



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Regulación de la vía de señalización de la insulina por
efecto del Ácido Lisofosfatídico (LPA) en células de
origen hepático.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MÓNICA RIVERA VALENCIA

TUTOR: Dr. JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES



2011



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.

*Los grandes espíritus siempre han encontrado una violenta
oposición de parte de mentes mediocres.*

*Große Geister haben stets heftige Gegnerschaft in den
Mittelmäßigen gefunden.*

Albert Einstein.

Gracias a la máxima casa de estudios UNAM, principalmente a la FES Iztacala, por abrirme las puertas y recibirme con los brazos abiertos, gracias por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Agradezco a mis sinodales Dr. Rafael Villalobos Molina, Dr. Ricardo Mejia Zepeda, Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, Dr. Juan Manuel Arias Montaña y Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes, por sus valiosas sugerencias

Dedicatorias

Dedico este trabajo a las dos personas más importantes de mi vida:

A mis PADRES:

Papito y Mamita, gracias a los dos por darme la oportunidad de realizar siempre mis sueños, por permitirme equivocarme y aprender de ello, por siempre tener un buen consejo y el abrazo más calido y sincero.

Gracias Papá por tomarme de la mano y mostrarme la Vida con todos sus defectos y sus bondades, tu me has enseñado los Valores más importantes, y quiero expresarte que me siento orgullosa de tenerte como Padre. Te admiro más que a nadie en la Vida Gracias por predicar con el ejemplo "El que quiere puede" tu quisiste y tu pudiste, ahora te digo que "Yo quiero y yo puedo", Papito muchas gracias por cada palabra y cada abrazo TE AMO, los mejores consejos son los que vienen de tu corazón.

Mamita eres la luz de mi vida, este trabajo es completamente tuyo porque sin ti sería imposible haberlo llevado a cabo, gracias por permitirme llegar hasta aquí, gracias por ser la todóloga de mi vida, la mejor amiga, mi hombro pa' chillar, la que siempre esta a mi lado cuando mas lo necesito, por desvelarte conmigo y por siempre tener un beso y un abrazo disponible para cualquier ocasión, sobre todo gracias por creer en mi. Eres la mujer más increíble que conozco, la mas fuerte, la mas inteligente, la mas luchona, la mas hermosa de todas las mujeres, Mamita TE AMO y estoy orgullosa de ti no hay mejor Madre que la mía.

Gracias por tomarme de la mano y guiarme en este viaje con tanto amor.

Agradecimientos

Primero quiero agradecer al mejor equipo de trabajo, con ustedes he estado toda mi vida, crecimos juntos y a lo largo de este viaje hemos reído, llorado, sufrido y gozado; gracias Arturo, Paty y Carlos, LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN.

Hermanos ustedes son parte fundamental en este sueño, me han apoyado siempre con palabras bonitas, me han dado ánimos para seguir adelante, nunca me han dado la oportunidad de darme por vencida, ustedes son mi mayor inspiración.

A mis sobrinos:

Vane, Saúl y Nina, por haber llegado a mi vida, ustedes son mi mejor motivo su sonrisa y sus abrazos son la mejor recompensa que pudiera tener en la vida, simplemente gracias por existir, los AMO infinitamente. Vane muchísimas gracias por las porras que me brindaste en momentos de debilidad y por ser la más alocada del mundo gracias por ser mi amiga.

A mi familia:

Adri siempre te estaré agradecida por las charlas nocturnas, las terapias jajaja y por el apoyo que me has dado durante tantos años, tu eres parte de este sueño, mil gracias.

Gaby, muchas gracias por tantos años de amistad, por estar siempre a mi lado, por compartir cada momento de tu vida, estoy orgullosa de ti nena, te admiro y se que estaremos juntas hasta la vejez.

A Daniel León, gracias por estar al pie del cañón junto a mi, aconsejándome y amandome, te conocí en el momento preciso y te agradezco todo lo que haces por mi, con tu paz y tu ser reconfortas mi alma. Mein Leben mit dir ist gut, ist Liebe dich. Immer zusammen, du bist mein Traum und mein Bester Grund zum Lächeln.

A la Familia Valencia:

Tía Elsa, muchísimas gracias por creer en mi, por apoyarme en todo momento, por decir cosas lindas y aconsejarme sabiamente, la admiro y la amo.

A Bety y Vicko^t, ustedes dos siempre me apoyaron, me brindaron momentos maravillosos y te agradezco a ti bety por tantos años a mi lado, porque crecimos juntas, por apoyarme y creer plenamente en mi, te quiero mucho flaca y agradezco a ambos por sentirse feliz de tener una prima Bióloga.

También agradezco el apoyo y los consejos que he recibido de ustedes mis primos Vick, Claudia, Elsa y Josue, gracias por las sonrisas de sus pequeños: la tocayita Moni, Vale y Niko.

A la Familia Rivera por ser tan fiesteros.

Especialmente gracias a ti Susy Q, por que juntas hicimos posible este sueño, por apoyarme a lo largo de la carrera, por ser una pieza fundamental en mi desarrollo profesional, por tus consejos y por quererme tanto, porque desde peques estamos juntas y así será por el resto de nuestras vidas, te quiero mucho prima.

A mis amigos:

Este trabajo no solo es mío también es de todas las personas que estuvieron a mi lado en todos estos años, gracias a las grandes mujeres que encontré en mi camino, llenándome con su sabiduría, paciencia, amor, coraje, fuerza, lealtad, sinceridad, cualidades que he visto en cada una de ustedes:

Marisol, eres muy especial para mi y sin tu apoyo me hubiera sido imposible concluir, estoy orgullosa de ti, tita te quiero mucho.

YaZ, gracias por ser mi compañera de locuras y por el coraje de tu ser, te AMO.

Osvelia, para ti mi querida mielecita, gracias por cada palabra, abrazo, consejo y oración TAPJL.

Con ustedes viví los mejores momentos, siempre serán parte de mi familia.

Rocío, tu locura te hace única y esa es tu esencia muchas gracias te quiero.

