localizan principalmente en la tercera asa intracelular del receptor y está 100% conservado en los dos tipos de receptores para el CRF.

2.4 La estructura del receptor CRF₁

Este receptor, al pertenecer a la clase B de los GPCRs posee un extremo N-terminal largo que permite el reconocimiento y la unión del ligando con alta afinidad. Sin embargo, esta interacción no parece ser suficiente para estimular el acoplamiento del receptor a las proteínas G, por lo que debe darse una interacción adicional entre el dominio yuxtamembranal de los receptores y los primeros residuos del CRF que se encuentran en el extremo N-terminal, para inducir la activación de la señal intracelular (Figura 4).

El receptor CRF₁ tiene una secuencia de 415 aminoácidos y se han identificado cuatro sitios de N-glucosilación en el extremo amino Terminal; los cuales al parecer son altamente glucosilados (Figura 4). La N-glucosilación del receptor parece ser importante para su expresión, su localización en la membrana plasmática y para la unión del ligando (Hillhouse and Grammatopoulos, 2006). Además, el receptor se caracteriza por poseer sitios de fosforilación para PKC, los cuales se localizan en la primera y segunda asa intracelular. Tanto la tercera asa intracelular como la cola carboxílica poseen un gran número de sitios posibles de fosforilación, los cuales al parecer están involucrados en la regulación del receptor (Figura 4). Estos sitios se encuentran altamente conservados en los dos tipos de receptores (CRF₁ y CRF₂), lo que sugiere que los mecanismos que regulan la actividad de estos receptores son muy parecidas y se han conservado a través del proceso evolutivo (Hauger et al., 2006).

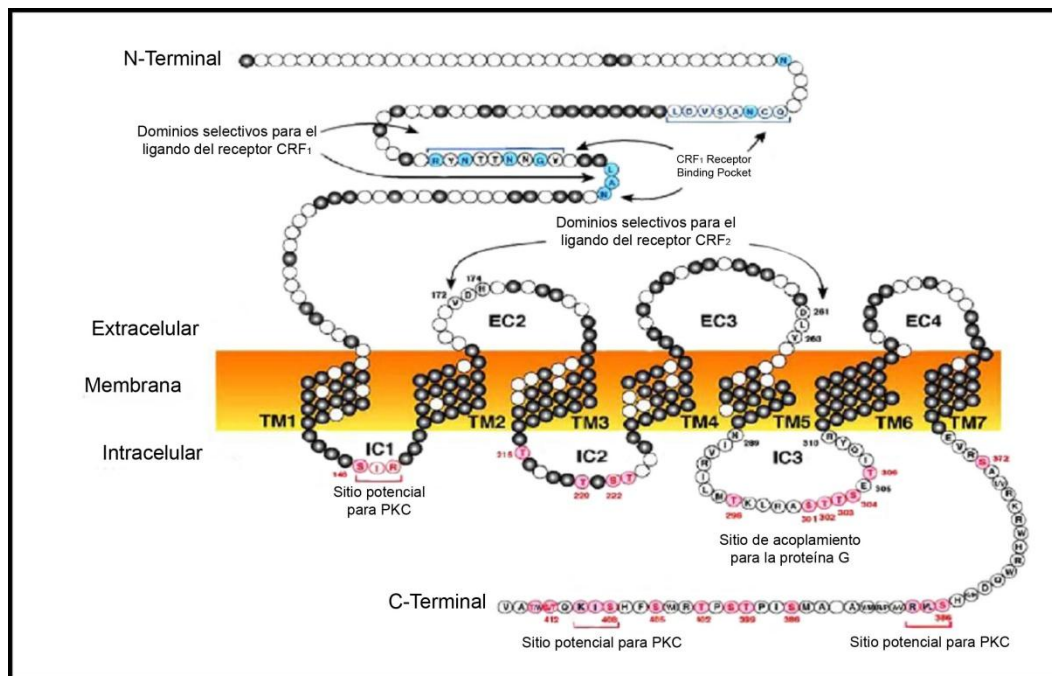


Figura 4. Secuencia del CRF₁R y CRF₂R en humanos. Secuencia del receptor indicando la importancia de aminoácidos extracelulares comprendiendo el dominio del ligando selectivo para los receptores de CRF. Serinas y treoninas (círculos rojos) localizados en las asas intracelulares del CRFR y en el carboxilo terminal son sitios potenciales para fosforilación por GRK e isoformas de PKC (imagen modificada de (Hauger et al., 2006)).

2.5 Las rutas de señalización del receptor CRF₁

En cuanto a la señalización que lleva a cabo el receptor CRF₁, la activación del receptor por su ligando CRF, resulta en un recambio GDP/GTP en la subunidad α de la proteína G, la cual participa en la activación de diferentes rutas de señalización. La subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G puede, por sí misma, activar a una variedad de efectores.

Se ha observado que el CRF y la Ucn1 a través de su receptor CRF₁ pueden activar la ruta de la AC/PKA (Figura 5), ya que la unión de estos ligandos promueven el cambio de conformación del receptor de un estado inactivo a uno activo, incrementando su afinidad por la proteína G_s. El acoplamiento de la subunidad α de la proteína G_s a la tercera asa intracelular, estimula la actividad de la AC, la cual promueve la generación del segundo mensajero AMPc y la posterior activación de PKA, lo cual lleva a la fosforilación y activación del factor transcripcional CREB (Chen et al., 1993; Dautzenberg et al., 2002; Hauger et al., 2006).

Por otro lado, el receptor CRF₁ en diversos tipos celulares puede activar la vía de la fosfolipasa C/PKC (Figura 5), posiblemente a través del acoplamiento a la proteína G_q, ya que se ha observado que el CRF induce la formación de inositol trifosfato (IP3), la movilización intracelular de calcio y la translocación rápida a la membrana celular y su posterior activación de la PKC (Grammatopoulos and Chrousos, 2002; Hauger et al., 2003; Dautzenberg et al., 2004; Hauger et al., 2006).

Recientemente se ha observado que en algunos sistemas celulares el CRF induce la acumulación simultánea de AMPc y de IP3, lo que sugiere la existencia de un acoplamiento de las proteínas G_s y G_q al receptor activo. Sin embargo, aún no se conocen del todo los mecanismos por los cuales el receptor CRF₁ puede activar a ambas proteínas G (Grammatopoulos et al., 2000; Dautzenberg et al., 2004; Hauger et al., 2006).

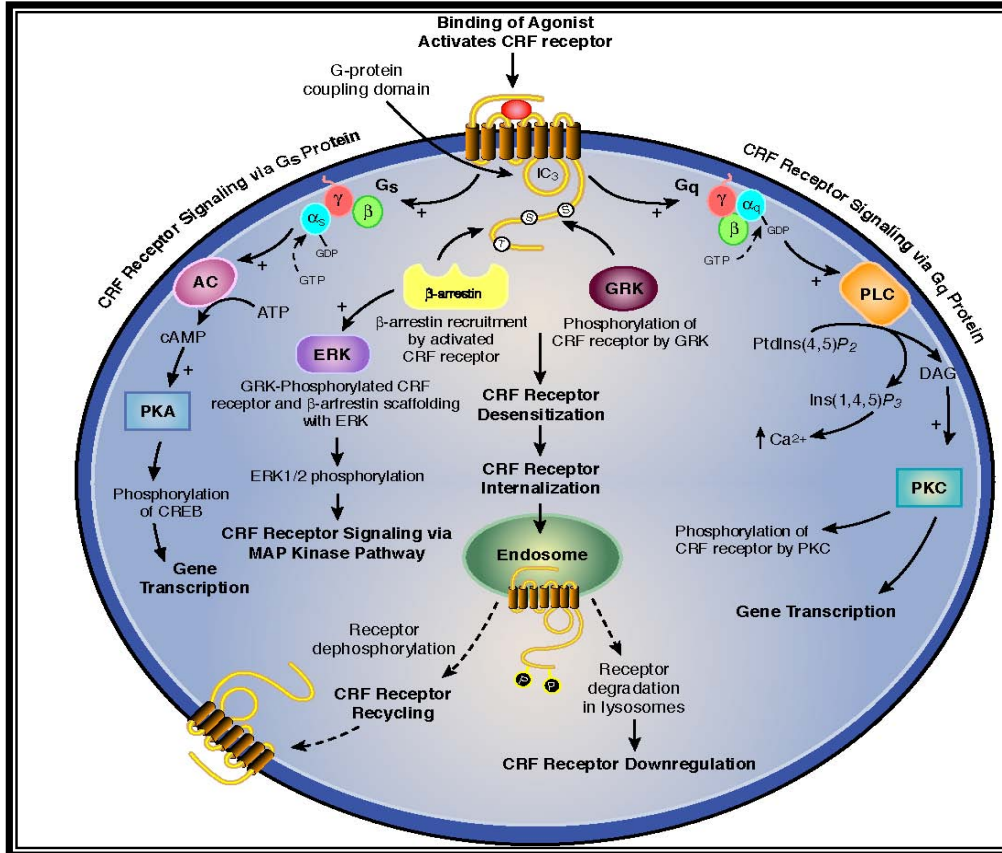


Figura 5. Rutas de señalización activadas por de los receptores CRF₁ y CRF₂. La activación de los receptores CRF₁ y CRF₂ lleva a su asociación con la proteína G_s, que regula la actividad de la adenilato ciclasa (AC), y con la proteína G_q que regula la actividad de la fosfolipasa C (PLC). Estos efectores generan segundos mensajeros, lo cual lleva a la activación de cinasas tales como PKA y PKC, que se encuentran involucradas en la regulación de señales intracelulares como la transcripción genética. Recientemente se ha propuesto que los receptores para CRF pueden ser regulados por fosforilación en la tercera asa intracelular y en su cola carboxílica por acción de PKC y de las GRKs y, por su interacción con las proteínas β-arrestinas (Hauger et al., 2006).

Además de las rutas anteriormente mencionadas, el CRF puede activar la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en particular a las ERKs (cinasas reguladas por señales extracelulares), en diferentes tipos celulares como son las neuronas, células cardíacas, células del miometrio, así como en sistemas celulares de expresión recombinante.

Las ERKs pertenecen a una subfamilia de las MAPK, una familia conservada de cinasas de serina/treonina de proteínas, que están compuestas de cinasas de 42 y 44-kDa (ERK1/2). Estas cinasas se encuentran involucradas en la regulación de programas celulares importantes tales como: proliferación, diferenciación, movimiento celular, y sobrevivencia celular. Además, pueden regular procesos como la plasticidad sináptica

(Sweatt, 2004), y el control de la expresión genética por la activación de factores transcripcionales nucleares (Sweatt, 2004; Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Las rutas de señalización de las MAPK están integradas por tres elementos consecutivos: la cinasa de la cinasa de la MAP cinasas (MAPKKK o MEKK), la cinasa de la MAP cinasa (MAPKK o MEK) y las MAP cinasas (MAPK o ERK) (Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001), los cuales se van activando consecutivamente mediante reacciones de fosforilación (MEKK→ MEK→ ERK) (Figura 6).

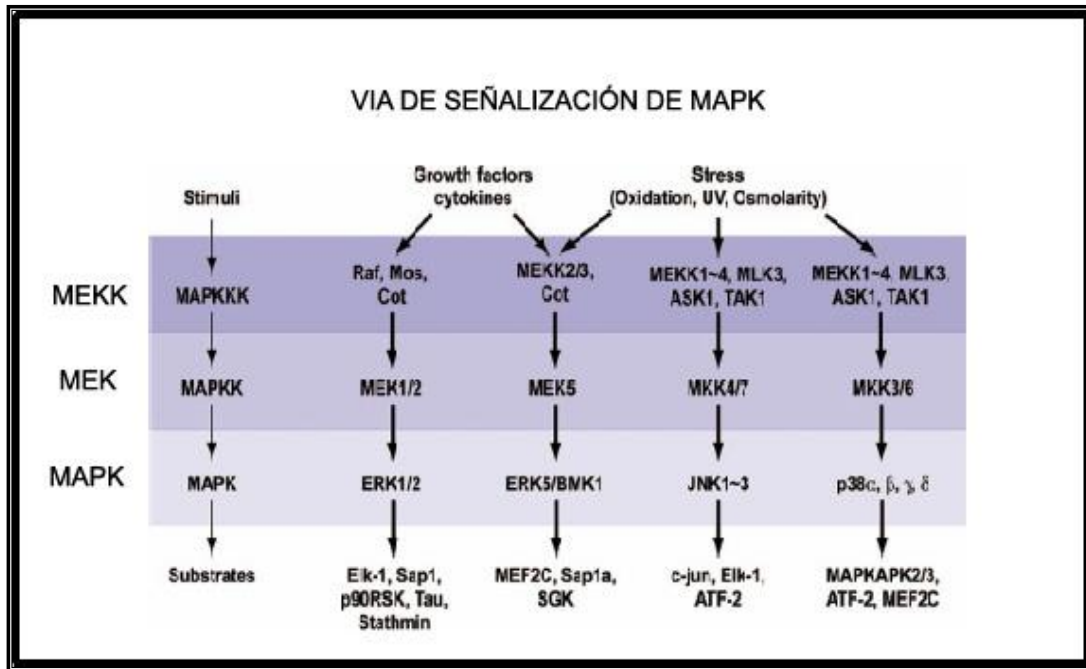


Figura 6. Vías de señalización de MAP cinasas. En vertebrados la familia de MAPK esta compuesta principalmente por cuatro subgrupos: ERK1/2, ERK5, JNK y p38 que son activados por la fosforilación de MAPKKs específicas. Las MAPKKs son activadas en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y factores de estrés. La activación de las MAPKs lleva a la fosforilación de varios factores de transcripción como son Elk-1, Sap 1, c-jun y MEF2c, además de cinasas como p90SRK, MAPKAPK2/3 y SGK, y proteínas del citoesqueleto. Todas estas proteínas son críticas para una respuesta celular apropiada ante estímulos extracelulares (Imajo et al., 2006).

Para activarse, las MEKKs requieren de la activación de componentes intermediarios como son PKC y PKA. Estos intermediarios fosforilan residuos localizados en los sitios catalíticos de las MEKs, los cuales pueden corresponder a dominios de homología a pleckstrina que son secuencias con estructuras típicas que facilitan la interacción proteína-proteína o proteína-lípido, así como también a secuencias ricas en prolina involucradas en la unión a motivos SH3, motivos de dedos de Zinc, cierres de leucina, secuencias de unión a proteínas G o residuos fosforilados Ser/Thr (Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001).

Debido a que las estructuras primarias de las MEKKs no están conservadas entre sí, y a su heterogeneidad estructural y la de sus dominios reguladores, estas cinasas presentan flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos, además de tener la capacidad de activar varias cascadas simultáneamente.

Se ha observado que en células de mamíferos la activación de las MAPKs en el citoplasma inicia su translocación al núcleo, en donde activan a factores de transcripción, o a otros sitios del citoplasma en donde pueden fosforilar enzimas específicas como cinasas de proteínas, fosfatasas, lipasas, o bien, componentes del citoesqueleto (Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001).

En mamíferos se han identificado cuatro subfamilias de cinasas pertenecientes a la familia de las MAPKs (Figura 6); la primer subfamilia es la de las ERKs (ERK1/2), la segunda la de las Jnk (JNK1/2/3), la tercera es la de la proteína p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$), y finalmente la cuarta subfamilia es la de las ERK5. Estas cinasas son activadas de manera específica por diferentes MEKs, ya sea por MEK1/2 para ERK1/2, MKK4/7(JNKK1/2) para JNKs, MKK3/6 para p38 y MEK5 para ERK5 (Pearson et al., 2001). Sin embargo, las MEK pueden ser activadas por más de una MEKK, lo cual incrementa la complejidad y diversidad de la señalización de las MAPKs.

Se ha observado que la Ucn1, pero no el CRF, activan la vía de las MAPKs en células CHO y HEK293 que sobreexpresan a los receptores CRF₁ (Rossant et al., 1999; Grammatopoulos et al., 2000), lo cual parece ser mediado por una vía independiente a la activación de PKA (Rossant et al., 1999). Además, se ha observado que en células CHO-K1 que expresan los receptores CRF₁, las ERK1/2 son parcialmente reguladas a través de PI3K, PLC y Pyk2 (Brar et al., 2004). Se ha descrito también que la activación del receptor CRF₁ induce el crecimiento neuronal de células CATH.a, línea celular catecolaminérgica de origen neuronal, a través de una vía dependiente de PKA y MAPK (Cibelli et al., 2001). De manera similar, la PKA, pero no PKC, inducen la fosforilación de las ERK1/2 en la línea celular tumoral de hipófisis (AtT20) (Kovalovsky et al., 2002; Brar et al., 2004). Por otro lado, la exposición de células de miometrio humano o de células HEK293 que sobreexpresan receptores CRF₁, a la Ucn1 estimula la fosforilación de las MAPK, posiblemente a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC) (Grammatopoulos et al., 2000). La ruta de ERK1/2 puede ser regulada por distintas proteínas G como G_s, G_q, G₁₂ y G _{$\beta\gamma$} .

Como ya se mencionó, las MAPKs se encuentran involucradas en diferentes procesos celulares como son la proliferación, el desarrollo y la regulación del ciclo celular,

ya que se ha observado que la activación de la MEKK de la vía de las ERK1/2 o Raf-1 está involucrada en la respuesta a varias señales mitogénicas, lo que sugiere que el crecimiento celular es regulado por la cascada de MAPK. Además, se ha probado que en células NIH-3T3 cuando Raf-1 se encuentra constitutivamente activa puede acelerar la proliferación celular, lo cual es necesario para la activación de la respuesta temprana o tardía de genes (Miltenberger et al., 1993; Seger and Krebs, 1995). Se ha observado también que las MAPK están implicadas en la diferenciación monocítica, la diferenciación neuronal en células PC12 y maduración de células T. Además, estas cinasas al tener similitud con las cinasas de levadura KSS-1 y FUS-3, pueden estar involucradas en la regulación del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento.

2.6 El Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 (IGF-1) y sus acciones

Los IGFs o factores relacionados con la insulina (IGF-1 y el IGF-2) son péptidos de 7-8 kDa miembros de una superfamilia de hormonas relacionadas con la insulina que incluyen a la insulina y a la relaxina en vertebrados (Rinderknecht and Humbel., 1976; Isaacs et al., 1978). Son promotores del crecimiento y se expresan durante la embriogénesis en ratón. Sin embargo, después del nacimiento, los niveles de IGF-2 caen rápida y sistemáticamente, y sólo sigue expresándose en tejidos de cerebro durante la vida adulta. El IGF-1, por su parte, es producido en el hígado e incrementa su concentración (Siddle et al., 2001). Por otro lado, la insulina es una hormona de 5.8kDa que es sintetizada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas y regula principalmente el metabolismo de la glucosa.

En cuanto a su estructura, los IGFs consisten en los dominios A, B, C y D; y las partes largas de las secuencias dentro de los dominios A y B son homólogas a las cadenas A y B de la proinsulina humana. Esta homología entre las secuencias es del 43% para el IGF-1 y del 41% para el IGF-2 (Zapf and Froesch., 1986; Daughaday and Rotwein., 1989). Los IGFs derivan de pre-propeptidos en una manera similar a la insulina, sin embargo contienen al péptido C, que une a las cadenas A y B, el cual es normalmente cortado en la insulina (Luo et al., 1999). Sin embargo, no existe homología entre los dominios C de los IGFs y la región del péptido C de la proinsulina humana (Zapf and Froesch., 1986; Daughaday and Rotwein., 1987).

Los IGFs participan en el crecimiento celular, mientras que la insulina predominantemente regula la toma de glucosa y el metabolismo celular. Se ha

demostrado que los IGFs son únicos en su habilidad para estimular la sobrevivencia en mioblastos, la proliferación, así como la diferenciación (Stewart and Rotwein 1996). Además, la sobreexpresión de IGF-1 está relacionada con la promoción de la neurogénesis y la sinaptogénesis en el giro dentado hipocampal durante el desarrollo postnatal (O'Kusky et al., 2000), y puede incrementar el número de neuronas y su crecimiento en el núcleo medular de ratón (Dentremont et al., 1999).

Las acciones de los factores de crecimiento relacionados con la insulina difieren de los de la insulina, debido a que su función principal no es el metabolismo celular. Sin embargo, las rutas de señalización de la insulina y del IGF son similares; la diferencia entre estos dos ligandos está en su estructura, sus receptores y la afinidad por estos (Siddle et al., 2001). Sus efectos son mediados, posiblemente, por los dominios citoplásmicos del receptor de insulina (IR) y el receptor para IGF-1 (IGF-1R) (receptores homo- y heterodiméricos), y también por la diferencia cuantitativa en la expresión relativa de ambos receptores en diferentes tipos celulares.

2.7 El Receptor para IGF-1 (IGF-1R)

El IGF-1R pertenece a la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina o RTKs, los cuales desempeñan un papel crucial en el control de procesos celulares básicos como proliferación, migración, metabolismo, diferenciación y supervivencia celular, así como en la regulación de la comunicación intercelular durante el proceso del desarrollo. El IGF-1R se expresa en células neuronales, células gliales, y se encuentran en alta densidad en la corteza cerebral y en el núcleo estriado (Werther et al., 1990; Chung et al., 2002).