Cindy, muchas gracias brujita por ser tan linda conmigo eres muy especial para mi te quiero mucho, nunca olvidare cada momento a tu lado.

Mary, eres la niña más dulce que conozco gracias por compartir conmigo te quiero mucho muñequita.

A todas ustedes Kary, Mayra, Adela, Alma, Diana, Chío, gracias por su apoyo.

A los muchachones; José, Miguel, Richi, Arturo, Jesús (lic), Fernando, Memo, Mau, Carlos Adan, Edy, Gustavo, Mike y Axel, gracias locos con ustedes compartí las mejores experiencias a lo largo de mi carrera. Especialmente a ti Josue (Der Hund), porque eres el mejor amigo que puedo tener, te quiero mucho, gracias por todos los momentos compartidos.

Gracias amig@s, por toda la enseñanza, diversión y cansancio (Claro, guiño) que vivimos en cada una de las practicas de campo, fue genial compartir tanto con todos ustedes, fuimos un gran equipo y espero que su vida se llene de éxitos, gracias a todo el grupo 52!!.

A los amig@s biólogos de FES:

A los compañeros de servicio, Diana, Estephany, Sergio, Laura, Librado, Maestro Felipe, Raúl, Samuel, gracias por todo.

A mis profesores de la carrera, Angel Lara, Hugo Perales, Ricardo Mejia, Elvia Gallegos, Nicolas, Beto, Angelica, gracias a todos ustedes por la formación académica.

Principalmente agradezco al ñoño más ñoño, por la confianza, la paciencia, los consejos, por ser el mejor profesor que he tenido, porque eres mi amigo y porque sin lugar a dudas eres el más sincero, objetivo y honesto que conozco, gracias por todo, te quiero mucho Dr. Mejia.

A mis compañeros y amigos de CINVESTAV:

Primero que nada agradezco a la mejor amiga que tuve dentro del laboratorio Luisa, gracias por todas esas tardes de trabajo extremo dentro del laboratorio, por las platicas y las comidas sabes que te quiero mucho y muchas gracias por dejarme ser parte de tu familia y regalarnos la sonrisa de MaFer, las quiero mucho.

A Lauris siempre tan loca pero feliz gracias amiga por esos buenísimos momentos en el lab, a Ramón que siempre fue muy objetivo con mi trabajo y sabes ser un muy buen amigo, Ara muchas gracias por todo el apoyo para mi y mi tesis y finalmente a mi amiga Pilar que indiscutiblemente es las personas que más me apoyo desde un principio para mi formación como investigadora, sin ti estaría más que perdida y agradezco a Mariana quien estuvo conmigo en todos esos momentos de experimentos buenos y frustrados, por los consejos y el apoyo muchas gracias neni. Los quiero mucho.

A toda esa gente detrás de cámaras en el departamento de Bioquímica que siempre me apoyo y ayudo en este trabajo: Luz, Rubén, Silvia, Limón, Cristina, Rocío, Chío de biotecnología, Margarita, Claudio, Ale, Lety y Oscar.

A los amigos del curso de Alemán que siempre me echaron porras para culminar este proyecto y que eran mi desestres del lab: Mantisch Karen, Vannya, Alina, Gabriel, Toño y Rox, danke schön Leute, ich Liebe dich.

A toda esta gente bonita que conozco desde hace poco tiempo pero que en momentos de desesperación e ira me han dado un buen consejo y tranquilizan mi ser: José, Julio, Nora, Ramón Moctezuma.

Finalmente quiero mencionar también a este gran amigo que en los últimos 9 años no se ha separado de mi e incondicionalmente me da todo su amor, y que siempre esta dispuesto a regalarme sus mejores momentos, Thomas te quiero mucho.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 17 de transducción de señales del departamento de Bioquímica del CINVESTAV del IPN.

Bajo la tutoría del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

Con el apoyo técnico de la Biol. Judith Hernández y Roberto Arellano.

Agradezco la oportunidad que se me dio de concluir mis estudios profesionales y por el apoyo y tiempo que el Dr. Olivares y su equipo me brindaron durante la realización de este proyecto. Gracias Dr. Olivares y Ju por siempre estar al pendiente de mí.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Fondo Sectorial SEP/CONACYT (clave 48777) y por el programa de Becas de Educación Superior PRONABES con el número de folio 20100054828.

Muchas gracias por el apoyo económico brindado por la Fundación Rivera Valencia y por FABOKI INDUSTRIAL S.A de C.V gracias a ello pude concluir este proyecto.

Índice

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
2.1 Síntesis de la Insulina.....	3
2.2 Insulina y sus acciones fisiológicas.....	4
a) Principales efectos de la insulina en el metabolismo.....	5
2.3 El Receptor de Insulina.....	7
2.4 Vías de Señalización de la Insulina.....	9
a) Vía de Señalización de la PI3K.....	9
b) Vía de Señalización de las MAP Cinzas.....	11
2.5 Ácido Lisofosfatídico (LPA).....	12
2.6 Receptores para LPA y sus Análogos.....	14
2.7 Transactivación de RTKs.....	18
III. Antecedentes	20
IV. Justificación e Hipótesis	21
V. Objetivos	22
VI. Materiales y Métodos	23
a) Cultivo celular.....	23
b) Detección de Proteínas por Western Blot.....	23
c) Análisis Estadístico de Resultados.....	26
VII. Resultados	27
7.1 La insulina induce la activación de Akt.....	27

7.2 La insulina tiene un efecto dependiente de la concentración en la activación de Akt Ser473.....	30
7.3 El LPA induce la activación de Akt.....	31
7.4 El LPA tiene un efecto dependiente de la concentración sobre la activación de Akt Ser473.....	33
7.5 El LPA incrementa la fosforilación de Akt inducida por insulina.....	34
7.6 La fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA puede estar regulada por la transactivación de los Receptores IR y EGFR.....	36
7.7 El antagonista VPC 32183 bloquea de manera parcial al LPA a diferentes tiempos.....	38
7.8 La insulina induce la activación de ERK1/2.....	39
7.9 El LPA induce la activación de ERK1/2.....	41
7.10 El LPA incrementa la fosforilación de ERK1/2 inducida por insulina.....	42
VIII. Discusión.....	43
IX. Conclusiones.....	47
X. Bibliografía.....	48

Figuras y Tablas

Página

- **Introducción**

Figuras

1. Molécula de proinsulina humana.....	3
2. Estructura molecular de la insulina.....	4
3. Células diana de la insulina.....	5
4. Estructura del receptor de insulina (IR): dominios funcionales del receptor.....	8
5. Activación de la vía PI3K/Akt.....	10
6. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina.....	12
7. Estructura química del Ácido Lisofosfatídico.....	14
8. Ciclo de activación de proteínas G por GPCRs.....	16
9. Rutas de señalización activadas por los receptores del LPA.....	17
10. Mecanismos de transactivación de RTKs por receptores acoplados a proteínas Gq y Gi.....	18

- **Materiales y Métodos**

Figuras

11. Células C9.....	23
---------------------	----

Tablas

1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios.....	25
--	----

- **Resultados**

Figuras

12. Fosforilación de Akt inducida por insulina.....	28
13. Ensayo dosis-respuesta en la activación de Akt Ser473 con insulina...	30

14. Fosforilación de Akt inducida por LPA.....	31
15. Ensayo dosis-respuesta en la activación de Akt Ser473 por LPA.....	33
16. Efecto del LPA en la fosforilación de Akt Ser473 inducido por insulina.....	34
17. Efecto del LPA en la fosforilación de Akt Thr308 inducido por insulina.....	35
18. La fosforilación de Akt Ser473 puede estar regulada por la transactivación de los receptores IR y EGFR.....	37
19. Participación del antagonista VPC 32183 en la fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA.....	38
20. Fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 por insulina.....	40
21. Fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 por LPA.....	41
22. Efecto del LPA en la fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 inducido por insulina.....	42

Abreviaturas

AC	Adenilato Ciclasa
Akt/PKB	Proteína Cinasa B *
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CREB	Proteína de Unión al Elemento de Respuesta al AMP Cíclico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico *
EGFR	Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico *
ERK	Cinasa Reguladora de Señales Extracelulares *
FBS	Suero Fetal Bovino *
GEF	Factor Recambiador de Nucleótidos de Guanina *
GPCR	Receptor Acoplado a Proteínas G *
Grb2	Proteína 2 de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento *
GSK3	Cinasa Glucógeno Sintasa 3 *
iNOS	Sintasa de Oxido Nítrico Inducible *
IR	Receptor de Insulina *
IRS-1	Sustrato del Receptor de Insulina *
LPA	Ácido Lisofosfatídico *
LPL	Lisofosfolípidos *
MAPK	Cinasa de Proteínas Activadas por Mitógenos *
MEK	Cinasa de MAPK *
MEKK	Cinasa de la proteína MEK *
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas *
PH	Dominio de Homología a Pleckstrina *
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa *
PI4-P	Fosfatidil-Inositol 4 Fosfato *
PI4, 5-P₂	Fosfatidil-Inositol 4,5-bifosfato *
PIP₂	Fosfatidil-Inositol 3,4-bifosfato *
PIP₃	Fosfatidil-Inositol 3,4,5-trifosfato *
PKF2	Fosfofructosinasa 2 *
PKC	Proteína Cinasa C *
PLC	Fosfolipasa C *
PTB	Dominio de Unión a Fosfotirosinas *
PTX	Toxina Pertussis *
RTKs	Receptores con actividad de Cinasa de Tirosina *
S1P	Esfingosina 1-Fosfato *
SH2	Dominio con Homología a Src2 *
Shc	Proteína con Homología a Src y parecida a la colágeno *

* Por sus siglas en inglés

I. Resumen

La principal función de la insulina es regular la homeostasis de la glucosa. Esta labor implica mecanismos moleculares complejos que controlan la captación, el metabolismo de la glucosa y la gluconeogénesis en estados sensibles a la insulina. En individuos normales este esquema se establece por valores altos de glucosa en plasma que desencadenan la secreción de insulina por las células beta del páncreas. El aumento resultante en los valores de la hormona en la circulación sanguínea inhibe la producción hepática de glucosa y estimula un aumento en la captación y el almacenamiento de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, normalizando de esta manera los valores de glucosa. Todos estos procesos están mediados por la activación de dos principales vías de señalización PI3K/Akt y MAPK. La insulina es una hormona y su receptor pertenece a la familia de receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs). El LPA es un derivado de fosfolípidos y sus receptores pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), su principal función está relacionada con la supervivencia y proliferación celular, activando diferentes vías de señalización. Poco es lo que se sabe de su participación en la regulación metabólica. Por tal motivo, en el presente trabajo se pretende determinar los posibles mecanismos por los cuales el LPA podría participar en la regulación de la vía de señalización de insulina. Para ello, se utilizaron células C9 de epitelio de hígado de rata, las cuales expresan de manera endógena 3 receptores para LPA (LPAR), donde se encontró que tanto el LPA como la insulina activan a las dos vías de señalización de insulina PI3K/Akt, al fosforilar los dos residuos de activación la Ser473 y la Thr308, la respuesta es dependiente del tiempo y la concentración. Al parecer el LPA tiene un efecto aditivo sobre las vías de señalización de la insulina, sin embargo, tenemos evidencia que sugiere que el LPA podría estar sensibilizando a las vías PI3K/Akt y MAPK. Además, se observó que la vía de las MAPK también es activada por insulina y LPA, llevando a cabo sus efectos en la fosforilación de ERK1/2. Se observó que los receptores IR y EGFR son transactivados por LPA.

II. Introducción

A finales del siglo XIX la diabetes ya era considerada como una enfermedad que afecta a nivel mundial, esta es razón suficiente, por la cual numerosos médicos iniciaron una serie de investigaciones que los llevaron a descubrir la insulina y la relación que tiene con la diabetes.