Este receptor (Figura 7) está compuesto por dos subunidades extracelulares α (130kDa) que unen al ligando, y dos subunidades catalíticas transmembranales β (95kDa), las cuales están conectadas por puentes disulfuro.

El dominio extracelular del IGF-1R está compuesto por seis dominios estructurales que conforman el sitio de unión al ligando. Dos hélices β (L1 y L2) se encuentran separadas por una región rica en cisteínas (CR), y al parecer el dominio CR interactúa con el IGF-1 (Luo et al., 1999). Tres residuos de tirosina son fosforilados en el loop de activación, lo cual resulta en la promoción de la actividad catalítica (Favelyukis et al., 2001).

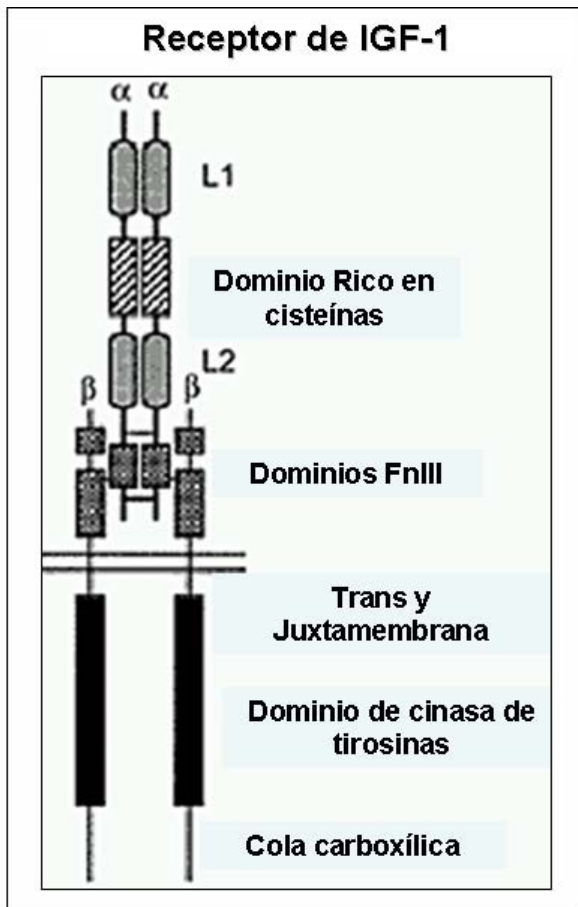


Figura 7. Esquema del receptor para IGF-1. El receptor de IGF-1 es una glucoproteína compuesta por dos tipos de subunidades que conforman un tetrámero. De esta forma, existen dos subunidades extracelulares α y dos subunidades transmembranales β que son sintetizadas como cadenas peptídicas sencillas. La subunidad β es una proteína transmembranal con una sola hélice α y con el extremo amino terminal en la región extracelular y la porción carboxílica en la región intracelular. Las subunidades α son proteínas extracelulares que están unidas entre ellas y a las subunidades β a través de puentes disulfuro. El dominio de unión del IGF-1 se encuentra en la región rica en cisteínas de la subunidad α (imagen modificada de (Zhang B.B et al., 2002)).

Al unirse el ligando al receptor provoca la transfosforilación del dominio citoplásmico; la fosforilación puede producirse no solo en aquellas tirosinas situadas en el dominio cinasa del receptor. Ciertas tirosinas situadas dentro de la porción intracelular del receptor, pero fuera del dominio cinasa, también pueden ser fosforiladas contribuyendo a la generación de sitios de unión de alta afinidad para ciertas proteínas. La fosforilación inicial del loop de activación en el residuo Tyr¹¹³⁵ es seguida por la estabilización de esta estructura por la fosforilación de Tyr¹¹³¹ y Tyr¹¹³⁶ (Favelyukis et al., 2001). Una vez fosforilado el receptor, pueden unirse proteínas a una determinada fosfotirosina del receptor, de esta manera, la proteína puede ser a su vez fosforilada en una de sus tirosinas por el dominio cinasa del receptor y por tanto ser activada.

2.8 Las rutas de señalización del IGF-1

Las proteínas participantes en las cascadas de señalización del IGF-1 y de la insulina comparten ciertos dominios de unión a fosfotirosinas que son muy conservados.

Entre estos dominios se encuentran los dominios SH2 (dominio de homología con Src 2) y PTB (dominio de unión a fosfotirosinas). Otros dominios son los SH3 (dominio de homología con Src 3), los cuales permiten la interacción con dominios ricos en prolinas presentes en otras proteínas. De esta forma, la señalización depende de la fosforilación de sustratos o proteínas intracelulares, que pueden activar a la vía de señalización dependiente de la familia de proteínas Ras (Figura 8), cuya principal función es mediar la proliferación y/o la diferenciación celular. Las proteínas Ras pertenecen a una superfamilia de GTPasas monoméricas, familia a la que también pertenecen las proteínas Rho y Rab, implicadas en las vías de señalización dependientes de receptores que regulan tanto al citoesqueleto como al transporte vesicular, respectivamente. Al igual que la mayoría de las proteínas que unen GTP, Ras funciona como un interruptor bimodal que presenta dos estados conformacionales, uno activo unido a GTP y otro inactivo cuando se une a GDP. Estos dos estados conformacionales están regulados por dos clases de proteínas: las GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina), que participan en la disociación del GDP y posterior captación de GTP del citosol para la activación de Ras, y las GAPs (proteínas activadoras de GTPasa) que incrementan la hidrólisis de GTP asociado a Ras inactivándola. En las vías dependientes de Ras, existe una proteína adaptadora llamada Grb2 (Figura 8), la cual posee un dominio SH2 que le permite unirse a determinadas fosfotirosinas, y un dominio SH3 que le permite la interacción con dominios ricos en prolinas existentes en las GEFs, que en el caso de Ras se denomina Sos (Figura 8).

Una vez activada Ras, puede ser inducida la vía de las MAPKs (figura 8); en este caso, la MAPK es fosforilada en residuos de tirosina/treonina por la MEK, que a su vez es activada mediante fosforilación por Raf (MEKK), la cual es activada por Ras.

Otras moléculas implicadas en la señalización son los sustratos del receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 y -4). Los IRS fosforilados por el receptor de IGF-1 pueden reclutar a la PI3K, resultando en la activación de cinasas dependientes de fosfoinosítidos (PDKs), la proteína cinasa B (Akt/PKB) y la cinasa de la proteína S6 ribosomal de 70kDa (p70S6K) (Figura 8). Entre los sustratos de PKB se encuentran factores de transcripción forkhead (FOXO), la cinasa 3β de la glucógeno sintetasa (GSK3 β), y el blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) (Lawlor and Alessi., 2001). Estas rutas median la expresión genética, la sobrevivencia celular y las señales de crecimiento. mTOR es una cinasa de serina/treonina que es regulada tanto por PKB como por la disponibilidad de nutrientes

como la leucina, y regula la fosforilación de la cinasa p70S6K (Huang and Houghton., 2003).

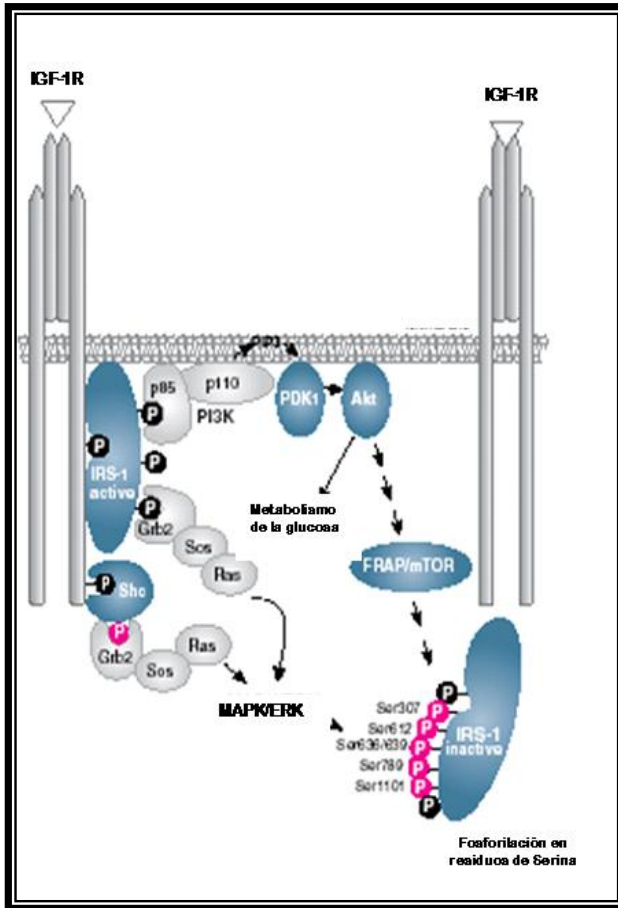


Figura 8. Rutas de señalización activadas por IGF-1. La unión de IGF-1 a su receptor (IGF-1R) provoca su autofosforilación, lo cual lleva a la unión de otras proteínas como IRS-1 que es fosforilada en residuos de tirosina y es capaz de unir a Grb2/Sos. Este complejo une a Ras que activará a la cascada de las MAPK. IRS-1 también puede unir a PI3K que activa a Akt/PKB, el cual es capaz de activar a mTOR que se encarga de fosforilar a IRS-1 en residuos de serina para apagar la señal. Por otro lado, el receptor fosforilado puede unir a la proteína Shc que también es capaz de unir a Grb2/Sos/Ras para finalmente activar a las MAPK. (imagen modificada de www.cellsignal.com).

Se ha observado que el receptor de insulina (IR) es más efectivo que el de IGF-1R para promover la asociación de IRS-1 con PI3K, la estimulación de la incorporación de la glucosa, y la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT 4). En contraste, el IGF-1R es más efectivo en promover la fosforilación de Shc, la asociación de Shc con Grb2 y la activación de la cascada de las MAPK (Urso et al., 1999).

a) El Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-1) y su papel en la vía de señalización del IGF-1

Los IRS (sustratos del receptor de insulina) son proteínas adaptadoras que pertenecen a una familia compuesta por al menos cuatro miembros en mamíferos: IRS-1 e IRS-2, que son las proteínas mejor caracterizadas de la familia y que se encuentran expresadas ampliamente en una gran variedad de tejidos; IRS-3 que se encuentra

específicamente en tejido adiposo y células β pancreáticas, e IRS-4 que se encuentra principalmente en cerebro y timo (Saltiel and Kahn., 2001; White, 2003).

Uno de los principales sustratos tanto para el IGF-1R como para el IR es el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), el cual es una proteína de 185 kDa (Sun et al., 1991; White and Yenush, 1998). IRS-1 pertenece a una familia de moléculas adaptadoras, y es fosforilada en tirosinas en respuesta a la insulina, al IGF-1 y a citocinas, (Sesti et al., 2001; White, 2003). Contiene dominios de homología a pleckstrina (PH) y de unión a fosfotirosinas (PTB) en el extremo amino terminal (Figura 9), los cuales son importantes para su reclutamiento al receptor fosforilado (White and Yenush 1998; Sesti et al., 2001; White, 2003). El dominio PTB se une específicamente a la fosfotirosina 960 de la subunidad β del IGF-1R. IRS-1 también contiene varios sitios potenciales de fosforilación en tirosinas y alrededor de 50 sitios potenciales de fosforilación en serinas/treoninas.

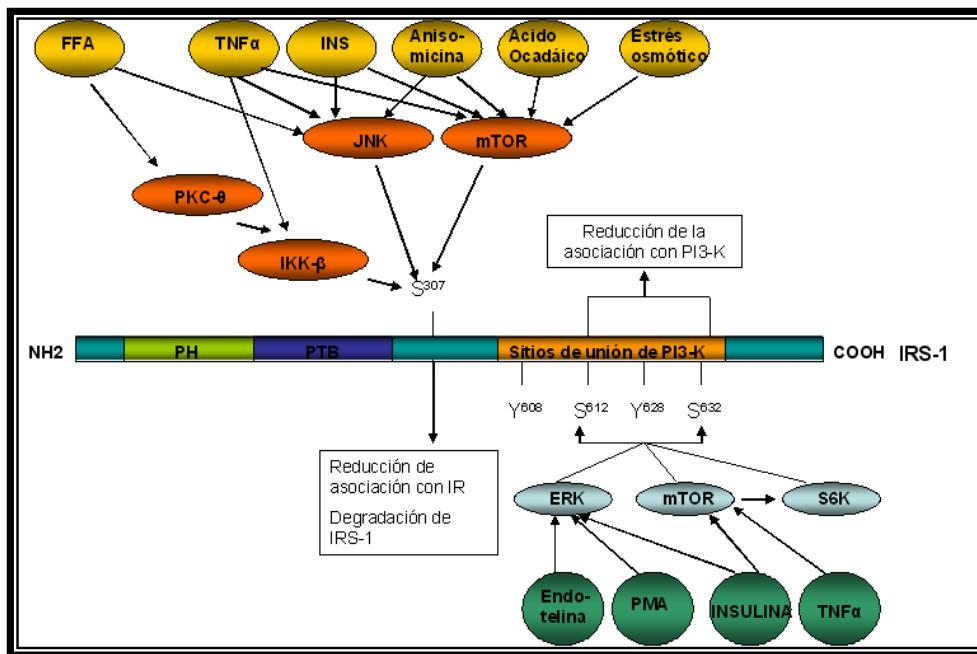


Figura 9. Dominios del IRS-1 y su fosforilación en residuos de serina (Ser³⁰⁷, Ser⁶¹², Ser⁶³²). IRS-1 contiene dominios PH y PTB en el extremo amino terminal, lo cual le permite su acoplamiento al receptor fosforilado. El dominio carboxilo terminal contiene motivos consenso de fosforilación en tirosinas que son directamente fosforilados por el receptor. La fosforilación en las tirosinas Tyr⁶⁰⁸ y Tyr⁶²⁸, genera sitios de unión para PI3K. IRS-1 también contiene sitios potenciales de fosforilación en serina como Ser³⁰⁷, Ser⁶¹² y Ser⁶³² (que equivale a la Ser^{636/639} en humano). La fosforilación en la Ser³⁰⁷ desacopla a IRS-1 del receptor y disminuye su fosforilación en tirosinas, incrementando su degradación. La fosforilación en Ser⁶¹² y Ser⁶³², que se encuentran cerca de los residuos de tirosina responsables de la unión de PI3K, pueden reducir la asociación de PI3K con IRS-1 (imagen modificada de (Gual et al., 2004)).

En respuesta al IGF-1, el IRS-1 es fosforilado en tirosinas, sirviendo entonces como proteína intermediaria que provee múltiples sitios de unión para otras proteínas con dominios SH2 (Sesti et al., 2001; White, 2002). Por su parte, la fosforilación en residuos de serina del IRS-1 puede inducir un cambio en su conformación que genera un decremento en su interacción con el IR o con el IGF-1R (Paz et al., 1997). También se ha sugerido que, una vez fosforilado en residuos de serina, el IRS-1 une moléculas de señalización que impiden su interacción con el receptor o inhiben la actividad de cinasa del mismo (Aguirre et al., 2000) llevando a cabo una asa de retroalimentación negativa. Las cinasas de serina/treonina río debajo de PI3K parecen estar involucradas en esta asa inhibitoria (Zick, 2001).

Se ha demostrado que la estimulación con insulina e IGF-1 incrementa la fosforilación de IRS-1 en la Ser307, Ser612 y Ser636/639 (Gual et al., 2003; Rui et al., 2001) (Tabla 1). La fosforilación en la Ser307 (Figura 9) involucra predominantemente a la ruta de señalización de mTOR en adipocitos, músculo y hepatocitos (Gual et al., 2003; Greene et al., 2003); sin embargo, se ha observado que también JNK puede fosforilar a este residuo (Lee et al., 2003). La activación de JNK puede también promover la activación de mTOR, que a su vez, estimula la fosforilación de la Ser307 (Carlson et al., 2004). En células 3T3-L1 y en células de hepatoma, la inhibición de mTOR previene la degradación de IRS-1 inducida por la insulina (Greene et al., 2003; Lee et al., 2003).

Por su parte, la Ser612 y la Ser636/639 se encuentran localizadas cerca de los residuos de tirosina (Figura 9), que posterior a su fosforilación, generan sitios de unión para PI3K. Varios estudios han sugerido que la fosforilación en dichos residuos puede modular la interacción entre IRS-1 y PI3K, así como su activación (Mothe and Van Obberghen, 1996; Ravichandran et al., 2001). La ruta de señalización de ERK y/o la ruta de mTOR, en respuesta a la insulina, median la fosforilación de estos sitios (Gual et al., 2003).

Sin embargo, se ha observado también que la fosforilación en ciertos residuos de serina puede actuar como protector de la inhibición de la señalización de IRS-1 manteniéndolo activo. Por ejemplo, se ha estudiado que después de la estimulación con insulina, el IRS-1 puede ser fosforilado en residuos de serina dentro del dominio PTB por PKB/Akt (cinasa de serina/treonina) y que dicha fosforilación protege a IRS-1 de la acción de fosfatasa de tirosina y lo mantiene en una forma fosforilada activa (Paz et al., 1999). Uno de los residuos de serina que han sido descritos como protectores de IRS-1 es la Ser³⁰² (Figura 9), que está localizada dentro del dominio PTB que es requerido para la

interacción del IRS-1 con su receptor. Este residuo es fosforilado en respuesta al estímulo de insulina o IGF-1 y su fosforilación es dependiente de la ruta de señalización de mTOR. En ciertas líneas celulares como en células Fao de hematoma, esta fosforilación parece inhibir las funciones de IRS-1 a través de la interrupción de la interacción con su receptor vía JNK1 (Giraud et al., 2004; Werner et al., 2004). La Ser302 también puede ser fosforilada por p70S6K *in vivo*, ya que se ha encontrado que esta fosforilación es inhibida después del uso de siRNA contra esta cinasa (Harrington et al., 2004).

Tabla 1. Fosforilación de IRS-1 en distintas serinas

Residuo de serina fosforilado (Ratón-Humano)	Estímulo	Cinasa	Señal de Insulina
Desconocido	Insulina	PKB	Aumenta
	Insulina	mTOR	Aumenta
302 - 307	Glucosa Aminoácidos Insulina	S6K	Reduce
	Insulina Anisomicina PMA Caliculina A	JNK	Reduce
307 - 312	FFA TNF α Insulina Anisomicina Ácido ocaáico Estrés osmótico [Obesidad]	PKC- θ /IKK- β /JNK mTOR/ IKK- β /JNK mTOR/JNK mTOR/JNK mTOR mTOR S6K	Reduce
318 - 323	Insulina	PKC- ζ	Reduce
612 - 616	Endotelina PMA Insulina FFA	ERK ERK ERK/mTOR PKC/ERK	Reduce
332/635 - 636/639	TNF α Insulina PDGF Estrés osmótico [Obesidad]	mTOR ERK/mTOR/S6K mTOR ? S6K	Reduce
789 - 794	AICAR/Ejercicio? [Obesidad]	AMPK SIK1/2	Aumenta Reduce
1095 - 1101	FFA Insulina TNF- α TPA	PKC- θ	Reduce

(Tabla modificada de (Gual et al., 2004))

b) El papel de la proteína Shc y su papel en la vía de señalización del IGF-1

Una vez que es activado el receptor de IGF-1, además de fosforilar al IRS-1, puede fosforilar también a la proteína Shc (colágena con homología a Src) (Mastick et al., 1994; Sasaoka et al., 1994). Se ha demostrado que esta proteína juega un papel importante en la mitogénesis inducida por IGF-1 (Sasaoka et al., 1994; Sasaoka et al.; 1996) ya que es importante en el proceso de activación de la proteína Ras que desempeña un papel fundamental en la transducción de señales mitogénicas iniciada por los receptores con actividad de cinasa de tirosina, que incluye al de IGF-1 (Skolnik et al., 1993; Mastick et al., 1994; Sasaoka et al., 1994; Sasaoka et al.; 1996).

La proteína Shc está compuesta por tres dominios distintos que incluyen un dominio PTB (de unión a fosfotirosinas) y un dominio CH (de homología a colágena) en la región del amino terminal, y un dominio SH2 en la región carboxilo terminal (Pelicci et al.; 1992).

Se han identificado tres genes para *shc*: *shcA*, *shcB* y *shcC* (Luzi et al., 2000). *ShcA* es ampliamente expresado en tejido humano y de ratón exceptuando a las neuronas maduras, las cuales utilizan *shcC* (Pelicci et al., 1992; Conti et al., 2001), mientras que *ShcB* es principalmente expresado en el cerebro, aunque, su función no ha sido bien caracterizada (Luzi et al., 2000).

ShcA se expresa como tres isoformas con pesos moleculares de 46, 52 y 66 kDa. Estudios previos han demostrado que las isoformas p52shc y p46shc son fosforiladas en las tirosinas 239, 240 y 317 después del estímulo con un factor de crecimiento. Estas fosfotirosinas proveen los sitios de unión para Grb2 (Ishihara et al., 1998; Ravichandran., 2001; Sasaoka et al., 2001; Patrussi et al., 2005). La unión de Grb2 a Shc es requerida para que se lleve a cabo el proceso de crecimiento y proliferación inducido por IGF-1 en diferentes tipos celulares como los preadipocitos 3T3-L1 (Boney et al., 2000), las células CHO (Chow et al., 1998; Sasaoka et al., 2001), y los neuroblastomas (Kim et al., 1998). En células de músculo liso (SMC), la fosforilación en tirosinas de p52shc y la unión de la proteína Grb2 son necesarias para mediar la vía de señalización del IGF-1 (Ling et al., 2005). Tras la asociación con Grb2 se forma un complejo con Sos. La unión de Shc con Grb2 es mediada por el dominio SH2 de Grb2 que se une a los residuos fosforilados en tirosinas dentro del dominio CH de Shc (Sasaoka et al., 1994; Salcini et al., 1996).

Diversos estudios han demostrado que Shc e IRS-1 son sustratos competitivos para interactuar con el receptor de insulina (Sasaoka et al., 1996; Ishihara et al.; 1997).

Además de promover las señales de proliferación y crecimiento características del IGF-1, se ha reportado que p66shc puede regular negativamente la activación de MAPK inducida por EGF, sin embargo, el mecanismo no ha sido elucidado (Okada et al., 1997). Además de la fosforilación en tirosinas, p66shc contiene múltiples sitios de fosforilación en residuos de serina/treonina; dentro de este conjunto se encuentra la serina 36 que se localiza dentro del dominio CH de Shc. Diferentes estudios han demostrado que la fosforilación de la serina 36 de p66shc es responsable de limitar la extensión del periodo de vida del ratón (Migliaccio et al., 1999) y media la regulación de las especies reactivas de oxígeno (Nemoto and Finkel., 2002) así como, la toxicidad de péptido beta-amiloide de la enfermedad de Alzheimer (Smith et al., 2005).

c) El papel de mTOR en la regulación de la vía del IGF-1

mTOR es una proteína cinasa de serina/treonina cuya principal acción es el control de la tasa de procesos anabólicos y catabólicos, y en términos de mecanismos moleculares actúa principalmente para fosforilar a la proteína de unión de eIF-4E (4E-BP) y a p70S6K, las cuales son importantes reguladores de la transcripción genética. Es conocida también por su papel en procesos de proliferación y crecimiento en células no neuronales (Swiech et al., 2007); sin embargo, mTOR tiene un papel importante a nivel del Sistema Nervioso Central, ya que el tamaño del soma neuronal es controlado por esta cinasa (Kwon et al., 2003; Swiech et al., 2007). Además, se ha observado que una de las características de las enfermedades que son acompañadas por un incremento en la actividad de mTOR es la hipertrofia, la cual también afecta al sistema nervioso modificando severamente la morfología de las células (Swiech et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que mTOR está involucrado con el desarrollo neuronal tanto de las dendritas como en la morfogénesis de las espinas dendríticas (Campbell and Holt, 2001; Tavazoie et al., 2005; Swiech et al., 2007).

La actividad de cinasa de mTOR es modulada en respuesta a varios estímulos como los factores tróficos, mitógenos, hormonas, aminoácidos y el estrés celular, incluida la isquemia, choque térmico, daño al DNA e infecciones virales (Kimura et al., 2003; Hay and Sonenberg, 2004; Avruch et al., 2005; O'Shea et al., 2005; Reiling and Sabatini, 2006); esto resulta en el balance entre los procesos anabólicos y catabólicos en la célula.

En mamíferos, mTOR forma dos complejos protéicos heterotriméricos que resultan distintos a nivel funcional: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es sensible a la rapamicina y esta involucrado en una amplia variedad de procesos celulares como la transcripción,

traducción, autofagia, ciclo celular y la dinámica de los microtúbulos (Schmelzle and Hall, 2000; Lukasz et al., 2007). Por otro lado, mTORC2 es insensible a rapamicina y regula la dinámica del citoesqueleto de actina y controla la actividad de dos cinasas: Akt y PKC α (Sarbasov et al., 2004; Sarbasov et al., 2005).

La ruta de señalización canónica para la activación de mTOR comienza con la activación de un receptor con actividad de cinasa de tirosina por mitógenos, factores tróficos u hormonas como el IGF-1 o la insulina. Esto induce la activación de PI3K, de diferentes proteínas adaptadoras y de Ras; y la producción de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3). La consecuencia inmediata de este incremento de PIP3 es el reclutamiento de la cinasa de proteínas dependiente de 3-fosfoinosítidos-1 (PDK1) y Akt a la membrana celular y la subsecuente fosforilación de Akt por PDK1 (Hresko and Mueckler, 2005; Sarbasov et al., 2005). Una vez que Akt es fosforilada y activa, puede fosforilar a mTOR que a su vez fosforila y activa a p70S6K (Dan et al., 2002; Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002; Garami et al., 2003; Inoki et al., 2003; Tee et al., 2003).

Cuando el IGF-1 activa a su receptor se crean sitios para el reclutamiento de IRS1 e IRS2 a la membrana. Residuos específicos que son fosforilados en IRS1 y/o IRS2 sirven como motivos de reconocimiento para la unión de moléculas de señalización como PI3K (Um et al., 2006; Dann et al., 2007); sin embargo, la vía de señalización PI3K-Akt inducida por el IGF-1 y la insulina también puede ser activada por otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Gavi et al., 2006). La estimulación del receptor de IGF-1 activa la vía de PI3K-Akt-mTOR, lo cual causa efectos pleiotrópicos que incluyen la pérdida de la expresión de IRS-1 dependiente de mTOR; la inhibición de mTOR induce la expresión de IRS-1 y elimina la inhibición por retroalimentación negativa de la vía, resultando en la activación de Akt (O'Reilly et al., 2006).

Se sabe que mTOR esta implicada en la fosforilación de IRS-1 en la Ser307, la cual es fosforilada también por JNK. Es posible que JNK actúe de manera independiente o río arriba de mTOR. Una posible explicación para la habilidad de mTOR de mediar las funciones de estas rutas de señalización es su interacción con PKC δ . Esta cinasa puede integrar tanto las señales de factores de crecimiento como señales de estrés. Se ha observado que la anisomicina induce la fosforilación de IRS-1 en Ser312 vía JNK, sin embargo, también puede activar tanto a mTOR como a PKC δ para mediar dicha fosforilación. Es interesante ver que tanto mTOR como p70S6K son activadas por IGF-1 como por estrés (tratamiento con anisomicina). Sin embargo, la fosforilación de la Ser307

inducida por IGF-1, no es eliminada cuando se usa el inhibidor de JNK, SP600125. Esta fosforilación solo es inhibida cuando se usan en conjunto los inhibidores de mTOR y PKC δ (Mingo-Sion et al., 2005). Además de la Ser307, la fosforilación de IRS-1 en las serinas 302 y 636/639, es conocida por antagonizar la señalización de IR y se encuentra aumentada en modelos animales de obesidad y en músculo de pacientes con diabetes tipo 2. (Bouzakri et al., 2003). La fosforilación de estos sitios en ratones deficientes de p70S6K se encuentra fuertemente reducida. (Um et al., 2004) y estudios recientes sugieren que la fosforilación de p70S6K en distintos sitios media la fosforilación de IRS en las serinas 302 y 636/639. (Um et al., 2006)

Recientemente Shah y Hunter (2006) demostraron que existen sitios en IRS1 que son blancos directos de p70S6K y regulan la habilidad de una cinasa desconocida resistente a rapamicina para mediar la fosforilación de sitios de serina/prolina que se sabe están implicados en la resistencia a la insulina.

III. ANTECEDENTES

El papel del CRF en las respuestas al estrés es sustentado por estudios en los cuales se demuestra que los estresores pueden inducir la liberación de CRF en una gran variedad de áreas del cerebro. Además, la exposición crónica al estrés puede inducir adaptaciones en los sistemas de CRF hipotalámicos y extrahipotalámicos, lo cual puede resultar en una alteración del comportamiento y de las respuestas fisiológicas (Bruijnzeel and Gold, 2005).

Se ha observado también que la administración intracerebroventricular del CRF resulta en una serie de respuestas periféricas y del comportamiento, así como la activación del eje HPA y del sistema nervioso simpático, lo cual indica que el CRF posee un papel importante en la coordinación de las respuestas al estrés. La activación crónica de la vía del estrés puede desencadenar desórdenes que son resultado del incremento y/o la secreción prolongada del CRF y/o glucocorticoides. Entre los desórdenes en los cuales se encuentra incrementada la activación del eje HPA están: anorexia nerviosa, malnutrición, desorden compulsivo-obsesivo, pánico, sobreejercitación, alcoholismo crónico, diabetes melitus I y II, y obesidad (Charmandari et al., 2005).

Además, se ha observado que los sistemas extrahipotalámicos de CRF pueden incrementar el riesgo de presentar síntomas de ansiedad y depresión durante periodos de uso de drogas y alcohol. La administración de drogas o alcohol, ha sido asociada con la producción y liberación de CRF en sitios de la región extrahipotalámica, y con respuestas ansiogénicas, además de estar relacionado con la liberación de ACTH y cortisona mediante una vía dependiente del receptor de CRF (Bruijnzeel and Gold, 2005).

Aunado a esto, el CRF a nivel central puede inhibir el apetito y activar la termogénesis vía el sistema catecolaminérgico, mientras que a nivel periférico estimula la función motora del colon (Seres et al., 2004). Se ha propuesto al CRF como uno de los péptidos anorexigénicos más importantes (Charmandari et al., 2005).

Por otro lado, el eje HPA y los niveles consecuentes de glucocorticoides en el plasma se encuentran muy relacionados con el nivel de masa adiposa del cuerpo; además, los glucocorticoides regulan la diferenciación del tejido adiposo, su función y distribución y, en exceso pueden promover la obesidad visceral, la resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión (Seres et al., 2004).

Durante el estrés, la activación prolongada del eje HPA lleva a la supresión de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) y a la inhibición de los efectos del IGF-1; lo mismo se ha observado en desórdenes como la ansiedad y la depresión en donde las

concentraciones de estas hormonas se encuentran significativamente disminuidas (Charmandari et al., 2005).

Otra de las enfermedades en donde ambas hormonas están presentes y en donde los niveles de IGF-1 son bajos, es la anorexia nerviosa, ya que se ha observado que en este desorden fisiológico en donde se presenta leucopenia y anemia; el IGF-1, encargado de la activación, crecimiento y sobrevivencia de las células hematopoyéticas, se encuentra en bajas cantidades (Counts et al., 1992; Polli et al., 2008).

También se ha observado que el CRF podría estar implicado en la enfermedad de Alzheimer. Se ha encontrado que los glucocorticoides se encuentran en niveles elevados en personas de edad avanzada y esto se ha relacionado con la presencia de vulnerabilidad neuronal en el hipocampo (Sapolsky et al., 1985, 1986). Sin embargo, se ha descrito que ante estrés agudo la presencia y fosforilación de la proteína tau, una de las proteínas clave en el desarrollo del Alzheimer, no se ve afectada cuando se quita la glándula suprarrenal a los ratones (Korneyev et al., 1995); lo cual sugiere que tal vez la secreción de glucocorticoides no juega un papel importante, siendo el CRF el que lleva a cabo los efectos. En el 2007, Rissman et al., encontraron que el estrés emocional agudo puede inducir la fosforilación de la proteína tau en el hipocampo de roedores y que puede ser inhibida mediante la interrupción genética o farmacológica de la vía de señalización del receptor CRF₁. Además, la exposición repetida a estrés provoca efectos acumulativos en la proteína tau fosforilada quedando en su forma insoluble que es potencialmente patogénica.

Por su parte, el IGF-1 que tiene un papel muy importante en el crecimiento del cerebro en etapas embrionarias (Russo et al., 2005) y en el adulto, está involucrado en numerosos procesos que mantienen la homeostasis del cerebro así como en la plasticidad sináptica y en la neurotransmisión (Trejo et al., 2004); en la enfermedad de Alzheimer presenta niveles en suero modificados (Tham et al., 1993; Craft et al., 1998). Se ha propuesto también que el IGF-1 es uno de los mayores moduladores de los niveles de la proteína amiloide (otra de las proteínas implicadas en el desarrollo del Alzheimer) y que existe una relación inversa entre los niveles en suero del IGF-1 y de la proteína amiloide. Al parecer el IGF-1 estimula la eliminación de dicha proteína del parénquima del cerebro, además de promover la activación de proteínas como la transtirretina, la albumina y la apolipoproteína que llevan fuera del cerebro a la proteína amiloide (Carro et al., 2002). Además, se ha sugerido que la pérdida de la señalización del IGF-1 en el cerebro, ayuda al desarrollo de la patogénesis de la amiloidosis (Carro et al., 2004).

En el 2002, Calogero et al., describieron que el CRF era capaz de inhibir la liberación del IGF-1 en cultivos primarios de células de la granulosa de rata; dicha inhibición se revertía usando un antagonista del receptor de CRF, lo cual indica que el efecto inhibitorio del CRF es mediado por el receptor.

Por otro lado se ha descrito la síntesis de IGF-1 en la glándula pituitaria para promover el crecimiento de sus células, en donde el CRF actúa para inducir la liberación de la ACTH (Webster and Scanlon, 1991; Renner et al., 1996; Oomizu et al., 1998). Además, se ha detectado el mRNA del receptor de IGF-1 en células de cultivo de pituitaria usando RT-PCR, lo cual indica que las células de pituitaria de ratón expresan al IGF-1R (Goodyer et al., 1984; Rosenfeld et al., 1985; Bach and Bondy, 1992; Unger and Lange, 1997).

En cuanto a las proteínas que regulan estas rutas de señalización, se ha observado por ejemplo, que mTOR está involucrado en varias formas de plasticidad de procesos de aprendizaje y memoria (Tang et al., 2002; Cammalleri et al., 2003; Tischmeyer et al., 2003; Hou and Clan, 2006; Parsons et al., 2006) y se ha descrito que existe un cambio en la actividad de mTOR en tumores cerebrales, esclerosis tuberosa, displasia cortical y desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Chan et al., 2004; Ravikumar et al., 2004; Lafay-Chebassier et al., 2005; Inoki et al., 2005; An et al., 2006; Ljungberg et al., 2006; Malagelada et al., 2006).

Otra de las funciones cerebrales con las que ha sido relacionado es la toma de alimento ya que en el 2006, Cota et al., observaron que tanto mTOR como p70S6K activas fueron expresadas en el hipotálamo y que animales privados de alimento por 48hrs presentaron niveles disminuidos en la actividad de mTOR en esa área del cerebro. Dichos niveles volvieron a la normalidad cuando se suministró alimento a los animales. Mientras las ratas control mostraron un incremento en la toma de alimento sin pérdida de peso corporal, las ratas a las que se les administró L-leucina o leptina presentaron efectos severos proanoréxicos como disminución en la toma de alimento después de la privación de alimento y pérdida de peso. Tanto la leptina como la L-leucina, promovieron la fosforilación de p70S6K inducida por mTOR y la aplicación de rapamicina previno esta inducción. De esta manera se observó que la inhibición de mTOR reduce los efectos proanoréxicos.

Recientemente, Morrison et al. (2007) mostraron que mTOR está también involucrada en el control del comportamiento alimentario en respuesta a los cambios en los niveles de aminoácidos.

IV. HIPÓTESIS

El CRF ha sido implicado en alteraciones asociadas al desarrollo de anorexia nerviosa en donde las acciones del IGF-1 se encuentran notablemente disminuidas. Aunque se ha evidenciado que el CRF a través de su receptor CRF₁ es capaz de disminuir la síntesis y liberación del IGF-1, hasta el momento no se ha demostrado el posible papel del CRF en regular negativamente las acciones del IGF-1 a nivel molecular. De acuerdo a esto, nuestra hipótesis de trabajo plantea que el CRF es capaz de inhibir las acciones del IGF-1 a través de la alteración de las acciones del receptor para IGF-1 y de las proteínas adaptadoras IRS-1 y Shc.

V. OBJETIVOS

General:

Determinar los efectos que tiene el Factor Liberador de Corticotropinas a través del receptor CRF₁ sobre las acciones del Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 en células CHO-K1 y establecer a qué nivel está llevando a cabo la regulación de dicha vía.

Particulares:

1. Determinar el efecto del CRF sobre la activación de la vía de las MAPK inducida por IGF-1
2. Determinar el papel de la fosforilación en las serinas (Ser^{636/639} y Ser³⁰²) del Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-1) como mecanismo utilizado por el CRF para inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por el IGF-1.
3. Determinar el papel de mTOR y p70S6K como proteínas implicadas en la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina, y en la interacción entre ambas vías.
4. Determinar si el CRF es capaz de inhibir la fosforilación de la proteína adaptadora Shc en el residuo Tyr^{239/240} inducida por IGF-1.
5. Determinar si el CRF es capaz de inhibir la fosforilación del IGF-1R inducida por IGF-1.
6. Proponer un modelo general que explique la manera en que el CRF está llevando a cabo sus efectos sobre las acciones del IGF-1.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo Celular

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a las células CHO-K1, provenientes de ovario de hamster chino; las cuales no expresan endógenamente al receptor CRF₁ y expresan grandes cantidades del receptor para IGF-1.

Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) y medio F12K (Kaighn's Modification F12) (1:1 v/v) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 100µg/ml de estreptomicina y 100IU/ml de penicilina (medio completo). Las células fueron mantenidas en una incubadora con atmósfera húmeda a 5% de CO₂ a 37 °C. Todos los reactivos empleados para el cultivo celular fueron obtenidos de la compañía Invitrogen/GIBCO, BRL.

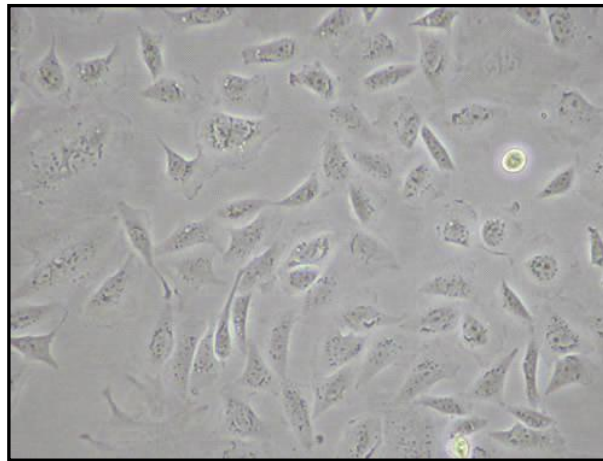


Figura 6.1. Células CHO-K1. Células de ovario de hamster chino.

6.2 Transfección Celular

Las células CHO-K1 fueron transfectadas en cajas de 10 cm a una confluencia de entre 70 y 80 %, con el plásmido pcDNA3.1/CRF₁R que contiene la secuencia del receptor CRF₁ (Dautzenberg et al., 1999). Esto se hizo a través de la técnica de liposomas catiónicos utilizando lipofectamina (Lipofectamine reagent, Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La técnica de liposomas catiónicos se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el DNA, dichos complejos poseen afinidad por la membrana, lo cual permite la entrada del DNA al citosol. Después de 24

horas de la transfección las células fueron resembradas en cajas de 6 pozos y dejadas por 18 horas en medio sin suero, a menos que se especifique lo contrario en los pies de figura.

6.3 Detección de proteínas mediante ensayos de Western Blot

El día del experimento, a las células transfectadas se les retiró el medio completo y se mantuvieron en medio sin suero por 18 horas (a menos que se indique lo contrario en los pies de figura). Transcurrido este tiempo se realizaron estímulos con las siguientes hormonas: CRF o IGF-1, a diferentes tiempos y concentraciones. También se utilizaron inhibidores específicos para diferentes cinasas como: Rapamicina (inhibidor de la cinasa mTOR), BIM (bisindolilmaleilmida I, inhibidor de las isoformas clásicas y nuevas de PKC), H89 (dihydrochloride, inhibidor de PKA), Wortmanina (inhibidor de la cinasa PI3K), PP2 (inhibidor de las cinasas de la familia de Src) y el Inhibidor del IGF-1R II (inhibidor del receptor de IGF-1). Los inhibidores fueron incubados por 20 minutos, a las concentraciones indicadas en los pies de figura, antes de los estímulos con los agonistas.

Después de los estímulos, el medio fue removido y las células fueron lavadas dos veces con un buffer de fosfatos (PBS, NaCl 137mM, KCL 2.1mM, Na₂HPO₄O 10mM, KH₂PO₄O 2mM, pH 7.4) frío y después lisadas con 100 µl de buffer Laemmli 1X (SDS-protein gel loading solution 2X Quality Biological, INC, β-mercaptoetanol y agua). Posteriormente las muestras fueron sonicadas con pulsos de 40 Khz durante 5 seg/muestra (Sonios Vibra cell TM, Ultrasonic Processor), se calentaron a 99°C por 5 minutos (Termomixer Comfort eppendorf) para finalmente ser centrifugadas a 14,500 rpm durante 5 minutos (MiniSpinPLUS eppendorf). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 8 ó 10% y se realizó una electroforesis durante hora y media.