En 1868 Paul Langerhans descubrió unas ramificaciones celulares en el páncreas pero ignoraba la función de estas células, y en 1893 Edouard Laguesse denominó a estas ramificaciones celulares como islotes de Langerhans. Sharper-Schafer descubrió que la sustancia que estos islotes secretaban, controlaba el metabolismo de los carbohidratos, es decir que el páncreas participa en transformar en energía el azúcar que se ingiere con los alimentos. Cuando se reduce la producción de esta sustancia por mal funcionamiento de esta glándula, aumenta la cantidad de glucosa en sangre y se produce la hiperglucemia, provocando serios trastornos que atacan la salud (Goodman *et al.*, 2001).

Esta importantísima sustancia, fue aislada en 1921 por los científicos canadienses, Frederick Banting, Charles Best y James Macleod, quienes le dieron el nombre de insulina y en 1923 recibieron el Premio Nobel de Medicina por este descubrimiento (Goodman *et al.*, 2001).

Actualmente, la insulina es una de las hormonas polipeptídicas mejor estudiadas. Fue la primera cuya secuencia completa de aminoácidos se estableció y la primera hormona sometida a clonación molecular.

2.1 Síntesis de la Insulina.

La insulina es sintetizada como molécula precursora, proinsulina, la cual consta de un péptido señalizador hidrofóbico N terminal de 24 aminoácidos, seguido por la cadena B de la insulina, 31 aminoácidos del péptido C y la cadena A de la insulina. El péptido señalizador de la proinsulina tiene la estructura típica de una proteína recién sintetizada que va a entrar en la vía secretora de las células eucarióticas; facilita la transposición de la proinsulina desde el citoplasma (donde se inicia la biosíntesis), a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso. La eliminación del péptido señalizador de proinsulina ocurre a medida que el péptido recién sintetizado es transportado hacia el retículo endoplásmico rugoso, se pliega espacialmente y experimenta sulfo-oxidación, apareciendo dos puentes disulfuro en la molécula generando la molécula precursora, proinsulina. Se considera que la fracción del péptido C de la proinsulina ayuda a corregir la alineación estructural y el enlace disulfuro de las cadenas A y B de la insulina (Steiner, 1990; Galloway 1992).

La región del péptido C de la proinsulina (figura 1) tiene una longitud variable en los vertebrados superiores y modifica poco la estructura secundaria, de manera que la disposición de la proinsulina semeja mucho a la de la insulina. Sin embargo, la flexibilidad del péptido C indica que tiene la capacidad de interactuar con la superficie de las cadenas A y B de la insulina, lo cual tal vez explica la reducida actividad biológica de la proinsulina.

El principal sitio para el procesamiento de la molécula proinsulina hasta la insulina, biológicamente activa, es el compartimiento de gránulos inmaduros de la célula beta.

La conversión de proinsulina ocurre en este compartimiento como parte del proceso de maduración del gránulo secretorio.

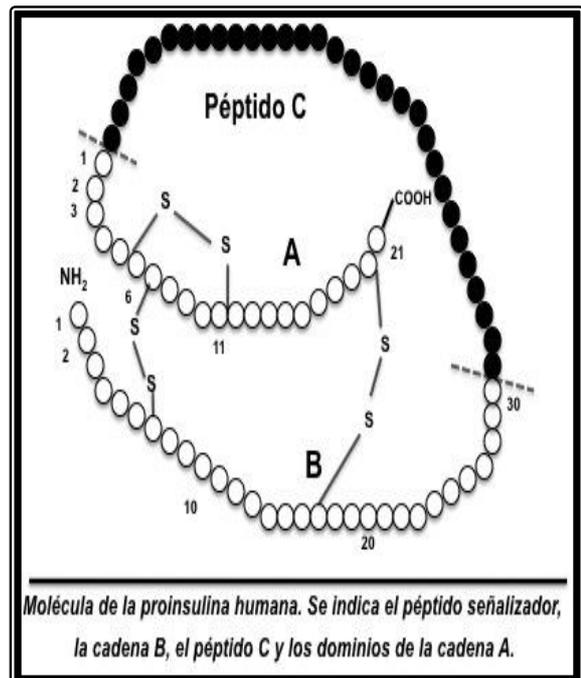


Figura 1. Molécula de proinsulina humana. Imagen tomada de www.my-personaltrainer.it/peptideC.gif

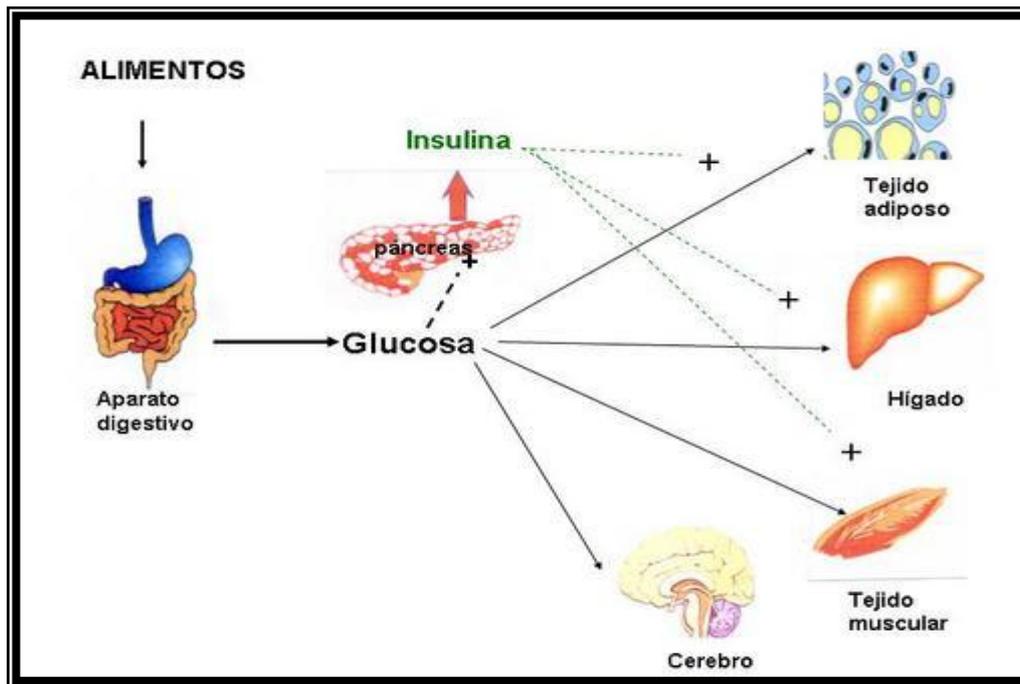


Figura 3. Células blanco de la insulina. Después de la ingesta de alimentos, en el organismo, la glucosa viaja en el torrente sanguíneo como una señal que va hacia el páncreas, indicando que la glucosa circundante se ha elevado, esta señal sirve para que el páncreas libere insulina la cual al unirse a su célula blanco activa las diferentes vías de señalización para insulina. imagen tomada de http://mono_obeso.typepad.com