Al finalizar, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF utilizando transferencia semiseca por una hora y media, a un voltaje fijo de 15V o transferencia húmeda por 2 horas a un amperaje constante de 500mA dependiendo de la proteína a determinar. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Una vez incubadas las membranas, se lavaron 3 veces por 10 minutos con buffer TBS-Tween (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween 20 0.1%-0.5%, pH 7.5). Posteriormente fueron incubadas con anticuerpos secundarios, conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP), esto por una hora a temperatura ambiente.

Las membranas fueron visualizadas con ECL (enhanced chemiluminescence reagent, Amersham Biosciences) y cuantificadas con ayuda de un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer/BIORAD).

a) Detección de fosfo-MAPK por Western Blot

Para la detección de las ERK1/2 activas y fosforiladas, se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) a una dilución de 1:4000, junto con el anticuerpo secundario HRP anti-ratón, a una dilución de 1:5000 (Amersham Bioscience).

b) Detección de fosfo-IR/IGF1R por Western Blot

Para la detección del receptor IR o IGF-1 fosforilado, se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-IR/IGF-1R (Tyr1131) (Biosource), a una dilución de 3.3 μ l/5ml y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-conjugado anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (Zymed/Invitrogen).

c) Detección de fosfo-IRS-1 (Ser 636/639) y (Ser 302) por Western Blot

Para la detección del IRS-1 fosforilado en las serinas 636/639 y 302, se utilizaron los anticuerpos primarios fosfo-IRS-1 (Ser302) y fosfo-IRS-1 (Ser636/639) (Cell Signaling Technology/Santa Cruz Biotechnology), a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-conjugado anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (Zymed/Invitrogen).

d) Detección de fosfo-p70S6K por Western Blot

Para la detección de la cinasa p70S6K fosforilada, se utilizó el anticuerpo primario fosfo-p70S6K (Thr421/Ser424) (Santa Cruz Biotechnology), a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-conjugado anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (Zymed/Invitrogen).

e) Detección de fosfo-Shc por Western Blot

Para la detección de la cinasa Shc, se utilizó el anticuerpo primario fosfo-Shc (Tyr239/240) (Santa Cruz biotechnology) a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-conjugado anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (Zymed/Invitrogen).

6.4 Análisis de resultados

Por cada experimento se realizaron al menos tres repeticiones. Para hacer la cuantificación de los Western Blot se utilizó el programa Quantity One 1-D Analysis Software 2000 (BIORAD). Los datos obtenidos son reportados como unidades arbitrarias de la Σ píxeles – Σ del fondo \pm error estándar. Para determinar las diferencias estadísticas se realizaron pruebas de ANOVA y post-hoc de Dunnett, con ayuda del programa de estadística GraphPad Prism 4.0. Se tomó como diferencia significativa a $p \leq 0.05$.

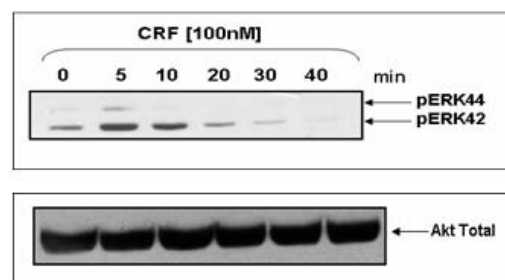
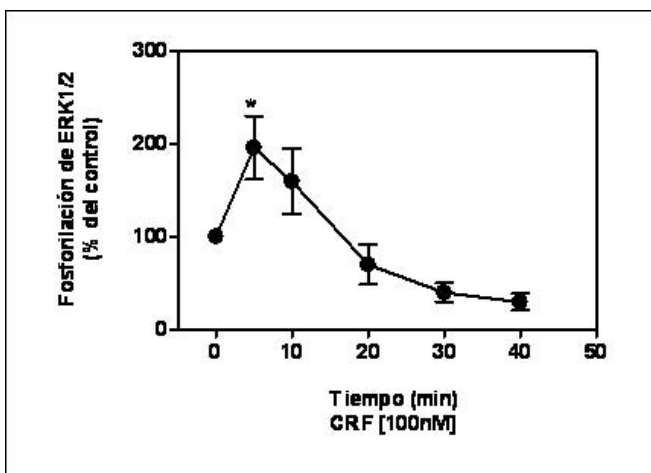
VII. RESULTADOS

7.1. El CRF induce la activación de ERK1/2

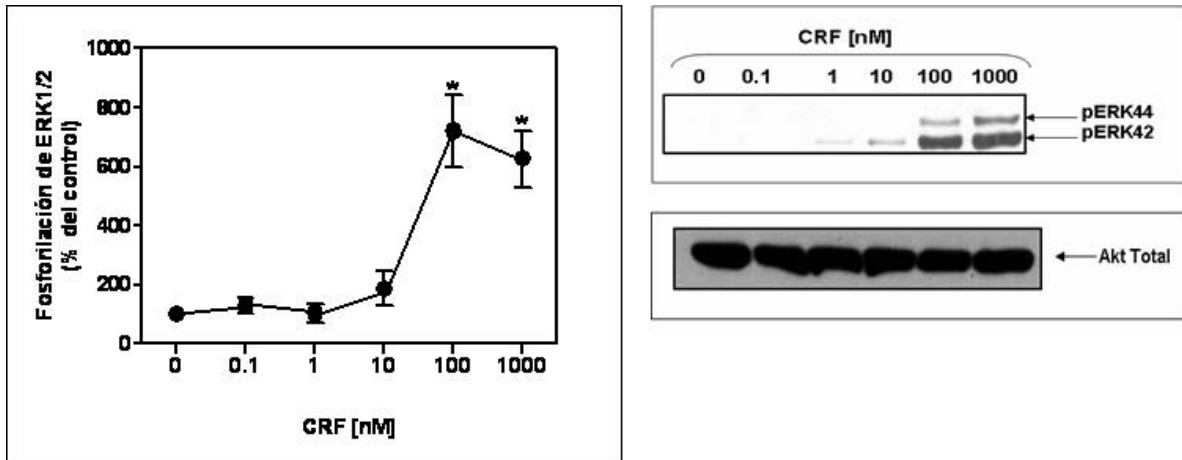
Se ha observado en diferentes modelos celulares que el CRF tiene la capacidad de inducir la activación de las MAPK (Brar et al., 2004; Cibelli et al., 2001; Grammatopoulos et al., 2000; Rossant et al., 1999). Con el fin de caracterizar el efecto de esta hormona sobre dicha activación, células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor CRF₁, fueron estimuladas con CRF 100nM a diferentes tiempos, observándose una máxima activación de ERK1/2 a los 5 min, la cual disminuye a partir de los 10min y llega a niveles por debajo del basal a los 20min (Figura 7.1.A). Este efecto inducido por CRF también es dependiente de la concentración, ya que se observa una activación máxima de ERK1/2 al estimular a las células con CRF 100nM (Figura 7.1.B). Por lo tanto, CRF induce la activación de ERK1/2 de una manera dependiente del tiempo y la concentración del estímulo en la línea celular CHO-K1 que sobreexpresa al receptor CRF₁.

A manera de control y para comprobar que las células CHO-K1 utilizadas no expresaban al receptor CRF₁, las células sin transfectar fueron estimuladas con CRF 100nM por 5 min y se detectó la fosforilación de ERK1/2 (Figura 7.1.C). Se puede observar que la fosforilación de ERK1/2 en células no transfectadas y estimuladas con el CRF, es igual a la fosforilación basal. Lo anterior indica que las células no responden al estímulo con CRF debido a la ausencia de su receptor.

A)



B)



C)

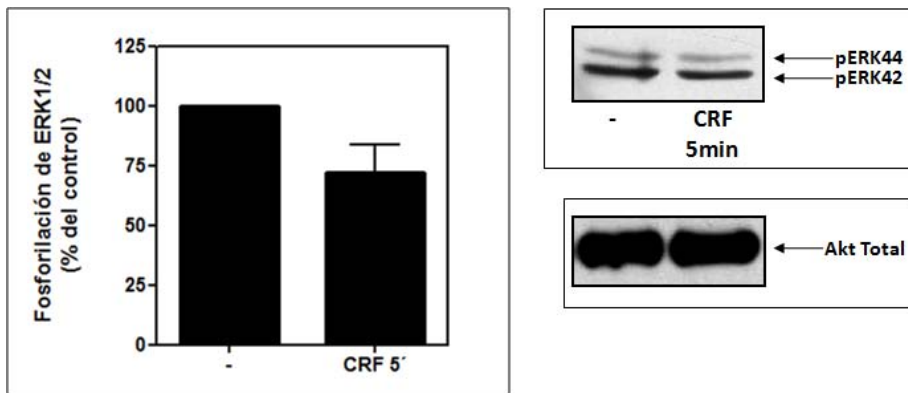
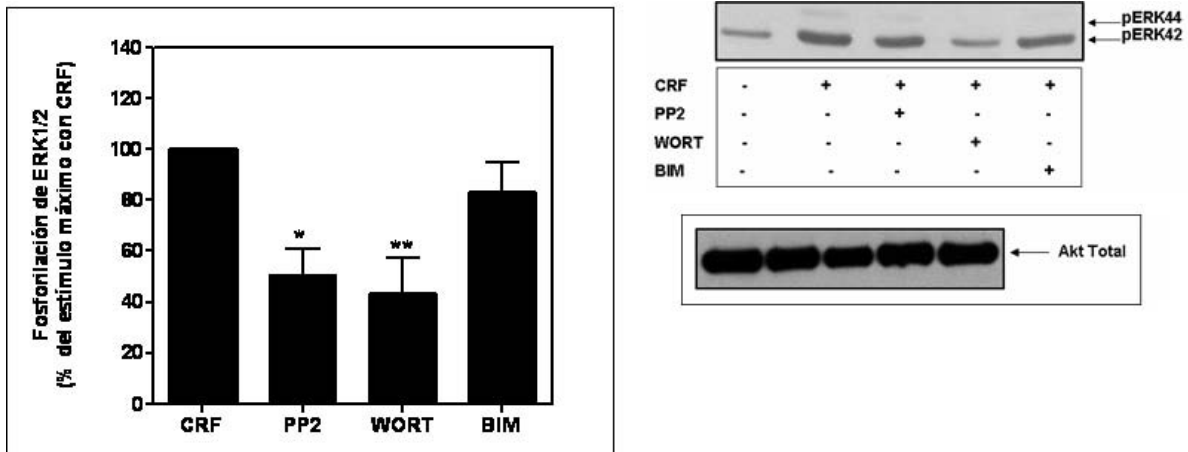


Figura 7.1. El CRF tiene un efecto dependiente del tiempo y de la concentración sobre la activación de ERK1/2. Células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF₁ y transferidas a cajas de cultivo de 6 pozos. Las células fueron incubadas por seis horas en medio sin suero antes de realizar los siguientes ensayos. **A)** Las células fueron estimuladas con 100nM de CRF por 5, 10, 20, 30 y 40 minutos. **B)** Se realizaron ensayos de dosis-respuesta estimulando con diferentes concentraciones de CRF (0.1nM-1000nM), por 5min. **C)** Células CHOK-1 sin transfectar, fueron transferidas a cajas de cultivo de seis pozos e incubadas con medio sin suero entes de realizar el estímulo con 100nM de CRF por 5min. En todos los casos (**A**, **B** y **C**), se obtuvieron extractos totales de células CHO-K1 y se determinó ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot (descrita en la sección de materiales y métodos). Para el control de carga se determinó Akt total. Las gráficas representan el promedio de entre 3-5 experimentos \pm el error estándar y una * $p < 0.05$ para A) y * $p < 0.01$ para B) vs 0.

7.2. Efecto de distintos inhibidores en la activación de ERK1/2 inducida por CRF

Dependiendo del modelo celular, el CRF puede inducir la fosforilación de las MAPK a través de distintas proteínas como son PKA, PKC y PI3K entre otras (Brar et al., 2004; Kovalovsky et al., 2002; Grammatopoulos et al., 2000; Rossant et al., 1999). Con el fin de establecer las posibles vías y proteínas que están participando en la activación de ERK1/2 inducida por CRF y caracterizar mejor al sistema, se utilizaron diferentes inhibidores de cinasas como PP2 (inhibidor de la actividad de las cinasas de la familia de Src), wortmanina (inhibidor de la actividad de PI3K), BIM (inhibidor de la actividad de las PKC clásicas y nuevas) (Figura **7.2.A**) y H89 (inhibidor de la actividad de PKA) (Figura **7.2.B**). Se puede observar que cuando se preincubaban las células con PP2, Wortmanina o H89, hay una disminución en la activación máxima de ERK1/2 inducida por CRF, mientras que cuando se preincubaba con BIM no hay una disminución significativa en dicha activación; estos resultados nos sugieren que CRF esta activando a ERK1/2 a través de las vías de Src, PI3K y PKA. Por otro lado, al parecer, la vía de PKC no está llevando a cabo un papel importante en esta activación.

A)



B)

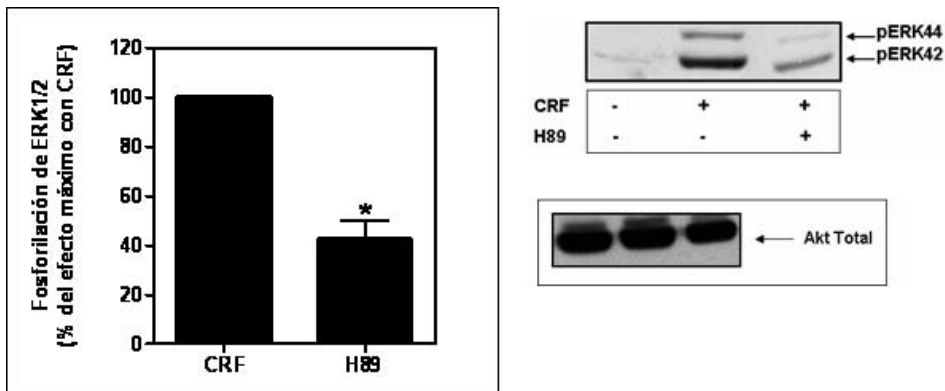
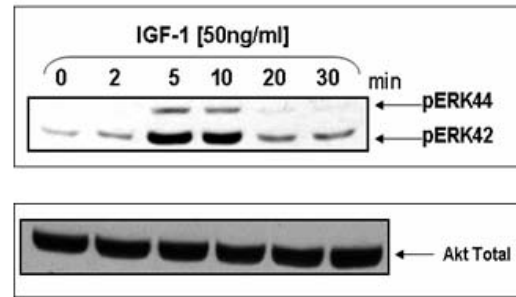
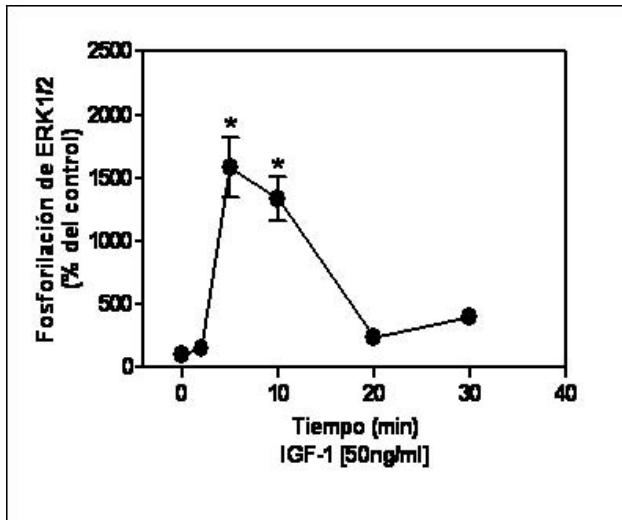


Figura 7.2. El CRF parece llevar a cabo sus efectos sobre la activación de ERK1/2 a través de Src, PI3K y PKA. Cultivos de células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF₁, y transferidas a cajas de cultivo de 6 pozos; seis horas después de retirársele el suero se realizaron los siguientes ensayos: **A)** Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con los inhibidores PP2 [20µM], Wortmanina (WORT) [100nM] y BIM [1µM]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con el agonista CRF [100nM] durante 5min. *p<0.01 y **p<0.05 vs CRF. **B)** Las células se preincubaron por 30 minutos con el inhibidor H89 [500nM] y posteriormente se estimuló con el agonista CRF [100nM] durante 5min. *p<0.05 vs CRF. En ambos casos (**A** y **B**), Se obtuvieron extractos totales y se determinó a ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. Las gráficas representan el promedio de entre 5-6 experimentos ± el error estándar.

7.3. El IGF-1 induce la activación de ERK1/2

El IGF-1, al ser una hormona relacionada con procesos de proliferación y crecimiento (O'Kusky et al., 2000; Stewart and Rotwein., 1996), ha sido ampliamente estudiado de manera tal que se ha caracterizado cómo es que activa a las MAPK en diferentes tipos celulares. En este caso, en las células CHO-K1 (que expresan endógenamente al receptor de IGF-1) transfectadas transitoriamente con el receptor CRF₁ y estimuladas con IGF-1 50ng/ml a diferentes tiempos (Figura **7.3.A**), se observa que el IGF-1 tiene la capacidad de inducir la activación de ERK1/2, obteniéndose una máxima activación a los 5min con una caída rápida a los 20min, tiempo en el cual la actividad de ERK1/2 llega a niveles cercanos al basal. Estos datos nos indican que en este modelo celular, la actividad de ERK1/2 inducida por IGF-1 es dependiente del tiempo y que la vía de señalización del IGF-1 está siendo activada de manera normal por su ligando. Por otro lado, la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 también es dependiente de la concentración del agonista, ya que se observa que a partir de una concentración de 10ng/ml se obtiene fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, la fosforilación máxima se da a una concentración de entre 40 y 50ng/ml de IGF-1 (Figura **7.3.B**).

A)



B)

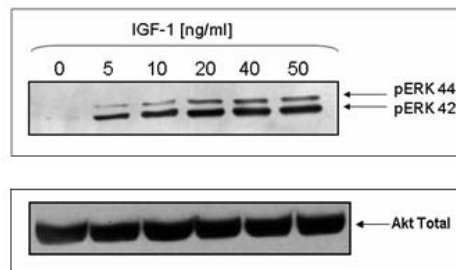
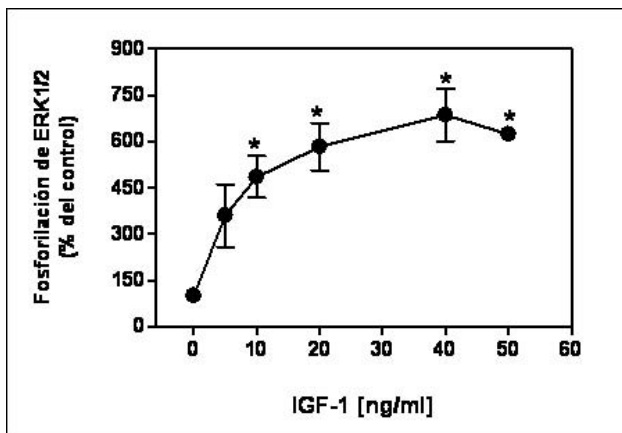


Figura 7.3. El IGF-1 induce la activación de ERK1/2 de una manera dependiente del tiempo y la concentración. Células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF_1 y transferidas a cajas de seis pozos donde fueron dejadas en medio sin suero por seis horas antes de realizar los ensayos. **A)** Las células fueron estimuladas con 50ng/ml de IGF-1 por 2, 5, 10, 20 y 30 minutos. * $p < 0.01$ vs control. **B)** Se realizó una dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de IGF-1 (5, 10, 20, 40, 50 ng/ml) por 5 minutos. * $p < 0.01$ vs control. Se obtuvieron extractos totales de las células y se determinó ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. Las gráficas representan el promedio de entre 4-5 experimentos \pm el error estándar para A y de 3 experimentos \pm el error estándar para B.

7.4. El IGF-1 activa a ERK1/2 parcialmente a través de PI3K

Para poder establecer las posibles vías y proteínas que están participando en la activación de ERK1/2 inducida por el IGF-1 y así caracterizar mejor al sistema, se utilizaron diferentes inhibidores de cinasas como Rapamicina (inhibidor de la cinasa mTOR), wortmanina (inhibidor de la actividad de PI3K), PP2 (inhibidor de la actividad de las cinasas de la familia de Src) y BIM (inhibidor de la actividad de las PKC clásicas y nuevas) (Figura 7.4). Se puede observar que cuando se preincuban las células con wortmanina hay una disminución en la activación máxima de ERK1/2 inducida por IGF-1, mientras que cuando se preincuba con rapamicina, PP2 o BIM no hay una disminución significativa en dicha activación. Estos resultados nos sugieren que IGF-1 esta utilizando parcialmente a PI3K para activar la vía de señalización de las MAPK, mientras que mTOR, Src y PKC no juegan algún papel en la activación de ERK1/2.