a) Principales efectos de la insulina en el metabolismo.

Efectos ejercidos en el metabolismo de carbohidratos:

- Aumenta la rapidez de transporte de glucosa a través de la membrana celular en el tejido adiposo y en el músculo.
- Aumenta la tasa de glucólisis en el tejido muscular y adiposo.
- Estimula la tasa de síntesis de glucógeno en diversos tejidos, lo que incluye tejido adiposo, músculo e hígado. También disminuye la tasa de degradación de glucógeno en músculo e hígado.
- Inhibe la tasa de glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado.

La insulina ejerce los siguientes efectos en el metabolismo de los lípidos:

- Inhibe la tasa de lipólisis en tejido adiposo y de ahí que reduzca la concentración de ácidos grasos en plasma.
- Estimula la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol en tejido adiposo e hígado.

-
- Aumenta la actividad de la lipasa de lipoproteína en el tejido adiposo, lo cual incrementa la captación de triglicérido de la sangre hacia tejido adiposo.
 - Disminuye la tasa de oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado.

La insulina tiene los siguientes efectos en el metabolismo de las proteínas:

- Aumenta la rapidez de transporte de algunos aminoácidos hacia músculo, tejido adiposo, hígado y otras células.
- Incrementa la tasa de síntesis de proteína en músculo, tejido adiposo, hígado y otros tejidos.
- Reduce la tasa de degradación de proteína en músculo.
- Disminuye la tasa de formación de urea.

La captura de glucosa inducida por la insulina sucede, principalmente, en células de músculo esquelético y tejido adiposo; es un proceso regulado, en donde la insulina activa vías de señalización que inducen la translocación del transportador de glucosa (Glut4) de compartimientos intracelulares a la membrana plasmática, proceso que depende de la regulación negativa de AS160 por fosforilación mediada por Akt, aumentando el tráfico de Glut4 dependiendo de Rab en músculo esquelético (McCarthy and Elmendorf, 2007).

En adipocitos, adicionalmente a esa vía de señalización, se ha descrito una vía alterna que involucra a la proteína Cbl y a las proteínas adaptadoras APS y CAP. El complejo proteico formado por APS/CAP/Cbl, después de la activación del IR, se disocia del IR y localiza en los dominios celulares llamados balsas lipídicas a través de la interacción con la flotilina, en donde Cbl recluta al complejo proteico CrKII-C3G. C3G activa a la proteína TC10, la cual parece translocar a Glut4 (McCarthy and Elmendorf, 2007; Saltiel and Kahn, 2001).

En hígado, se ha considerado que el transporte de glucosa es facilitado por el transportador de baja afinidad Glut2, que no depende de la insulina; sin embargo, evidencias recientes sugieren que la insulina también está involucrada en la regulación de la incorporación hepática de glucosa, promoviendo la transcripción a corto plazo de la enzima glucocinasa (enzima que cataliza la fosforilación de glucosa dependiente de ATP para formar glucosa-6-fosfato) (Iozzo *et al.*, 2003).

Además, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa por la activación de dos mecanismos de señalización: uno que involucra la activación de IR y FOXO1 y una nueva vía que involucra la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP en la membrana de las neuronas en el hipotálamo, lo que resulta en la transmisión de señales del nervio vago al hígado que en la producción de glucosa hepática (Gribble, 2005)

En hígado la insulina favorece la síntesis de glucógeno, inhibe la conversión de ácidos grasos y aminoácidos a cetoácidos, incrementa la actividad de la piruvato cinasa, la fosfofructocinasa y la glucoquinasa e inhibe a las enzimas gluconeogénicas; la piruvato carboxilasa, fosfoenolpirúvico-carboxicinas, a la fructosa-difosfatasa y a la glucosa-6-fosfatasa, por lo que la acción de la insulina en el hígado es fundamental en la regulación del metabolismo de la glucosa y nutrientes como ácidos grasos y proteínas (Arellano, 2008).

Clásicamente la acción de la insulina se refiere específicamente a la utilización de glucosa mediada por insulina, y los defectos que acompañan a la acción de la insulina se asocian con la obesidad y a la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Sin embargo, la insulina interviene en una amplia gama de rutas celulares y la acción de la insulina varía según la ruta y el tejido (Stacy *et al.*, 2009).

2.3 El Receptor de Insulina.

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTKs), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (Myers and White, 2002).

En su conformación nativa, el receptor de insulina consta de dos subunidades alfa (135kDa) y dos subunidades beta (95kDa) ligadas en forma covalente a través de enlaces disulfuro para formar un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (LeRoith, 2003).

Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular donde se localiza el dominio con actividad de cinasa Tyr. En la región intracelular, se han identificado tres regiones

estructurales que incluyen: 1) región yuxtamembranal intracelular, que parece ser importante en la transmisión de la señal y en donde se localizan las tirosinas Tyr 965 y Tyr 972 (Ebina *et al.*, 1985); 2) región reguladora en donde se encuentran las tirosinas Tyr 1158, Tyr 1162 y Tyr 1163. La autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad de cinasa del receptor y 3) región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Tyr 1328 y Tyr 1334) que, al parecer puede desempeñar un importante papel regulador pero no en la señalización del receptor (Figura 4) (Myers and White, 2002).