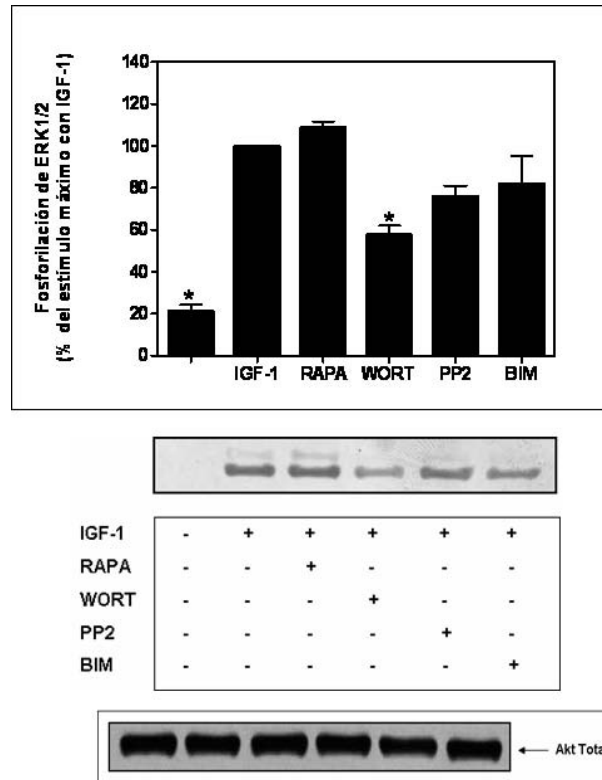


Figura 7.4. El IGF-1 induce la fosforilación de ERK1/2 a través de PI3K. Cultivos de células CHO-K1 fueron transfectadas y transferidas a cajas de cultivo de 6 pozos; seis horas después de retirársele el suero se realizaron los siguientes ensayos: Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con los inhibidores Rapamicina (RAPA) [100nM], Wortmanina (WORT) [100nM], PP2 [20 μ M] y BIM [1 μ M]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con el agonista IGF-1 [50ng/ml] durante 5min. * $p < 0.01$ vs IGF-1. Extractos totales fueron obtenidos y se determinó a ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos \pm el error estándar.

7.5. El IGF-1 activa a su receptor

Para comprobar que la vía de señalización del IGF-1 está siendo activada a través de su receptor y que éste se está fosforilando de manera normal, se evaluó la activación del receptor inducida por su ligando. Se puede observar que cuando se estimula a las células con IGF-1 [50ng/ml] (Figura 7.5) se obtiene una activación máxima de IGF-1R hasta los 10min; dicha activación se sostiene por lo menos hasta los 30min. Esto indica que el IGF-1 está activando a su receptor de una manera dependiente del tiempo.

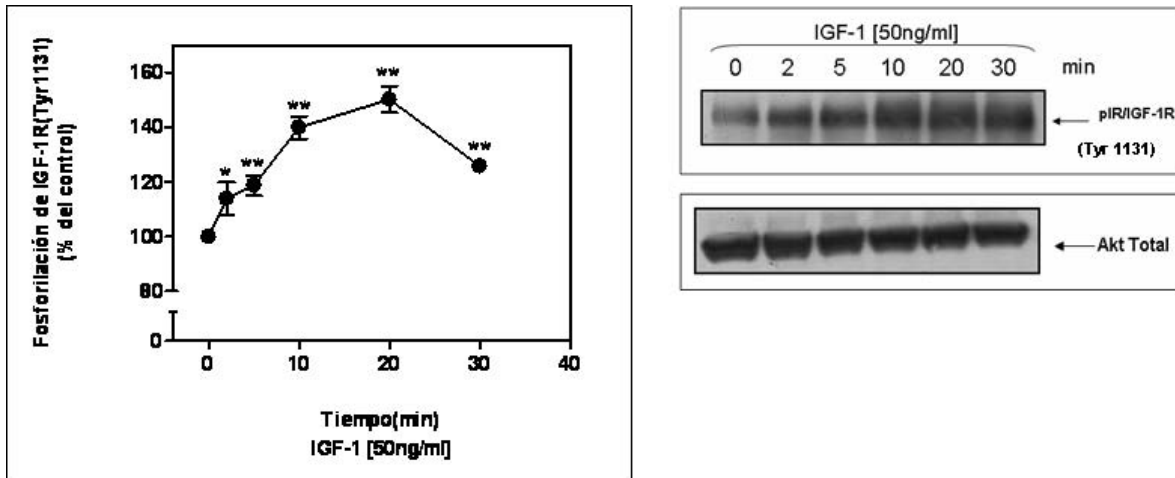


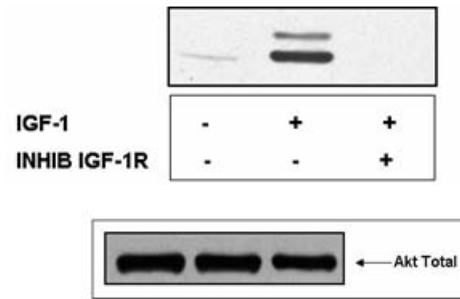
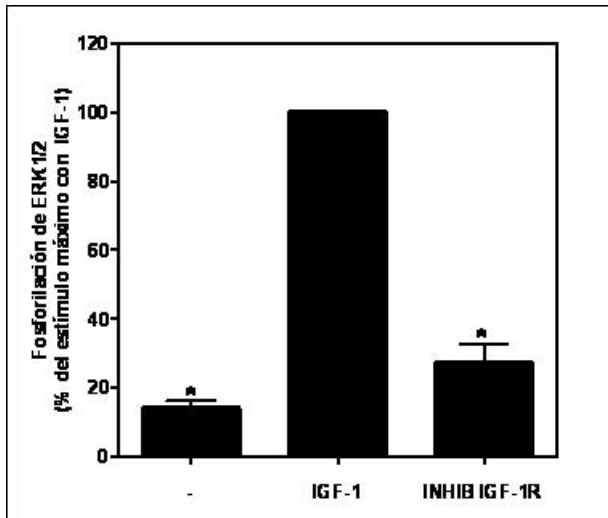
Figura 7.5. El IGF-1 activa a IGF-1R. Células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF₁ y posteriormente transferidas a cajas de seis pozos. Se dejaron de doce a dieciocho horas con medio sin suero antes de realizar los ensayos. Las células fueron estimuladas con 50ng/ml de IGF-1 por 2, 5, 10, 20 y 30 minutos. Se obtuvieron extractos totales de las células y se detectó a IGF-1R en su estado fosforilado (Tyr¹¹³¹) mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. *p<0.05 y **p<0.01vs control La gráfica representa el promedio de entre 3-5 experimentos ± el error estándar.

7.6. La activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es mediada a través de la activación de su receptor

Con el fin de comprobar que la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 se da a través de la activación de su receptor, se utilizó el inhibidor de la actividad del receptor de IGF-1. Se puede observar que cuando las células son preincubadas con dicho inhibidor y estimuladas con IGF-1, hay una disminución aproximada del 70% en la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 (Figura 7.6.A). Esto sugiere que el IGF-1 se está uniendo a su receptor para inducir su autofosforilación y así activarlo, y llevar finalmente a la activación de la cascada de las MAPK y la fosforilación de ERK1/2.

Se realizó un ensayo de dosis-respuesta para observar el comportamiento del inhibidor para el receptor de IGF-1 y establecer así si la dosis usada para inhibir la actividad y fosforilación del receptor era la correcta (Figura 7.6.B). Se puede observar que a partir de una dosis de 10µM, se obtiene la inhibición ERK1/2, la cual es completa con el uso del inhibidor a una dosis de 50µM.

A)



B)

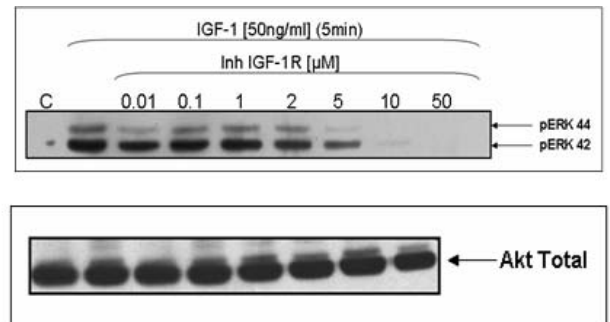
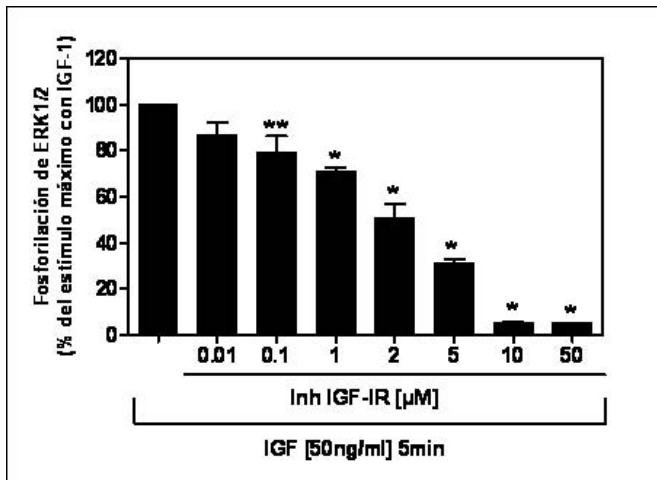
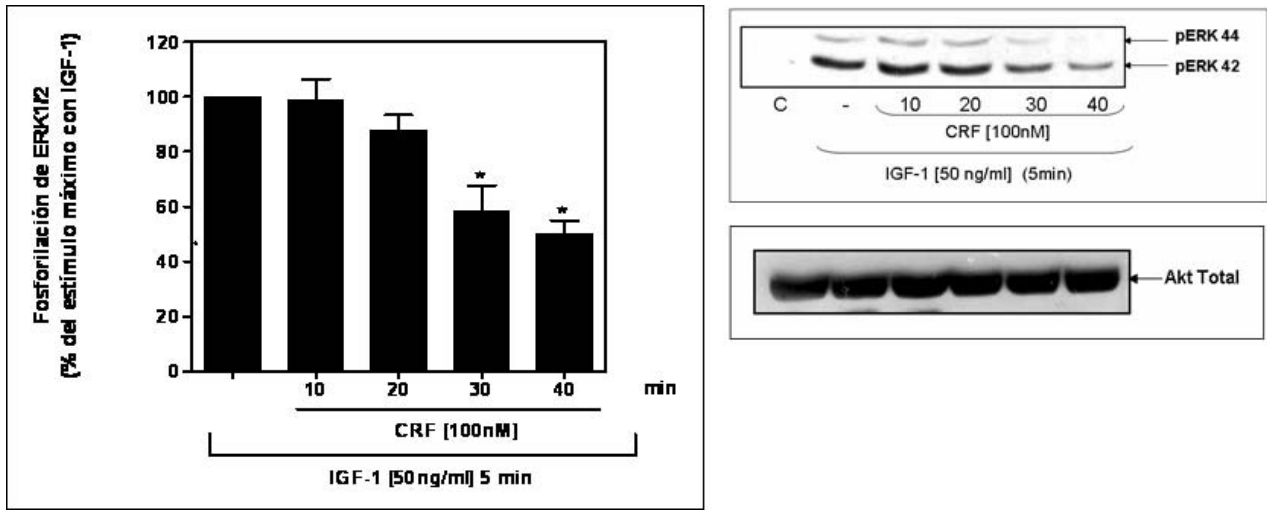


Figura 7.6. El IGF-1 induce la activación de ERK1/2 a través de IGF-1R. Cultivos de células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF₁, y transferidas a cajas de cultivo de seis pozos. Después de doce horas con medio sin suero se realizaron los siguientes ensayos: **A)** Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con el inhibidor para el receptor de IGF-1 [50μM]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con IGF-1 [50ng/ml] durante 5min. *p<0.01 vs IGF-1. **B)** Se realizaron ensayos de dosis-respuesta preincubando con diferentes concentraciones del inhibidor para el receptor de IGF-1 (0.01μM-50μM) por 30min y después estimulando con IGF-1 [50ng/ml] por 5min. *p<0.01 y **p<0.05 vs IGF-1. En ambos experimentos (**A** y **B**), se obtuvieron extractos totales y se determinó a ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. Las gráficas representan el promedio de 3 experimentos ± el error estándar.

7.7. El CRF inhibe la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1

Una vez caracterizados los sistemas, se procedió a analizar si el CRF estaba inhibiendo la señal del IGF-1 en las células CHO-K1. Ya que se ha encontrado que en procesos como el estrés y la anorexia, existe una sobrestimulación del eje HPA así como un aumento en los niveles del CRF, mientras que los niveles de IGF-1 se ven disminuidos (Charmandari et al., 2005; Seres et al., 2004). Esto sugiere que posiblemente existe relación entre ambas hormonas de manera tal que el CRF esté teniendo efectos reguladores sobre las acciones del IGF-1. Para determinar si en el modelo celular de las CHO-K1 el CRF puede regular la vía del IGF-1, se realizaron preincubaciones de CRF a diferentes tiempos y un posterior estímulo de IGF-1 por 5min, tiempo en el que se obtuvo el máximo efecto de dicha hormona en la activación de ERK1/2 (Figura **7.3**). Se puede observar que el CRF tiene la capacidad de inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 (Figura **7.7.A**). Se obtuvo una máxima inhibición (aproximadamente del 40%) con la preincubación con el CRF por 40min. También se realizaron ensayos de dosis-respuesta para determinar si dicha inhibición era dependiente de la concentración del CRF, y se observó que a concentraciones de entre 10 y 100nM (por 40min) disminuye la fosforilación de ERK1/2 inducida por 5min de estímulo con 50ng/ml de IGF-1 (Figura **7.7.B**). Estos resultados sugieren que el CRF tiene la capacidad de inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 de una manera dependiente tanto del tiempo como de la dosis.

A)



B)

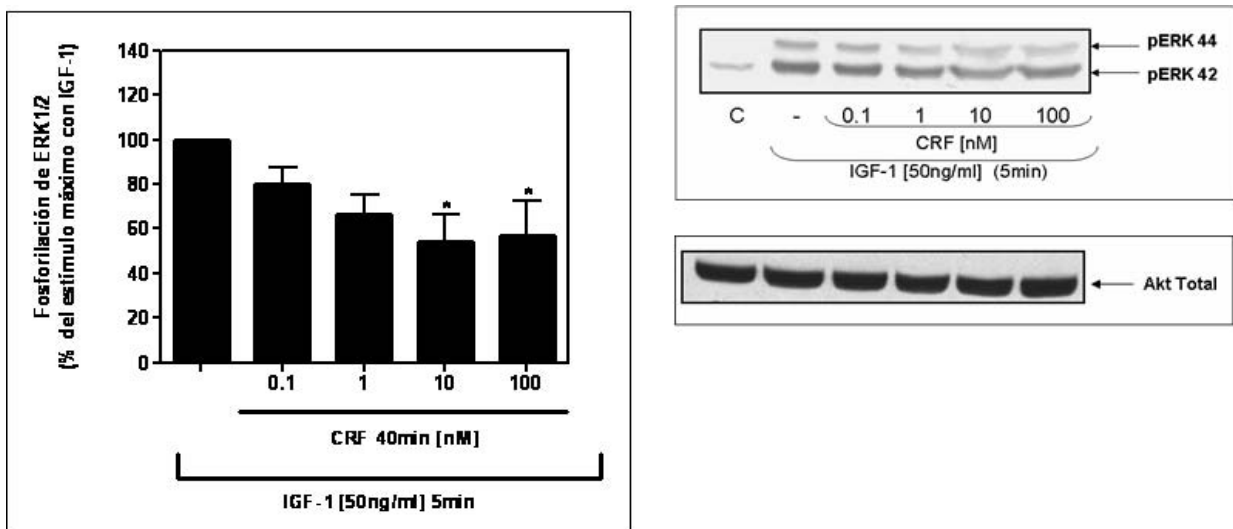


Figura 7.7. El CRF inhibe la activación de ERK1/2 inducida por IGF-1 de manera dependiente

del tiempo y la dosis. Después de la transfección, las células fueron transferidas a cajas de seis pozos e incubadas por seis horas con medio sin suero. Transcurrido este tiempo, las células fueron sometidas a los siguientes tratamientos: **A)** Se realizaron preincubaciones con CRF a diferentes tiempos (10, 20, 30 y 40min) y posteriormente se estimularon con IGF-1 [50ng/ml] durante 5min. * $p < 0.01$ vs IGF-1. **B)** Se realizaron preincubaciones con CRF a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100nM) por 40 min, y posteriormente se estimuló con IGF-1 [50ng/ml] por 5 min. * $p < 0.05$ vs IGF-1. En los dos experimentos (**A** y **B**), se obtuvieron extractos totales y se determinó a ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se detectó Akt total. Las gráficas representan el promedio de entre 4-6 experimentos \pm el error estándar.

7.8. La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es inhibida por CRF posiblemente a través de mTOR, mientras que Src, PI3K y PKC parecen no estar involucradas

Una vez establecido que CRF inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1, se procedió a determinar las posibles cinasas que pudieran estar llevando a cabo dicha inhibición; por lo cual se utilizaron los inhibidores para la actividad de cinasa de mTOR (Rapamicina), Src (PP2), PI3K (Wortmanina) y PKC (BIM). Las células fueron preincubadas con los inhibidores y/o con CRF, y posteriormente estimuladas con IGF-1. Se puede observar que cuando las células son preincubadas solamente con CRF y estimuladas con IGF-1, existe una disminución en la fosforilación de ERK1/2, la cuál es recuperada cuando se preincuba con la rapamicina. Esto no sucede cuando se preincuba con los demás inhibidores (PP2, Wortmanina y BIM) (Figura 7.8), lo cual sugiere que la cinasa mTOR está involucrada en la inhibición mediada por CRF, mientras que Src, PI3K y PKC no lo están.

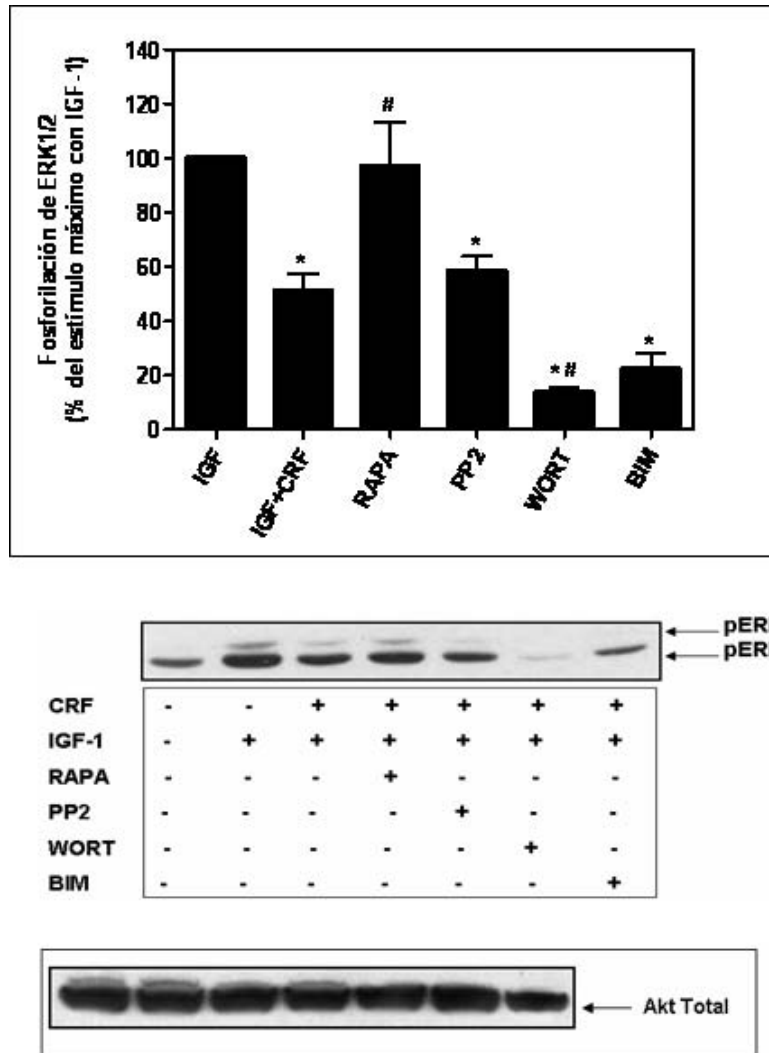


Figura 7.8. La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 es inhibida por CRF posiblemente a través de mTOR, mientras que Src, PI3K y PKC parecen no estar involucradas. Los cultivos celulares fueron transfectados y transferidos a cajas de cultivo de doce pozos y seis horas después de retirársele el suero se realizaron los siguientes tratamientos: Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con los inhibidores Rapamicina (RAPA) [100nM], PP2 [20µM], Wortmanina (WORT) [100nM] y BIM [1µM]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con el agonista CRF [100nM] durante 40min y después de este tiempo de estimuló con IGF-1 [50ng/ml] por 5 min. * $p < 0.01$ vs IGF-1, # $p < 0.01$ vs IGF-1+CRF. Extractos totales fueron obtenidos y se determinó a ERK1/2 en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. La gráfica representa el promedio de entre 3-5 experimentos \pm el error estándar.