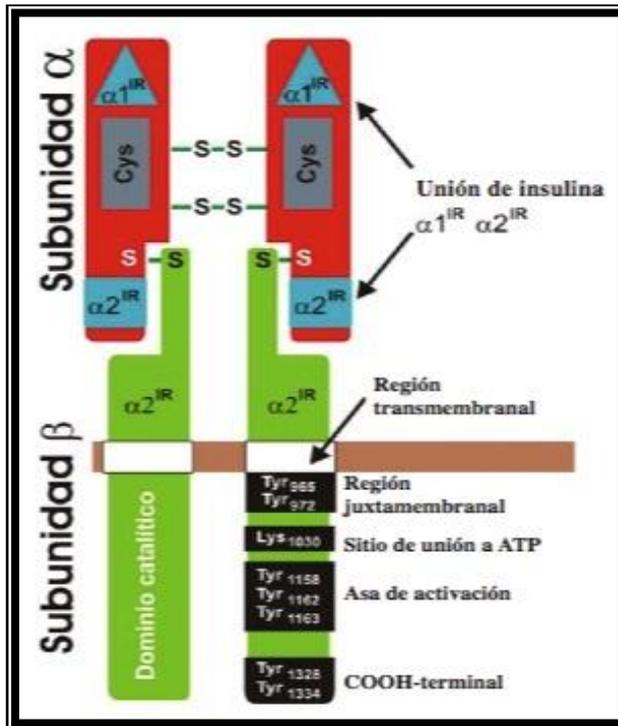


Figura 4. Estructura del receptor de insulina (IR): dominios funcionales del receptor. El IR es un heterotetrámero que consiste en dos subunidades α extracelulares unidas a dos subunidades β por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina $\alpha 1^{IR}$ y $\alpha 2^{IR}$ en adición a una región rica en cisteínas. La subunidad β contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. En su porción intracelular se localiza un dominio catalítico de cinasa de tirosina con un sitio de unión a ATP y sitios de fosforilación de tirosina que se localizan en la región juxtamembranal (Tyr965, Tyr972), asa de activación (Tyr 1158, Tyr1162 y Tyr1163) y carboxilo terminal (Tyr1328, Tyr1334) (Imagen tomada de Olivares, R., Arellano, P., 2008).

En condiciones de no estímulo, las subunidades α ejercen un papel regulador sobre las subunidades β , inhibiendo la capacidad del receptor para autofosforilarse. Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de Tyr. El mecanismo de autofosforilación parecen darse por procesos de cis- y trans-autofosforilación, donde ciertos residuos son fosforilados por la actividad de fosfotransferasa de la misma subunidad β (cis-), mientras que otros son sustrato de la actividad de cinasa de la subunidad β opuesta (trans-) (Olivares y Arellano, 2008). Además, estudios recientes han reportado que se requiere de al menos siete sitios de fosforilación en Tyr en el IR y de la actividad enzimática de cinasa de Tyr para el apropiado funcionamiento del receptor (Youngren, 2007).

2.4 Vías de Señalización de la Insulina.

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de interacciones proteicas. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y por la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de defectos mitogénicos (Avruch, 1998; Myers and White, 2002).

a) Vía de señalización de la PI3K

La vía de PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. La transducción de señales a través de la vía de PI3K, se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con el sustrato del receptor de insulina (IRS) y lo fosforila. Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo.

Adicionalmente, los IRSs contienen entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación (en función del tipo de IRS, de los cuales se conocen 4 isoformas, IRS-1 a IRS-4), que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras, como es el caso de PI3K, Grb2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), Crk II, SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src), entre muchas otras (Virkamaki *et al.*, 1999).

Las PI3Ks son heterodímeros que constan de una subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β o p55^{PIK}) y de la subunidad catalítica (p110 α , p110 β o p110 δ). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales permiten su unión a las proteínas IRS-1. La interacción entre ambas proteínas provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora (p85), dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K (p110). En consecuencia, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-

fosfato) y PI4,5-P₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos PIP₂ (PI3,4-bisfosfato) y PIP₃ (PI3,4,5-trisfosfato), respectivamente (Figura 5) (Olivares y Arellano, 2008).

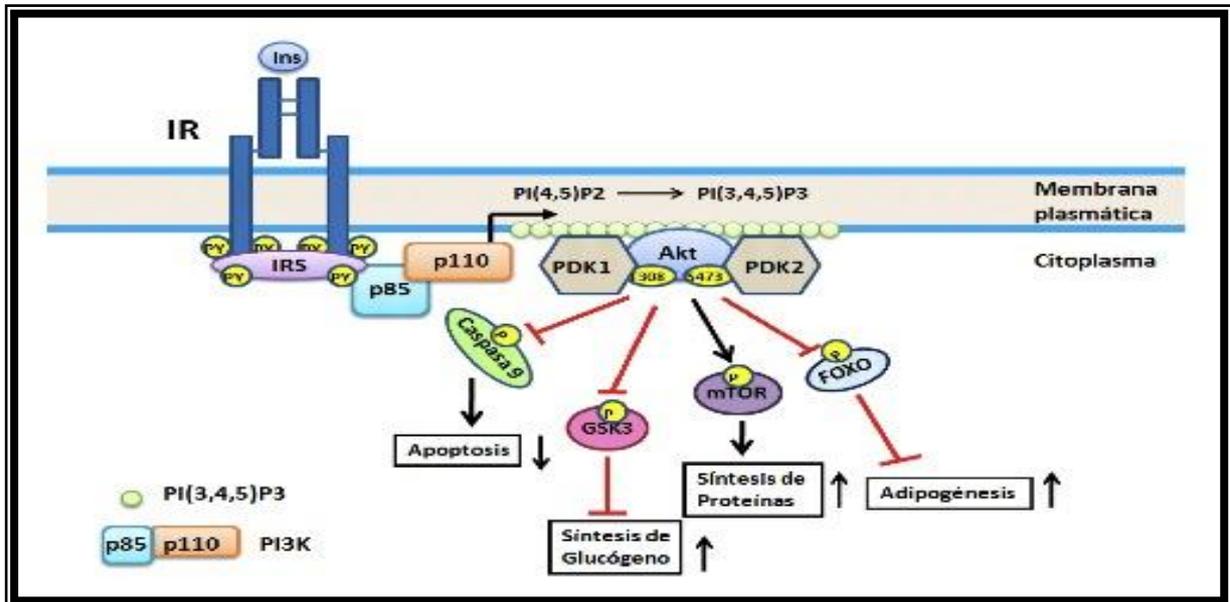


Figura 5. Activación de la vía de PI3K/Akt. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de tirosina (Y) que al ser fosforilado por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P₂, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P₃, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en Ser473 que es seguida por una fosforilación en Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta (Imagen tomada de Olivares y Arellano, 2008).