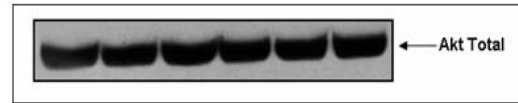
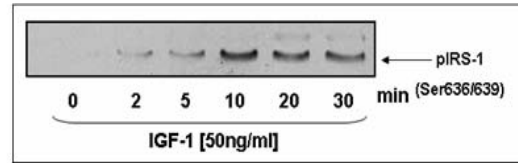
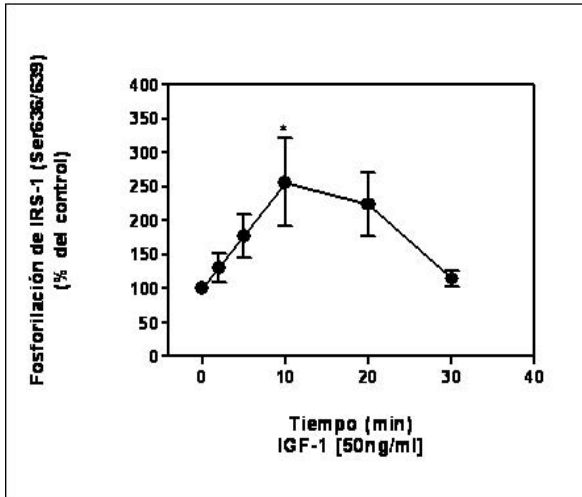
7.9. El CRF no induce ni la fosforilación de IRS-1 en la Ser636/639 ni la fosforilación de p70S6K

mTOR es una cinasa clásica de la vía de IGF-1 que es conocida por su papel en procesos de proliferación y crecimiento tanto en células no neuronales (Swiech et al., 2007) como en células neuronales (Swiech et al., 2007; Kwon et al., 2003). Esta cinasa, como parte del sistema de regulación negativa de la vía del IGF-1, tiene un papel muy importante al inducir la fosforilación de IRS-1 en la serina636/639, a través de p70S6K, lo cual lleva a la pérdida de expresión de IRS-1 (O'Reilly et al., 2006). Al mismo tiempo, p70S6K puede fosforilar directamente a IRS-1 en la serina 636/639 y en la 302 (Gual et al., 2004).

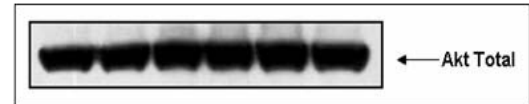
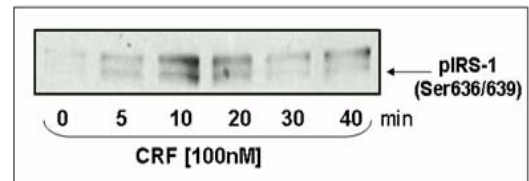
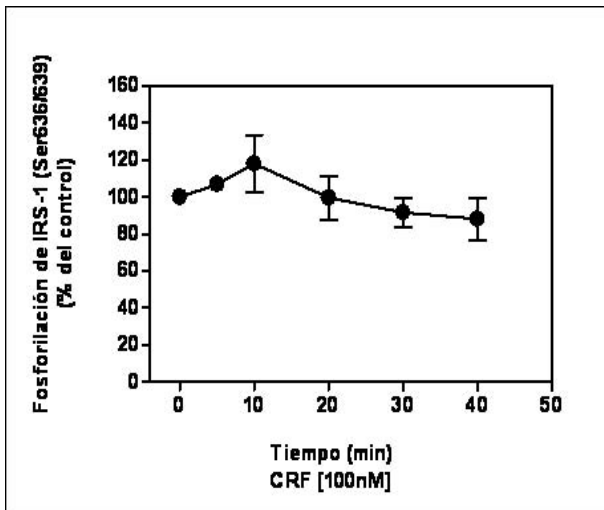
Sabiendo que CRF inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1, posiblemente a través de mTOR (Figura 7.8.A) y que mTOR y p70S6K son activadas tanto por IGF-1 como por estrés (Mingo-Sion et al., 2005), se procedió a determinar si CRF podía inducir tanto la fosforilación de IRS-1 en la serina636/639 como la activación de p70S6K. Primero se confirmó que IRS-1 estaba siendo fosforilado de manera normal en la serina 636/639 como parte de la respuesta de regulación negativa de la vía de señalización de IGF-1; para esto se realizó un curso temporal estimulando a las células con IGF-1 a diferentes tiempos. Se puede observar que el IGF-1 induce la fosforilación máxima de la serina636/639 a los 10 minutos; dicha fosforilación se sostiene hasta los 20 minutos y cae a niveles cercanos al basal a los 30 minutos (Figura 7.9.A). Esto indica que la fosforilación de IRS-1 en la serina636/639 está siendo inducida de manera normal por IGF-1 como parte de sus mecanismos de regulación homóloga. Una vez que se comprobó que la fosforilación de IRS-1 en la serina636/639 estaba siendo inducida por el IGF-1, las células se estimularon con CRF a diferentes tiempos y posteriormente se determinó la fosforilación de IRS-1 en la serina636/639 y la fosforilación de p70S6K. Se pudo observar que CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la serina 636/639 a ningún tiempo (Figura 7.9.B); lo mismo sucede en el caso de la fosforilación de p70S6K (Figura 7.9.C).

Estos resultados indican que el CRF no está inhibiendo las acciones del IGF-1 a través de la fosforilación de IRS-1 en la serina 636/639 ya que no tiene la capacidad de inducir su fosforilación. Además, CRF tampoco puede inducir la fosforilación de p70S6K, la cual tiene la capacidad de fosforilar a IRS-1 en la serina 636/639 cuando se estimula con IGF-1. Al parecer, la vía del CRF está utilizando a mTOR para inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1, pero no mediante la fosforilación de IRS-1 en la serina 636/639 por dicha cinasa y tampoco a través de la activación de p70S6K.

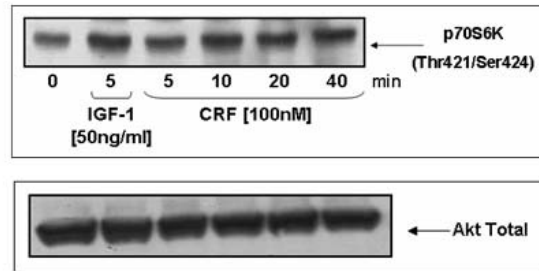
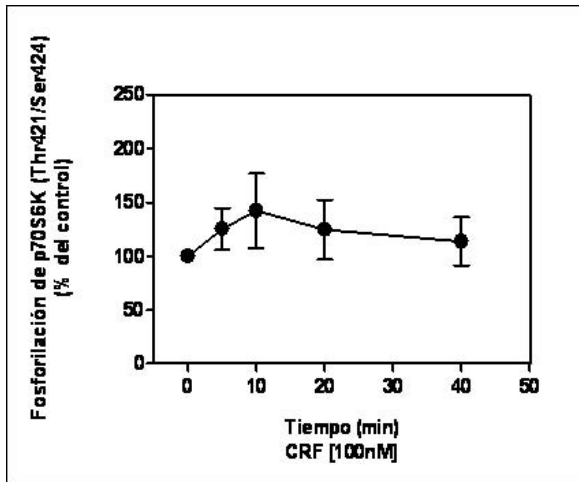
A)



B)



C)

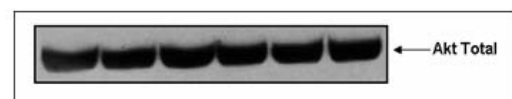
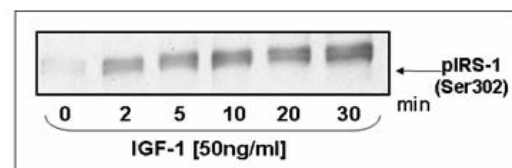
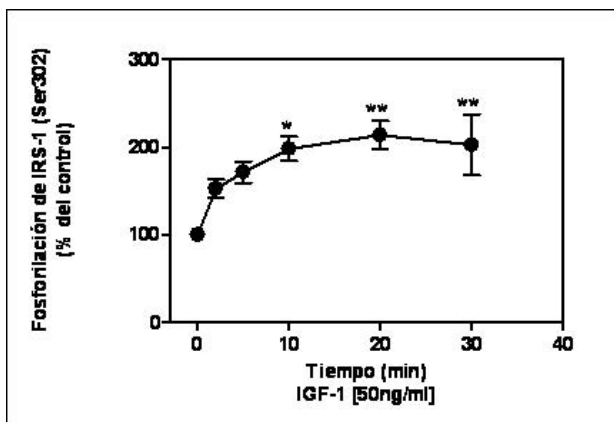


7.9. El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser636/639 y de p70S6K. Células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF₁ y transferidas a cajas de seis pozos donde fueron incubadas por doce horas en medio sin suero. Posteriormente se realizaron los siguientes ensayos: **A)** Las células fueron estimuladas con 50ng/ml de IGF-1 por 2, 5, 10, 20 y 30 minutos; y posteriormente a través de la técnica de Western blot se detectó IRS-1 fosforilado en la serina 636/639. **B)** Las células fueron estimuladas con 100nM de CRF por 5, 10, 20, 30 y 40 minutos; y posteriormente a través de la técnica de Western Blot se detectó IRS-1 fosforilado en la serina 636/639. **C)** Se realizó un curso temporal estimulando con CRF [100nM] por 5, 10, 20 y 40min o con IGF-1 [50ng/ml] por 5 min. Posteriormente se detectó la fosforilación de p70S6K mediante la técnica de Western Blot. Para el control de carga se determinó Akt total. Las gráficas representan el promedio de 5-6 experimentos ± el error estándar.

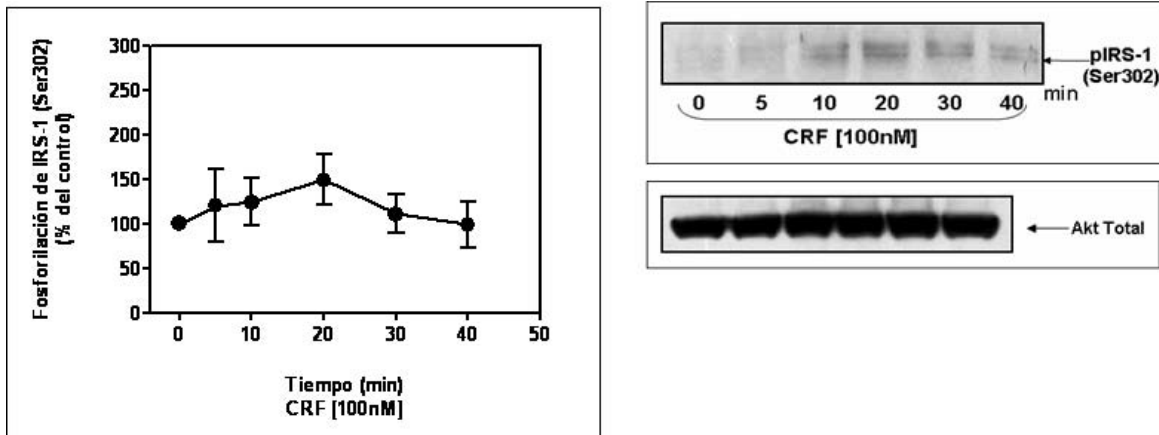
7.10. El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser302

Otra de las fosforilaciones en serina de IRS-1 importantes para la regulación negativa de la vía y el apagado de la señal de IGF-1, a través del impedimento de la unión de IRS-1 con el receptor, es el de la serina302. Dicha fosforilación se lleva a cabo a través de la cinasa JNK o por p70S6K (Giraud et al., 2004; Werner et al., 2004; Harrington et al., 2004). Por lo tanto, se probó si CRF podía inducir la fosforilación de IRS-1 en la serina 302. Primero se hicieron cursos temporales con IGF-1 para verificar que IRS-1 estuviera siendo fosforilado de manera normal como resultado de la regulación negativa de la vía de señalización. Se puede observar que cuando se estimula con IGF-1 se promueve la máxima fosforilación de IRS-1 en la serina 302 a partir de los 10 minutos (Figura 7.10.A) y se mantiene hasta los 40 minutos. Estos resultados indican que el IGF-1 induce la fosforilación de IRS-1 en la serina302 como parte característica de su vía de señalización para apagar y regular sus acciones. Ya que se estableció que IRS-1 puede ser fosforilado en dicha serina de manera normal, se prosiguió a comprobar si el CRF era capaz de fosforilar a IRS-1 en el mismo residuo. Para esto, se realizaron cursos temporales con CRF y se determinó la fosforilación de IRS-1 en la serina 302. En la Figura 7.10.B se puede observar que el CRF no induce la fosforilación de la serina302 de IRS-1, lo cual sugiere que el CRF no utiliza ésta vía para inhibir las acciones del IGF-1.

A)



B)



7.10. El CRF no induce la fosforilación de IRS-1 en la Ser302. Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el receptor CRF_1 , y transferidas a cajas de cultivo de seis pozos donde fueron incubadas por doce horas con medio sin suero. Posteriormente se realizó el siguiente ensayo: **A)** Las células fueron estimuladas con 50ng/ml de IGF-1 por 2, 5, 10, 20 y 30 minutos; y posteriormente a través de la técnica de Western blot se detectó IRS-1 fosforilado en la serina302. * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.01$ vs control. **B)** Las células fueron estimuladas con 100nM de CRF por 5, 10, 20, 30 y 40 minutos; y posteriormente a través de la técnica de Western blot se detectó IRS-1 fosforilado en la serina302. El control de carga se determinó con Akt total. Las gráficas representan el promedio de 5-6 experimentos \pm el error estándar.

7.11. El CRF inhibe la fosforilación de Shc inducida por IGF-1

Una de las proteínas adaptadoras importantes en la vía de señalización del IGF-1, además del IRS-1, es la proteína Shc (Mastick et al., 1994; Sasaoka et al., 1994), la cual es fosforilada una vez que el receptor ha sido activado por su ligando. Esta proteína es importante para que el IGF-1 pueda llevar a cabo sus acciones mitogénicas y proliferativas (Sasaoka et al., 1994; Sasaoka et al.; 1996). Por lo tanto, ya que la fosforilación de algunos residuos de serina del IRS-1 no es, al parecer, la vía mediante la cual el CRF está llevando a cabo sus efectos sobre la acción del IGF-1, se procedió a identificar el papel de Shc. Las células fueron preincubadas con CRF por 40 minutos (tiempo en el que se observó la máxima inhibición de la fosforilación de ERK1/2) y estimuladas con IGF-1 por 5 minutos; y posteriormente se identificó a Shc fosforilada en la Tyr239/240; debido a que estas fosforilaciones son las responsables de la unión de Grb2 (Ishihara et al., 1998) y la posterior activación de la vía de las MAPK.

Se puede observar que cuando se preincuban las células con CRF y se estimulan posteriormente con IGF-1 la fosforilación de Shc se ve inhibida en un 40% aproximadamente en comparación con el estímulo solo de IGF-1 (Figura 7.11). Estos resultados nos indican que el CRF está interfiriendo de alguna manera en la fosforilación de Shc (responsable de la posterior unión de Grb2) inducida por IGF-1, lo cual hace suponer que al verse afectada esta fosforilación, la vía de señalización del IGF-1 se ve afectada de igual manera. Por lo tanto la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1, se está llevando a cabo mediante la interrupción de la fosforilación de Shc que promueve la unión de la proteína Grb2.

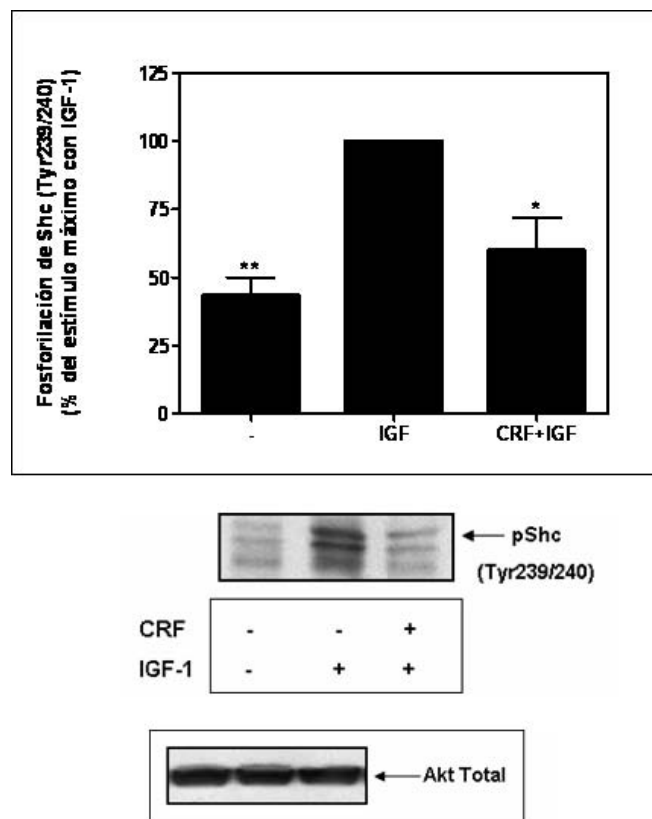


Figura 7.11. El CRF inhibe la fosforilación de la proteína Shc inducida por IGF-1. Después de la transfección, las células fueron transferidas a cajas de seis pozos y dejadas seis horas con medio sin suero. Transcurrido este tiempo, las células fueron sometidas los siguientes tratamientos: Las células fueron estimuladas con IGF-1 [50ng/ml] por 5 min o se realizó una preincubación con CRF [100nM] por 40min y posteriormente se estimuló con IGF-1 [50ng/ml] durante 5min. * $p < 0.05$ y $p < 0.01$ vs IGF-1. Se obtuvieron extractos totales y se determinó a Shc en su estado fosforilado mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos \pm el error estándar.

7.12. El CRF inhibe la fosforilación del receptor de IGF-1

Una posible explicación para la inhibición de la fosforilación de Shc es que la fosforilación en tirosina del IGF-1R esté disminuyendo por acción del CRF. Para comprobar que efectivamente el CRF tenía algún efecto a nivel de la fosforilación del receptor se procedió a preincubar a las células con CRF por 40 minutos y/o estimular con IGF-1 por 5 minutos. Posteriormente se identificó al IGF-1R fosforilado en la Tyr1158 que es un residuo que indica la activación del receptor.

Se puede observar que cuando se preincubaban las células con CRF y se estimulan posteriormente con IGF-1 la fosforilación del receptor de IGF-1 se ve inhibida en un 40% aproximadamente en comparación con el estímulo solo de IGF-1 (Figura **7.12**). Este último experimento sugiere que el CRF está ejerciendo sus acciones a nivel del receptor de IGF-1 impidiendo o disminuyendo su fosforilación en residuos de tirosina, lo cual conduce a la incapacidad de fosforilar y unir a la proteína adaptadora Shc; al no fosforilarse Shc no puede unir e inducir la fosforilación de Grb2 y por lo tanto no se lleva a cabo la vía de señalización de las MAPK.

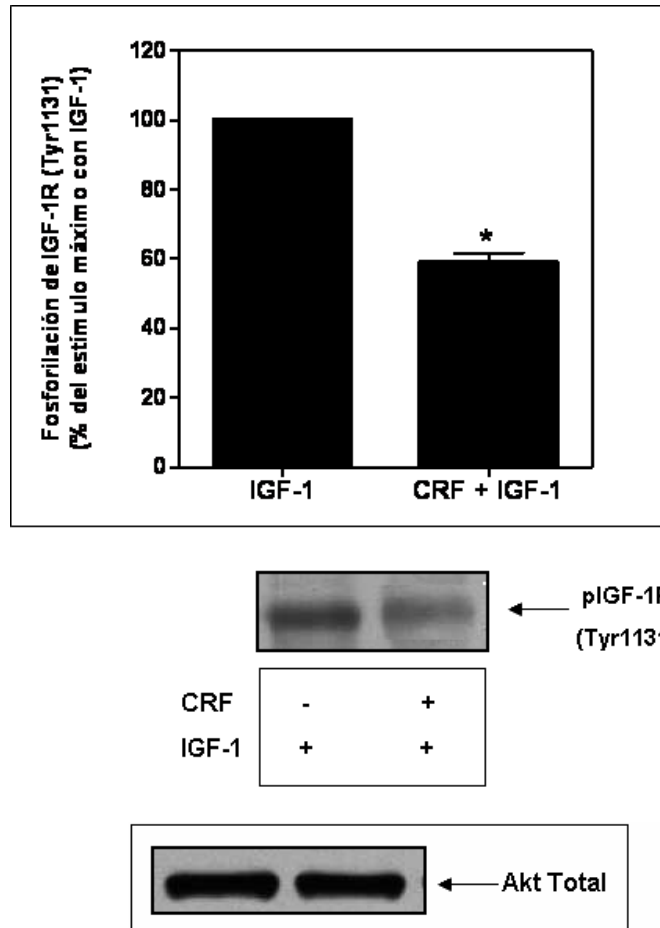


Figura 7.12. El CRF inhibe la fosforilación del IGF-1R. Después de la transfección, las células fueron transferidas a cajas de seis pozos y dejadas seis horas con medio sin suero. Transcurrido este tiempo, las células fueron sometidas los siguientes tratamientos: Las células fueron estimuladas con IGF-1 [50ng/ml] por 5 min o se realizó una preincubación con CRF [100nM] por 40min y posteriormente se estimuló con IGF-1 [50ng/ml] durante 5min. * $p < 0.05$ vs IGF-1. Extractos totales fueron obtenidos y se determinó a IGF-1R fosforilado en la Tyr1131 mediante la técnica de Western blot. Para el control de carga se determinó Akt total. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos \pm el error estándar.