El PIP₃ sirve como sitio de unión para cinasas de Ser (serina) como a la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) y Akt o proteína cinasa B (PKB) (Engelman, 2006). En el caso de la cinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es fosforilada en dos residuos, la Ser473 y la Thr308. La fosforilación en la Ser473 ocurre primero por acción del complejo proteico mTor/Rictor, también conocido como PDK2. Esta fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr308, estas dos fosforilaciones son importantes para que Akt se active completamente (McCarthy and Elmendorf, 2007).

Existen 3 isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales la isoforma 2 parece ser la que juega un papel importante en la incorporación de la glucosa inducida por la insulina. La enzima Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina al fosforilar una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo a la enzima

glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), a la fosfofructocinasa 2 (PFK2), a la proteína de unión al elemento respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD) (Myers and White, 2002). Entre estos destaca la fosforilación e inactivación de la proteína GSK3 (Myers and White, 2002; Engelman, 2006), una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucogeno sintasa; la inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno (Virkamaki *et al.*, 1999).

La cascada de la PI3K incluye a otras cinasas de Ser que median la respuesta de la insulina, incluyendo a mTOR la cual regula la síntesis a través de las vías de p70S6K/S6 y 4EBP1/eIF4 (Virkamaki *et al.*, 1999; Engelman, 2006).

b) Vía de señalización de las MAP cinasas.

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente por activación de la vía de las MAP cinasas (Figura 6). La fosforilación en residuos Tyr del dominio citoplasmático del IR, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que, lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK (también llamada cinasa de MAP cinasa) y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente 1) y ERK2. Alternativamente a esta vía de señalización que activa ERK1 y ERK2 (conocidas genéricamente como MAP cinasas), la insulina puede activar a estas proteínas por una vía independiente de Shc, pero que depende de la activación del IRS. Una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc (Olivares y Arellano, 2008). Las MAP cinasas tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina, pero no en la regulación del transporte glucosa (Virkamaki, *et al.*, 1999; Avruch, 1998)

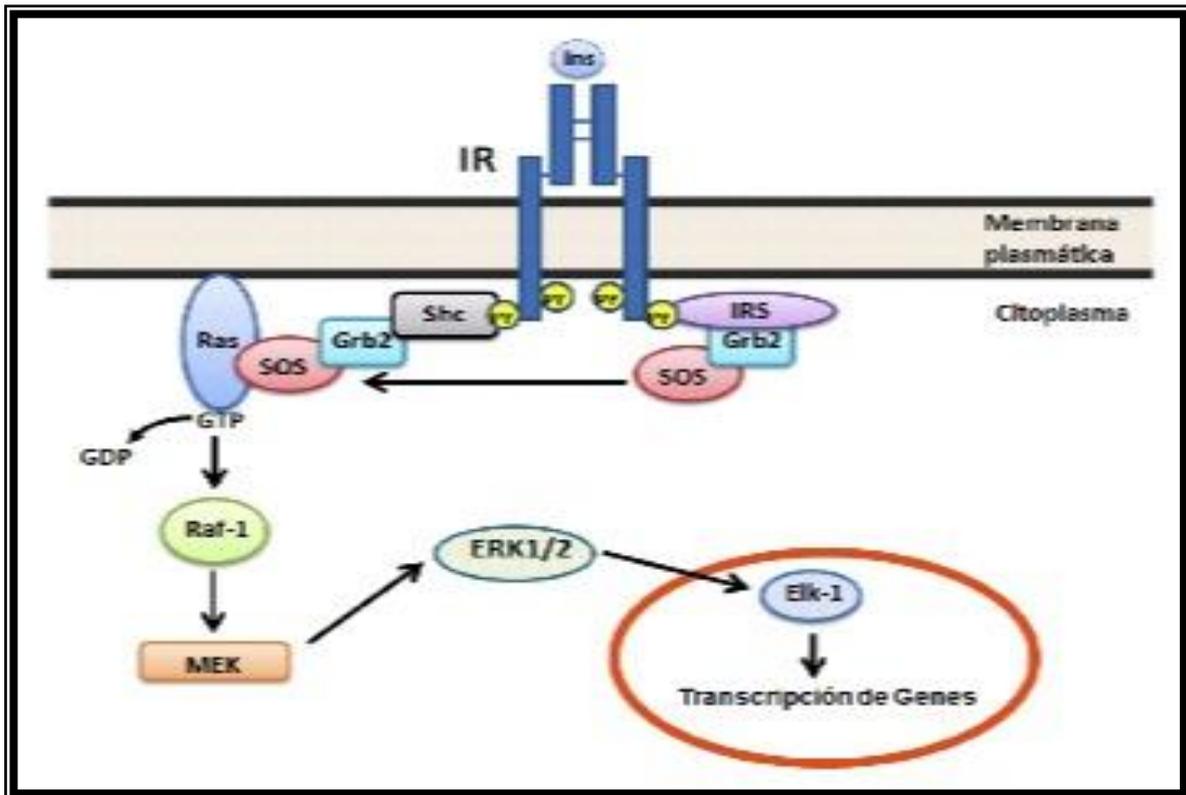


Figura 6. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Alternativamente existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación de IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPK's. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de las proteínas es la misma que se describió para Shc (Olivares y Arellano, 2008).