VIII. DISCUSIÓN

Se sabe que tanto el CRF como el IGF-1 se encuentran relacionados en el desarrollo de algunas enfermedades como la anorexia, en donde los niveles del CRF se encuentran elevados y los del IGF-1 disminuidos. Además de estas evidencias indirectas, existen muchas otras enfermedades en donde ambas hormonas parecen estar implicadas de modo que el CRF se encuentra en niveles más altos de lo normal y el IGF-1 en niveles más bajos. Estos trabajos hacen suponer que existe una relación entre ambas vías de señalización de manera tal, que una de las hormonas, en este caso el CRF, esté regulando o inhibiendo las acciones del IGF-1, como es la fosforilación de ERK1/2. Se sabe que el CRF tiene la capacidad de inhibir la liberación del IGF-1 en cultivos primarios de células de la granulosa de rata (Calogero et al., 2002).

En el presente trabajo se muestran indicios de las posibles proteínas que participan en la activación de las MAPK vía el CRF. En nuestro modelo celular, CHO-K1, las cinasas que se encontró están involucradas son Src, PI3K y PKA, mientras que PKC no parece estar actuando de manera relevante. Algunos grupos de trabajo sugieren que el CRF activa a las MAPK vía la transactivación del receptor con actividad de cinasa de tirosina para EGF (Andreev et al., 2001; Kraus et al., 2003; Punn et al., 2006; Fuentes., 2007 tesis de licenciatura), mientras que otros trabajos sugieren a las β -arrestinas como proteínas importantes en la activación de ERK1/2 (Oakley et al., 2007, Lefkowitz., 2007; Luttrell., 2006).

Al parecer, la vía de activación de las MAPK por CRF depende del tipo celular; en donde se puede estar activando PKA y/o PKC (Brar et al., 2004; Cibelli et al., 2001; Kovalovsky et al., 2002; Rossant et al., 1999). Además, en el caso de PI3K, se ha observado que esta cinasa puede jugar un papel central en la transactivación de los receptores de EGF por acción del CRF (Punn et al., 2006) para la posterior activación de las MAPK; sin embargo, se ha observado que CRF puede activar a PI3K sin necesidad de transactivar al receptor de EGF (Fuentes., 2007 tesis de licenciatura). En cuanto al papel de Src, existen trabajos en donde se determina que proteínas cinasas como Src, y receptores para el EGF, están implicados en la señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) asociados con la activación de la cascada de señalización de Ras/MAPK (Kraus et al., 2003; Andreev et al., 2001). Aunque también, por otro lado, se ha determinado que la proteína cinasa Src se encuentra involucrada en la activación de la proteína PI3K (Kraus et al., 2003). En la línea celular HEK293 se ha observado que la

activación de la cascada de las ERK1/2 por los receptores CRF₁, es mediada principalmente por la activación de la vía de PI3K/Akt (Punn et al., 2006).

En el caso de las células CHO-K1, no expresan receptores para EGF (Bringman et al., 1987; Jo M et al., 2002); por lo cual, es posible que se esté utilizando otro receptor parecido con actividad de cinasa de tirosina, como el receptor para PDGF. Además de conocer cuáles son las proteínas que están participando en la activación de las MAPK por CRF, los experimentos realizados indicaron que en nuestro modelo celular, la expresión del CRF₁R puede activar vías de señalización como la de ERK1/2.

Por otra parte, el IGF-1 al parecer está utilizando a la cinasa PI3K para activar a la vía de señalización de las MAPK, ya que en la Figura 7.4 cuando se utiliza Wortmanina (inhibidor de PI3K) se observa una disminución en la fosforilación de ERK1/2. Además de esta vía, IGF-1 activa la casacada de las MAPK a través de la vía clásica (Grb2/Sos/Ras/Raf/MAPK) mediante de la activación de la proteína adaptadora Shc. Se sabe además que el IGF-1 puede inducir la fosforilación de PI3K de una manera dependiente de la activación de Shc y de su unión con Grb2, para llevar a cabo la migración celular en células vasculares de músculo liso (Radhakrishnan et al., 2008). Por otra parte, en el 2007, Sampaio et al., propusieron que a través del estímulo del receptor para EGF, la cinasa PI3K podía promover la fosforilación de ERK1/2 cuando el estímulo con EGF era débil. Este grupo de trabajo sugirió que la vía a través de la cual PI3K estaba promoviendo la cascada de las MAPK era mediante la unión de la proteína Gab1 (proteína de unión tipo 1 asociada a Grb2, del inglés *Grb2-associated binding protein 1*) a PI3K y la posterior asociación con Shp2 (proteína fosfatasa tipo 2 que contiene un dominio 2 en la región de homología a Src, del inglés *Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2*), que finalmente activa a Ras. Se sabe también que en fibroblastos 3T3 que son deficientes para IRS-1, la señalización de IGF-1 es mediada por Gab1 (Winnay et al., 2000). Es posible que en las células CHO-K1, el IGF-1R esté utilizando a proteínas como Gab1 y Shp2 para inducir la fosforilación de ERK1/2 como vía secundaria a través de PI3K.

El aspecto principal que se encontró en este trabajo de tesis es que el CRF tiene la capacidad de inhibir las acciones del IGF-1, al parecer a través la cinasa mTOR, ya que al usar Rapamicina se recupera la fosforilación de ERK1/2 inhibida por CRF (Figura 7.8.A). Sin embargo, los experimentos realizados no permiten establecer cómo es que mTOR está llevando a cabo la inhibición de la vía del IGF-1 y por tanto la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, ya que el CRF no fue capaz de inducir ni la fosforilación de IRS-1

en el residuo de serina 636/639 (Figura 7.9.B), sitio característico de fosforilación por mTOR, ni es capaz de fosforilar a p70S6K (Figura 7.9.C), que también puede inducir la fosforilación de IRS-1 en dicho residuo. Estos datos sugieren también que el CRF está utilizando a mTOR para llevar a cabo sus efectos, sin embargo, no lo hace a través de activar a p70S6K que es la cinasa característica activada por mTOR.

Por otro lado, el CRF no es capaz de fosforilar a IRS-1 en la serina 302 (Figura 7.10.B) que es inducida principalmente por JNK, una cinasa activada en procesos de estrés. La fosforilación de este residuo también se lleva a cabo de manera directa por p70S6K, sin embargo, como se mencionó anteriormente, el CRF no activa a dicha cinasa.

Se analizaron estos dos residuos ya que, la serina 636/639 es fosforilada principalmente por mTOR, una cinasa clásica tanto de la vía de la insulina como la del IGF-1, muy relacionada en la regulación negativa de la vía. Por lo tanto, se pensó que podría ser activada por el CRF para llevar a cabo sus efectos inhibitorios. Por su parte, la serina 302 que es fosforilada principalmente por JNK, se pensó como posible blanco de fosforilación del CRF ya que JNK se activa en procesos relacionados con el estrés en donde el CRF tiene un papel primordial.

Sin embargo, no es posible descartar por completo el papel de la fosforilación en serinas de IRS-1, ya que dicha proteína posee más de 50 sitios potenciales de fosforilación en estos residuos, y es posible que existan otras serinas aún no estudiadas o no evaluadas en el presente trabajo, que estén implicadas en la inhibición inducida por CRF. Algunas otras serinas que pueden estar jugando algún papel importante son la 307, la 612 y la 1101 ya que se ha observado que su fosforilación reduce la señal tanto de la insulina como del IGF-1 ya que se encuentran dentro de los dominios PTB o PH que son importantes para la unión del IRS-1 a los fosfoinosítidos de membrana o al receptor fosforilado; o se encuentran dentro de regiones que son importantes para la asociación del IGF-1 a proteínas como PI3K. Por ejemplo, la Ser307 puede ser fosforilada tanto por JNK, una cinasa implicada en la patogénesis de la obesidad y la diabetes tipo 2, como por p70S6K; y su fosforilación promueve la reducción de la asociación con el receptor y puede llevar a IRS-1 a degradación. Por otra parte, la Ser612 es fosforilada por ERK1/2 e inhibe la unión de PI3K a IRS-1 ya que se encuentra cerca de los residuos de Tyr implicados en dicha unión (D'Alessandris et al., 2007). Finalmente, la Ser1101 es fosforilada por p70S6K o por PKC- θ y su fosforilación promueve la reducción de la activación de IRS-1 y la activación de Akt. Dicha fosforilación está relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gual et al., 2005; Tremblay et al., 2005)

Por otro lado, se sabe que la proteína Shc juega un papel primordial para que el IGF-1 lleve a cabo sus funciones proliferativas y mitogénicas (Sasaoka et al., 1994; Sasaoka et al; 1996). Algunos trabajos sugieren que el IGF-1 une preferentemente a Shc más que a IRS-1, y que inclusive estos sustratos compiten entre ellos por la unión al receptor (Sasaoka et al., 1996; Sasaoka et al., 1996; Ishihara et al; 1997). Al parecer, a través de la unión IRS-1 al receptor se llevan a cabo principalmente los efectos metabólicos y a través del Shc se llevan a cabo los efectos proliferativos y la activación de las MAPK.

En el presente trabajo los datos sugieren que Shc tiene un papel importante para la activación de las MAPK por IGF-1 y que el CRF induce la inhibición de la fosforilación de Shc que lleva a la unión y activación de Grb2 y por consiguiente la activación de la vía de las MAPK y ERK1/2.

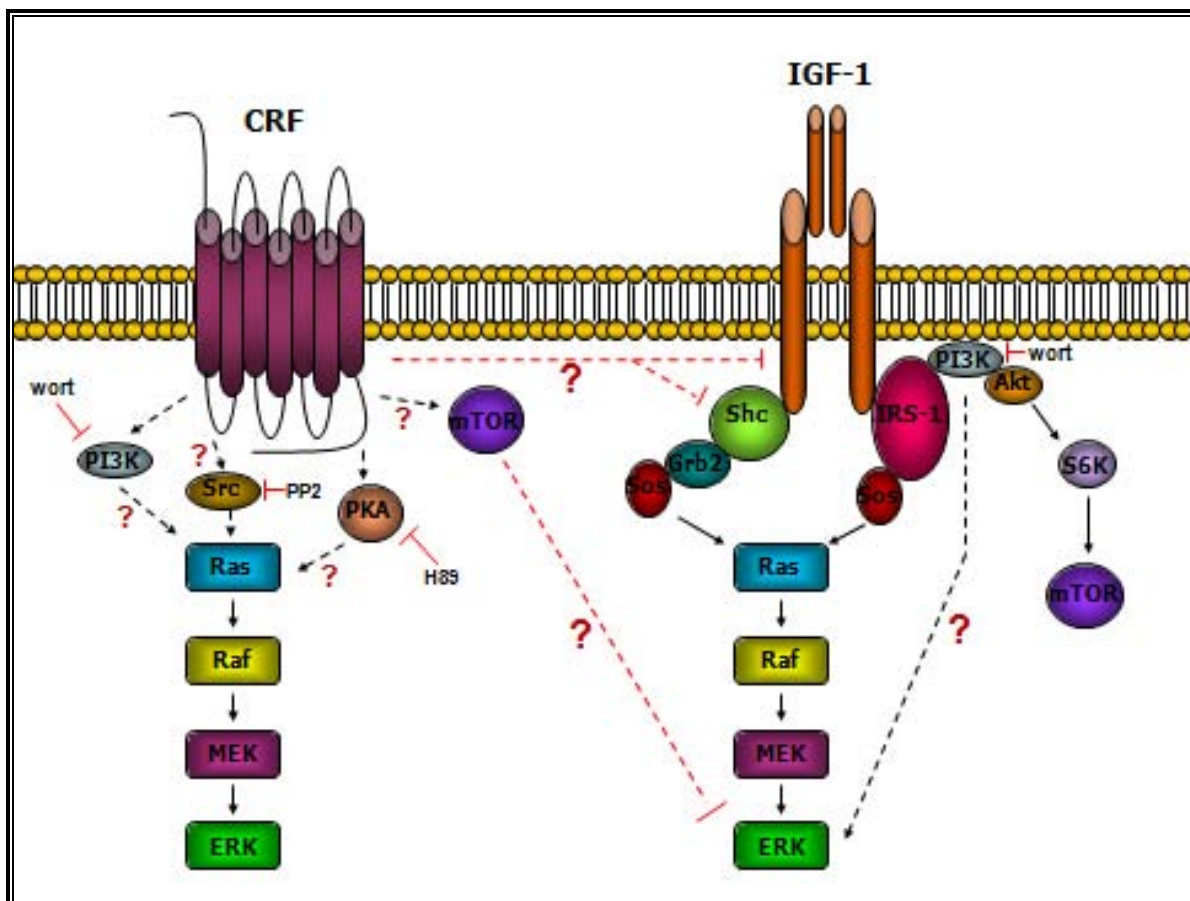
De este modo, el CRF parece estar llevando a cabo sus efectos inhibitorios mediante la alteración de la fosforilación de Shc, mientras que la fosforilación en serina de IRS-1 no parece tener peso en el proceso inhibitorio del CRF.

La alteración de la fosforilación de Shc es, al parecer, mediante la modificación de la fosforilación en tirosinas del receptor de IGF-1. Este receptor, al ser un receptor con actividad de cinasa de tirosina, depende en mucho de su fosforilación para poder encender las vías de señalización para llevar a cabo sus efectos de crecimiento y desarrollo (Li and Miller., 2006). Dicha activación se da por la unión de su ligando IGF-1 al dominio extracelular del receptor que estimula su actividad intrínseca de cinasa de tirosina y la autofosforilación de loops de activación que contienen tres sitios principales: Tyr¹¹³¹, Tyr¹¹³⁵ y Tyr¹¹³⁶; siendo la Tyr¹¹³⁵ el primer sitio en fosforilarse (Favelyukis S et al., 2001). Se ha observado que cuando se expresa en fibroblastos una mutante del receptor de IGF-1 que no contiene las tirosinas del *loop* de activación, existe una reducción dramática de la señalización del IGF-1 (Kato H et al., 1994; Li S et al., 1994). Además, en células NIH-3T3 con una doble mutante (Y1135/Y1131F) en el receptor, es incapaz de autofosforilarse y es incapaz de promover la señalización mediante Shc e IRS-1 (Hernandez-Sanchez C et al., 1995). Por otro lado, cuando se utiliza una mutante de la Tyr¹¹³⁶, se ha encontrado que hay una disminución en la fosforilación del receptor, de la síntesis de DNA y de la mitogénesis, mientras que las mutaciones de la Tyr¹¹³⁵ o de la Tyr¹¹³¹ por si solas tienen efectos pequeños (Li S et al., 1994). Se asoció una mala señalización del IGF-1R con la transformación a células malignas en cáncer (Li and Miller., 2006; LeRoith D and Roberts CT., 2003; Valentinis B and Baserga R., 2001). En este trabajo se encontró que la tirosina

detectada (Tyr¹¹³¹) del IGF-1R, es importante en las células CHO-K1 para que el receptor lleve a cabo sus efectos; ya que al preincubar las células con CRF, la fosforilación del receptor inducida por IGF-1 se ve disminuida, y por lo tanto se ve afectada su asociación con Shc y la posterior activación de la cascada de las MAPK.

En resumen, el presente trabajo se encontró que el CRF no sólo inhibe la fosforilación de Shc inducida por IGF-1, sino que además lo hace a través de la inhibición de la fosforilación de IGF-1R inducida por su ligando. De este modo, la inhibición mediada por CRF tiene lugar al impedir la fosforilación del *loop* de activación del receptor de IGF-1 y por lo tanto, la asociación del IGF-1R con la proteína adaptadora Shc y la posterior unión de Grb2, la activación de la vía de las MAPK y la fosforilación de ERK1/2.

Modelo General Propuesto



X. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo de tesis se encontró que CRF está utilizando a la cinasa mTOR para llevar a cabo la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1. Sin embargo, no se hicieron los experimentos suficientes para determinar cómo es que dicha cinasa está ayudando a CRF a llevar a cabo sus efectos. Posiblemente lo esté haciendo a nivel del receptor, ya que el CRF inhibe su fosforilación; por lo tanto, sería importante hacer experimentos que permitan dilucidar si mTOR e IGF-1 están interactuando de manera tal que mTOR lo esté inactivando. Además tendrían que hacerse experimentos para saber si el CRF está activando a mTOR y cómo es que lo está haciendo.

En este trabajo se encontró también, que Shc juega un papel importante en llevar a cabo la activación de la vía de las MAPK, sin embargo, es importante conocer en este modelo celular si para la vía de IGF-1 se prefiere a la Shc o a IRS-1 como proteína adaptadora que lleva a la vía proliferativa.

Aunque al parecer la fosforilación en serinas de IRS-1 no parece ser el mecanismo llevado por CRF para inhibir las acciones de IGF-1, no se puede descartar que el CRF pueda inducir la fosforilación de algún otro residuo de serina de IRS-1, por lo cual, es importante realizar experimentos para evaluar otras serinas de relevancia en la regulación negativa y apagado de la señal de la vía de IGF-1.

Por último, sería importante llevar a cabo los mismos experimentos realizados en un modelo celular endógeno en donde las células expresen ambos receptores. Además, sabiendo que ambos receptores están involucrados en enfermedades como anorexia y Alzheimer, sería interesante buscar modelos celulares que permitan asociar a estas enfermedades con la interacción entre ambos receptores y así conocer mejor los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo dichas enfermedades.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem.* **275**:9047-54.

An WL, Cowburn RF, Li L, Braak H, Alafuzoff I, Iqbal K, Iqbal IG, Winblad B, Pei JJ. (2003). Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **163**:591–607.

Andreev J, Galisteo M L, Kranenburg O, Logan S K, Chiu E S, Okigaki M, Cary L A, Moolenaar W H and Schlessinger J. (2001). Src and Pyk2 Mediate G-Protein-Coupled Receptor Activation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) but Are Not Required for Coupling to the Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Signaling Cascade. *J Biol Chem.* **276**:20130-20135.

Avruch J, Lin Y, Long X, Murthy S, Ortiz-Vega S. (2005). Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **8**:67–72.

Bach MA and Bondy CA. (1992). Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology.* **131**:2588–2594.

Bogoyevitch M and Kobe B. (2006). Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. *MMBR.* **70**:1061–1095.

Boney CM, Gruppuso PA, Faris RA, Frackelton Jr AR. (2000). The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I -mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol.* **14**:805–813.

Boorse GC and Denver RJ. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and Comparative Endocrinology.* **146**:9-18.

Boorse GC, Kholdani CA, Seasholtz AF, Denver RJ. (2006). Corticotropin-releasing factor is cytoprotective in *Xenopus* tadpole tail: coordination of ligand, receptor, and binding protein in tail muscle cell survival. *Endocrinology.* **147**:1498-507.

Borsello T and Bonny C. (2004). Use of cell-permeable peptides to prevent neuronal degeneration. *Trends Mol. Med.* **10**:239–244.

Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* **9**:1180–1186.

Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, Laville M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Vidal H. (2003). Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* **52**:1319–1325.

Brar BK, Chen A, Perrin MH and Vale W. (2004). Specificity and Regulation of Extracellularly Regulated Kinase1/2 Phosphorylation Through Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptors 1 and 2 beta by the CRF/Urocortin Family of Peptides. *Endocrinology*. **145**:1718-29.

Bringman TS, Lindquist PB, Derynck R. (1987). Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell*. **48**:429–440.

Bruijnzeel AW and Gold MS. (2005). The role of corticotropin-releasing factor-like peptides in cannabis, nicotine, and alcohol dependence. *Brain Res Brain Res Rev*. **49**:505-28.

Calogero AE, Barreca A, Burrello N, Palermo I, Giordano G. (2002). Corticotropin-releasing hormone inhibits insulin-like growth factor-I release from primary cultures of rat granulosa cells. *J. Endocrinol*. **174**:493-498.

Cammalleri M, Lutjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**:14368–14373.

Campbell DS and Holt CE. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. **32**:1013–1026.

Carlson CJ, White MF, Rondinone CM. (2004). Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. **316**:533-9.

Carro EM, et al. (2004). Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: therapeutic prospects?. *Exp. Rev. Neurother*. **4**: 79– 86.

Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med*. **8**: 1390–1397.

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. (1995). Localization of Novel Corticotropin-Releasing Factor Receptor (CRF2) MRNA Expression to Specific Subcortical Nuclei in Rat Brain: Comparison With CRF1 Receptor MRNA Expression. *J Neurosci*. **15**:6340-6350.

Chan JA, Zhang H, Roberts PS, Jozwiak S, Wieslawa G, Lewin-Kowalik J, Kotulska K, Kwiatkowski DJ. (2004). Pathogenesis of tuberous sclerosis subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation, *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. **63**:1236–1242.

Chang L and Karin M. (2001). Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades. *Nature*. **410**:37-40.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. (2005). Endocrinology of the Stress Response. *Annu Rev Physiol*. **67**:259-84.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale W W. (1993). Expression Cloning of a Human Corticotropin-Releasing-Factor Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**:8967-71.

Chow JC, Condorelli G, Smith RJ. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. *J Biol Chem.* **73**:4672–4680.

Chung, J, Kuo, CJ, Crabtree GR, Blenis J. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Cell.* **69**:1227–1236.

Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI. (2002). Region-specific alterations in insulin-like growth factor receptor type I in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. *Brain Res.* **946**:307-13.

Cibelli G, Corsi P, Diana G, Vitiello F, Thiel G. (2001). Corticotropin-Releasing Factor Triggers Neurite Outgrowth of a Catecholaminergic Immortalized Neuron Via CAMP and MAP Kinase Signalling Pathways. *Eur J Neurosci.* **13**:1339-48.

Conti L, Sipione S, Magrassi L, Bonfanti L, Rigamonti D, Pettirossi V, Peschanski M, Haddad B, Pelicci P, Milanese G, Pelicci G, Cattaneo E. (2001). Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nat Neurosci.* **4**:579–586.

Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P and Stenzel-Poore MP. (2000). Abnormal Adaptations to Stress and Impaired Cardiovascular Function in Mice Lacking Corticotropin-Releasing Hormone Receptor-2. *Nat Genet.* **24**:403-409.

Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* **312**:927–930.

Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler GB Jr. (1992). The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab.* **75**:762-7.

Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte Jr D. (1998). Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology.* **50**:164–168.

Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. (2007). JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* **28**: 601–608.

D'Alessandris C, Lauro R, Presta I, Sesti G. (2007). C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia.* **50**:840-9.

Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberlin. *J. Biol. Chem.* **277**:35364–35370.

Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. (2007). mTOR Complex1–S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *J. Mol. Med.* **6**: 252–259.

Daughaday WH and Rotwein P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* **10**:68-91.

Dautzenberg FM and Hauger RL. (2002). The CRF Peptide Family and Their Receptors: Yet More Partners Discovered. *Trends Pharmacol Sci.* **23**:71-7.

Dautzenberg FM, Gutknecht E, Linden IV, Olivares-Reyes JA, Durrenberger F and Hauger RL. (2004). Cell-Type Specific Calcium Signaling by Corticotropin-Releasing Factor Type 1 (CRF(1)) and 2a (CRF(2(a))) Receptors: Phospholipase C-Mediated Responses in Human Embryonic Kidney 293 but Not SK-N-MC Neuroblastoma Cells. *Biochem Pharmacol.* **68**:1833-44.

Dentremont KD, Ye P, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. (1999). Increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression during early postnatal development differentially increases neuron number and growth in medullary nuclei of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* **114**:135-41.

De Wire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol.* **298**: 303-8.

Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM and Vale WW. (1996). Cloning and Characterization of Human Urocortin. *Endocrinology.* **137**:2167-2170.

Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT. (2001). Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol.* **8**:1058-63.

Ferguson SS. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signalling. *Pharmacol Rev.* **26**:119-22.

Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell.* **11**:1457-1466.

Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC. (2006). G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**:48-54.

Giraud J, Leshan R, Lee YH, White MF. (2004). Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling. *J Biol Chem.* **279**:3447-54.

Goodyer CG, de Stephano L, Lai WH, Guyda HJ, Posner BI. (1984). Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus and brain. *Endocrinology.* **114**:1187-1195.

Grammatopoulos DK and Chrousos GP. (2002). Functional Characteristics of CRH Receptors and Potential Clinical Applications of CRH-Receptor Antagonists. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* **13**:436-444.

Grammatopoulos DK, Randeva HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW. (2000). Urocortin, but Not Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway in Human Pregnant Myometrium: an Effect Mediated Via R1alpha and R2beta CRH Receptor Subtypes and Stimulation of Gq-Proteins. *Mol Endocrinol.* **14**:2076-91.

Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. (2003). Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem.* **278**:8199-211.

Grigoriadis DE, Lovenberg TW, Chalmers DT, Liaw C, De Souza EB. (1996). Characterization of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Subtypes. *Ann N Y Acad Sci.* **780**:60-80.

Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. (2003). MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia.* **46**:1532-42.

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* **87**: 99–109.

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol.* **166**:213-23.

Harwood FC, Shu L, Houghton PJ. (2008). mTORC1 Signaling Can Regulate Growth Factor Activation of p44/42 Mitogen-activated Protein Kinases through Protein Phosphatase 2A. *JBC.* **283**:2575–2585.

Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM. (2003). Mediation of Corticotropin Releasing Factor Type 1 Receptor Phosphorylation and Desensitization by Protein Kinase C: a Possible Role in Stress Adaptation. *J Pharmacol Exp Ther.* **306**:794-803.

Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. (2006). Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **5**:453-79.

Hay N and Sonenberg N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**:1926–1945.

Hernandez-Sanchez C, Blakesley V, Kalebic T, Helman L, LeRoith D. (1995). The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **270**: 29176–29181.

Hillhouse EW and Grammatopoulos DK. (2006). The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology. *Endocr Rev.* **27**:260-86.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* **420**:333-336.

- Hou L and Klann E.** (2006). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* **24**:6352–6361.
- Hresko RC and Mueckler M.** (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**:40406–40416.
- Huang S and Houghton PJ.** (2003). Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* **3**:371-7.
- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL.** (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat. Genet.* **37**:19–24.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL.** (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat. Cell Biol.* **4**:648–657.
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL.** (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17**:1829–1834.
- Isaacs N, James R, Niall H, Bryant-Greenwood G, Dodson G, Evans A, North AC.** (1978). Relaxin and its structural relationship to insulin. *Nature.* **271**:278-81.
- Ishihara H, Sasaoka T, Wada T, Ishiki M, Haruta T, Usui I, Iwata M, Takano A, Uno T, Ueno E, Kobayashi M.** (1998). Relative involvement of Shc tyrosine 239/240 and tyrosine 317 on insulin induced mitogenic signaling in rat1 fibroblasts expressing insulin receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* **252**:139–144
- Ishihara H, Sasaoka T, Ishiki M, Takata Y, Imamura T, Usui I, Langlois WJ, Sawa T, Kobayashi M.** (1997). Functional importance of Shc tyrosine 317 on insulin signaling in rat1 fibroblasts expressing insulin receptors. *J Biol Chem.* **272**:9581–9586
- Jo M, Thomas KS, O'Donnell DM, Gonias SL.** (2002). Epidermal Growth Factor Receptor-dependent and -independent Cell-signaling Pathways Originating from the Urokinase Receptor. *J Biol Chem.* **278**:1642-6.
- Johnson GI and Nakamura K.** (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1773**:1341–1348.
- Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT Jr, LeRoith D.** (1994). Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol. Endocrinol.* **8**: 40–50
- Keck ME.** (2006). Corticotropin-Releasing Factor, Vasopressin and Receptor Systems in Depression and Anxiety. *Amino Acids.* **31**:241-250.
- Kim B, Cheng HL, Margolis B, Feldman EL.** (1998). Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulinlike growth factor I signaling. *J Biol Chem.* **273**: 34543–34550.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* **110**:163–175.

- Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K.** (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells.* **8**:65–79.
- Kohout TA and Lefkowitz RJ.** (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol.* **63**: 9-18.
- Kolakowski LF Jr.** (1994). GCRDb: a G-Protein-Coupled Receptor Database. *Receptors Channels.* **2**:1-7.
- Korneyev A, Binder L, Bernardis J.** (1995). Rapid reversible phosphorylation of rat brain tau proteins in response to cold water stress. *Neurosci Lett.* **191**:19 –22.
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E.** (2002). Activation and Induction of NUR77/NURR1 in Corticotrophs by CRH/CAMP: Involvement of Calcium, Protein Kinase A, and MAPK Pathways. *Mol Endocrinol.* **16**:1638-51.
- Kraus S, Benard O, Naor Z, Seger R.** (2003). C-Src Is Activated by the Epidermal Growth Factor Receptor in a Pathway That Mediates JNK and ERK Activation by Gonadotropin-Releasing Hormone in COS7 Cells. *J Biol Chem.***278**:32618-32630.
- Kule CE, Karoor V, Day JNE, Thomas WG, Baker KM, Dinh D, Acker KA, Booz GW.** (2004). Agonist-dependent internalization of the angiotensin II type one receptor (AT1): role of C-terminus phosphorylation in recruitment of beta-arrestins. *Regul Pept.* **120**:141-8.
- Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Baker SJ.** (2003). mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:12923–12928.
- Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, Barc-Pain S, Perault-Pochat MC, Gil R, Pradier L, Hugon J.** (2005). mTOR/p70S6k signaling alteration by Aβ exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **94**:215–225.
- Lawlor MA and Alessi DR.** (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *J Cell Sci.* **114**:2903-10.
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF.** (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem.* **278**:2896-902.
- Lefkowitz RJ.** (2007). Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf).* **190**:9-19.
- Lefkowitz RJ and Shenoy SK.** (2005). Transduction of Receptor Signals by Beta-Arrestins. *Science.* **308**:512-7.
- LeRoith D and Roberts CT.** (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* **195**:127–137.
- Li S, Ferber A, Miura M, Baserga R.** (1994). Mitogenicity and transforming activity of the insulin-like growth factor-I receptor with mutations in the tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 32558–32564.

- Li W and Miller WT.** (2006). Role of the Activation Loop Tyrosines in Regulation of the Insulin-like Growth Factor I Receptor-tyrosine Kinase. *J Biol Chem.* **281**:23785-91.
- Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lorsch P, Holsboer F.** (1999). Differential Behavioural Effects of Chronic Infusion of CRH 1 and CRH 2 Receptor Antisense Oligonucleotides into the Rat Brain. *J Psychiatr Res.* **33**:153-163.
- Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, Probst J C, Wotjak C T, Engelmann M, Holsboer F, Montkowski A.** (1995). Chronic Infusion of a CRH1 Receptor Antisense Oligodeoxynucleotide into the Central Nucleus of the Amygdala Reduced Anxiety-Related Behavior in Socially Defeated Rats. *Regul Pept.* **59**:229-239.
- Ling Y, Maile LA, Lieskovska J, Badley-Clarke J, Clemmons DR.** (2005). Role of SHPS-1 in the regulation of insulin-like growth factor I-stimulated Shc and mitogen activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* **16**:3353–3364
- Ljungberg MC, Bhattacharjee MB, Lu Y, Armstrong DL, Yoshor D, Swann JW, Sheldon M, D'Arcangelo G.** (2006). Activation of mammalian target of rapamycin in cytomegalic neurons of human cortical dysplasia. *Ann. Neurol.* **60**:420–429.
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T.** (1995). Cloning and Characterization of a Functionally Distinct Corticotropin-Releasing Factor Receptor Subtype From Rat Brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:836-840.
- Luttrell LM.** (2006). Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol.* **332**:3-49.
- Luo RZ, Beniac DR, Fernandes A, Yip CC, Ottensmeyer FP.** (1999). Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science.* **285**:1077-80.
- Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG.** (2000). Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev.* **10**:668–674.
- Malagelada C, Ryu EJ, Biswas SC, Jackson-Lewis V, Greene LA.** (2006). RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J. Neurosci.* **26**:9996–10005.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC.** (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell.* **10**:151–162.
- Mastick CC, Kato H, Roberts CT, LeRoith D, Saltiel AR.** (1994). Insulin and insulin-like growth factor-I receptors similarly stimulate deoxyribonucleic acid synthesis despite differences in cellular protein tyrosine phosphorylation. *Endocrinology.* **135**:214–222.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG.** (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* **402**:309–313.
- Miltenberger RJ, Cortner J, Farnham PJ.** (1993). An Inhibitory Raf-1 Mutant Suppresses Expression of a Subset of V-Raf-Activated Genes. *J Biol Chem.* **268**:15674-15680.

- Mingo-Sion AM, Ferguson HA, Koller E, Reyland ME, Van Den Berg CL.** (2005). PKC δ and mTOR interact to regulate stress and IGF-I induced IRS-1 Ser312 phosphorylation in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. **91**: 259–269.
- Minneman KP.** (2007). Heterodimerization and Surface Localization of G Protein Coupled Receptors. *Biochemical Pharmacology*. **In Press, Corrected Proof**.
- Molhoek KR, Brautigam DL, Slingluff CL.** (2005). Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin. *J. Transl. Med.* **3**: 39.
- Morrison CD, Xi X, White CL, Ye J, Martin RJ.** (2007). Amino acids inhibit Agrp gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *Am. J. Physiol: Endocrinol. Metab.* **293**:165–171.
- Mothe I and Van Obberghen E.** (1996). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem.* **271**:11222-7.
- Nemoto S and Finkel T.** (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science.* **295**:2450–2452.
- Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Hudson CC, Flores-Vega F, Dautzenberg FM, Hauger RL.** (2007). Carboxyl terminal and intracellular loop sites for CRF₁ receptor phosphorylation and β -arrestin2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*
- Okada S, Kao AW, Ceresa BP, Blaikie P, Margolis B, Pessin JE.** (1997). The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen- activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* **272**:28042–28049.
- O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ.** (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci.* **20**:8435-42.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N.** (2006). mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. *Cancer Res.* **66**: 1500–1508.
- O'Shea C, Klupsch K, Choi S, Bagus B, Soria C, Shen J, McCormick F, Stokoe D.** (2005). Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *EMBO J.* **24**:1211–1221.
- Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ.** (2006) Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J. Neurosci.* **26**:12977–12983.
- Patrussi L, Savino MT, Pellegrini M, Paccani SR, Migliaccio E, Plyte S, Lanfrancone L, Pelicci PG, Baldari CT.** (2005). Cooperation and selectivity of the two Grb2 signaling to Ras family GTPases and Myc-dependent survival. *Oncogene.* **24**:2218–2228

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* **272**:29911-8.

Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, Kanety H, Seger R, Zick Y. (1999). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem.* **274**:28816-22.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr Rev.* **22**:153-83.

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pelicci PG. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* **70**:93–104.

Pierce KL and Lefkowitz RJ. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* **2**: 727-33.

Polli N, Scacchi M, Pecori Giralardi F, Sormani M, Zappulli D, Cavagnini F. (2008). Low insulin-like growth factor I and leukopenia in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* **41**:355-9.

Punn A, Levine MA, Grammatopoulos DK. (2006). Identification of Signaling Molecules Mediating Corticotropin-Releasing Hormone-R1alpha-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Interactions: the Critical Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Regulating ERK1/2 but Not P38 MAPK Activation. *Mol Endocrinol* **20**:3179-3195.

Radhakrishnan Y, Maile LA, Ling Y, Graves LM, Clemmons DR. (2008). Insulin-like Growth Factor-I Stimulates Shc-dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation via Grb2-associated p85 in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* **283**:16320-31.

Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. (2001). Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem.* **276**:3543-9.

Ravichandran KS. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene.* **20**:6322–6330.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**:585–595.

Reiling JH and Sabatini DM. (2006). Stress and mTOR signaling. *Oncogene.* **25**:6373–6383.

Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK. (1996). Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *European Journal of Endocrinology.* **135**:515–532.

Rinderknecht E and Humbel RE. (1976). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U SA.* **73**:2365-9.

Risbrough B, Hauger L, MaryAnn P, Geyer A. (2003). Role of Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptors 1 and 2 in CRF-Potentiated Acoustic Startle in Mice. *Psychopharmacology.* **V170**:178-187.

Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. (1982). In Vivo Corticotropin-Releasing Factor-Induced Secretion of Adrenocorticotropin, Beta-Endorphin, and Corticosterone. *Endocrinology.* **110**:272-278.

Rosenfeld RG, Ceda G, Cutler CW, Dollar LA, Hoffman AR. (1985). Insulin and insulin-like growth factor (somatomedin) receptors on cloned rat pituitary tumor cells. *Endocrinology.* **117**: 2008–2016.

Rossant CJ, Pinnock RD, Hughes J, Hall MD, McNulty S. (1999). Corticotropin-Releasing Factor Type 1 and Type 2alpha Receptors Regulate Phosphorylation of Calcium/Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein and Activation of P42/P44 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology.* **140**:1525-36.

Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. (2001). Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest.* **107**:181-9.

Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev.* **26**: 916–943.

Salcini AE, McGlade J, Pelicci G, Nicoletti I, Pawson T, Pelicci PG. (1994). Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene.* **9**:2827–2836.

Saltiel AR and Kahn CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* **414**:799-806.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci.* **5**:1222–1227.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* **7**:284 –301.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**:1296–1302.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* **307**:1098–1101.

Sasaoka T, Ishihara H, Sawa T, Ishiki M, Morioka H, Imamura T, Usui I, Takata Y, Kobayashi M. (1996). Functional importance of amino-terminal domain of Shc for interaction with insulin and epidermal growth factor receptors in phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem.* **271**:20082–20087.

Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, Usui I, Olefsky JM, Kobayashi M. (1996). Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology.* **137**:4427–4434.

Sasaoka T, Ishiki M, Wada T, Hori H, Hirai H, Haruta T, Ishihara H, Kobayashi M. (2001). Tyrosine phosphorylation-dependent and -independent role of Shc in the regulation of IGF-1-induced mitogenesis and glycogen synthesis. *Endocrinology.* **142**:5226–5235.

Sasaoka T, Rose DW, Jhun BH, Saltiel AR, Draznin B, Olefsky JM. (1994). Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* **269**:13689–13694.

Schmelzle T and Hall MN. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* **103**:253–262.

Seger R and Krebs EG. (1995). The MAPK Signaling Cascade. *Faseb J.* **9**:726-735.

Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M. (2004). Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**:965-70.

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* **15**:2099-111.

Shah OJ and Hunter T. (2006). Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor–mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**:6425–6434.

Siddle K, Ursø B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, Soos MA. (2001). Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans.* **29**:513-25.

Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ, Backer JM, Ullrich A, White MF. (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implication for insulin control of ras signaling. *EMBO J.* **12**:1929–1936.

Skutella T, Probst J C, Renner U, Holsboer F, Behl C. (1998). Corticotropin-Releasing Hormone Receptor (Type I) Antisense Targeting Reduces Anxiety. *Neuroscience.* **85**:795-805.

Smith WW, Norton DD, Gorospe M, Jiang H, Nemoto S, Holbrook NJ, Finkel T, Kusiak JW. (2005). Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins mediates a toxicity. *J Cell Biol.* **169**:331–339.

- Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M.** (2006). Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**:16454-16459.
- Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF.** (1996). Appetite-Suppressing Effects of Urocortin, a CRF-Related Neuropeptide. *Science*. **273**:1561-1564.
- Steckler T and Holsboer F.** (1999). Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Subtypes and Emotion. *Biol Psychiatry*. **46**:1480-1508.
- Stewart CE and Rotwein P.** (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev*. **76**:1005-26.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF.** (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. **352**:73-77.
- Sweatt JD.** (2004). Mitogen-Activated Protein Kinases in Synaptic Plasticity and Memory. *Curr Opin Neurobiol*. **14**:311-7.
- Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J.** (2007). Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *BBA*. **1784**:116–132.
- Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg, Schuman EM.** (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:467–472.
- Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini DL.** (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat. Neurosci.* **8**:1727–1734.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J.** (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol*. **13**: 1259–1268.
- Tham A, Nordberg A, Grissom FE, Carlsson-Skwirut C, Viitanen M, Sara V.** (1993). Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Neural Transm., Parkinson's Dis. Dement. Sect.* **5**:165– 176.
- Tischmeyer W, Schicknick H, Kraus M, Seidenbecher CI, Staak S, Scheich H, Gundelfinger ED.** (2003). Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur. J. Neurosci.* **18**:942–950.
- Trejo JL, Carro E, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I.** (2004). Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm. IGF Res.* **14**: 39–43.
- Tremblay F, Brule S, Um SH, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A.** (2005). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *PNAS*. **104**:14056-61.
- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM.** (1999). Structure-Activity Relationships of G Protein-Coupled Receptors. *Arch Med Res.* **30**:420-435.

Um SH, D'Alessio D, Thomas G. (2006). Nutrient overload, insulin resistance and ribosomal protein S6 kinase 1. *Cell Metabol.* **3**:393–402.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature.* **431**:200–205.

Unger JW and Lange W. (1997). Insulin receptors in the pituitary gland: morphological evidence for influence on opioid peptide-synthesizing cells. *Cell and Tissue Research.* **288**: 471–483.

Ursø B, Cope DL, Kalloo-Hosein HE, Hayward AC, Whitehead JP, O'Rahilly S, Siddle K. (1999). Differences in signaling properties of the cytoplasmic domains of the insulin receptor and insulin-like growth factor receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* **274**:30864-73.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. (1981). Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and Beta-Endorphin. *Science.* **213**:1394-7.

Valentinis B and Baserga R. (2001). IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol. Pathol.* **54**:133–137

Webster J and Scanlon MF. (1991). Growth factors and the anterior pituitary. *Baillie`re's Clinical Endocrinology and Metabolism.* **5**: 699–726.

Werner ED, Lee J, Hansen L, Yuan M, Shoelson SE. (2004). Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem.* **279**:35298-35305.

Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC. (1990). Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol.* **4**:773-8.

White MF. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science.* **302**:1710-1711.

White MF and Yenush L. (1998). The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol.* **28**:179-208.

Winnay JN, Brüning JC, Burks DJ, Kahn CR. (2000). Gab-1-mediated IGF-1 signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* **275**:10545-50

Zapf J and Froesch ER. (1986). Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. *Horm Res.* **24**:121-30.

Zick Y. (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* **11**:437-41.