Las ERKs pertenecen a una subfamilia de MAPK, una familia conservada de cinasas de serina/treonina, que están compuestas de cinasas de 42 y 44-kDa (ERK1/2). Estas cinasas están involucradas en la regulación de programas celulares importantes, como: proliferación, diferenciación, movimiento celular y sobrevivencia celular. Además, pueden regular procesos como plasticidad sináptica (Sweatt, 2004; Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Dado que MEK es la cinasa de ERKs (o MAPKs), también se le identifica como MAPKK (cinasa de MAPKs). De manera análoga, como Raf es la cinasa de MEK (o MAPKK), también se le denomina MPKKK (cinasa de la cinasa de MAPKs) (Sánchez y Arias, 2004).

2.5 Ácido Lisofosfatídico (LPA).

Los lisofosfolípidos (LPL) son metabolitos que están presentes en los seres vivos, pudiendo desempeñar una doble función. Por un lado, forman parte de la síntesis de fosfolípidos de membrana y a la vez, pueden actuar como moléculas bioactivas capaces de activar una amplia variedad de procesos biológicos a través de receptores específicos acoplados a proteínas G (GPCR). Los lisofosfolípidos mejor caracterizados que intervienen en procesos de señalización son el LPA y la esfingosina 1-fosfato (S1P) (Romero, 2010).

La amplia expresión de receptores LPL, acoplados a una gran variedad de proteínas G, permite la regulación de múltiples procesos celulares de relevancia fisiológica, destacando por su impacto, en la neurogénesis, esquizofrenia, dolor neuropático, desarrollo vascular, implantación del óvulo, protección cardiovascular, fibrosis, cicatrización de heridas, inmunidad y cáncer (Mu-En *et al.*, 2010).

El LPA es un fosfolípido de señalización implicado en numerosas acciones biológicas. Su estructura es la de un lípido simple que tiene un grupo fosfato, una molécula de glicerol y una cadena de ácido graso saturado o insaturado, denominándose genéricamente monoacil-sn-glicerol-3-fosfato (Figura 7) (Tokumura, 1995; Moolenaar *et al.*, 2004; Tigyi, 2003).

Aunque su estructura es simple, actúa como mediador lipídico intracelular a través de sus receptores y está implicado en múltiples respuestas en una gran variedad de tipos celulares, y que incluyen proliferación celular, inhibición de apoptosis, migración celular, diferenciación, liberación de citocinas y quimiocinas, agregación plaquetaria, contracción de la musculatura lisa y retracción de neuritas, entre otras. (Chun, *et al.*, 2002; Moolenaar, *et al.*, 2004; Rivera and Chun, 2008).

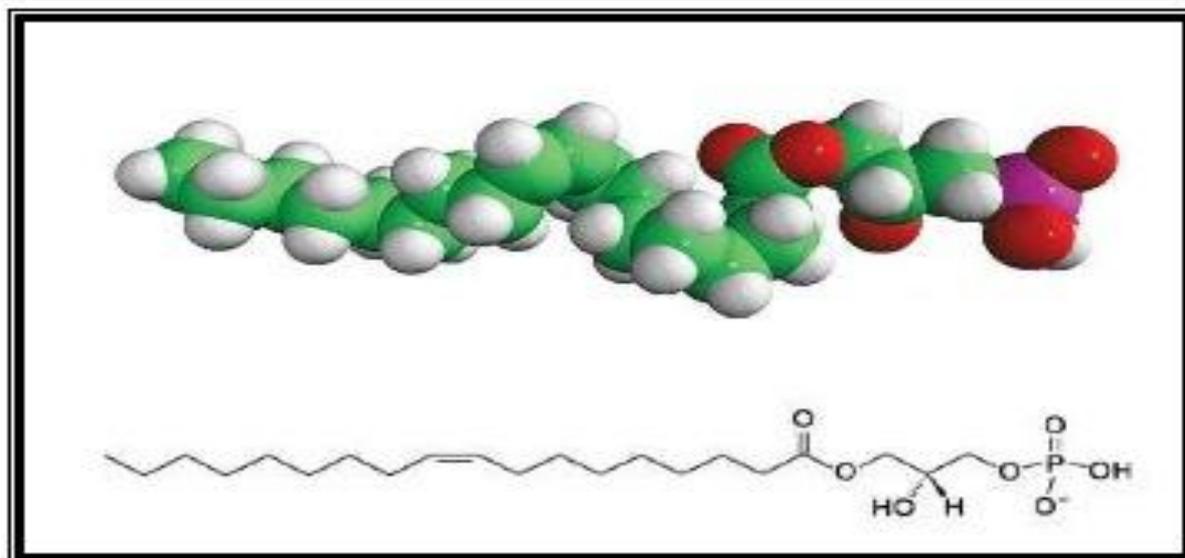


Figura 7. Estructura química del LPA. Su estructura es la de un lípido simple con un grupo fosfato, una molécula de glicerol y una cadena de ácido graso saturado o insaturado, denominándose genéricamente monoacil-sn-glicerol-3-fosfato

Existe una extensa lista de actividades del LPA, debido a la gran variedad de proteínas G a las que puede acoplarse para iniciar su ruta de señalización (Moolenaar, 1999). Puede encontrarse en cantidades significativamente detectables (nivel $\sim \mu\text{M}$) en numerosos fluidos biológicos, como suero (Baker *et al.*, 2000; Sano *et al.*, 2002), saliva (Sugiura *et al.*, 2002), fluido seminal (Hama *et al.*, 2002), fluido folicular (Tokumura *et al.*, 1999). De todos ellos el suero es la fuente de LPA mejor caracterizada (Aoki *et al.*, 2002).

Se conocen hasta el momento dos vías principales de producción del LPA: suero y plasma (también en adipocitos). El LPA es generado principalmente a partir de lisofosfolípidos (LPL) en plaquetas; por otro lado, en células cancerígenas el LPA es producido a partir de ácido fosfatídico. Sin embargo, la cantidad de LPA producido desde ácido fosfatídico parece ser mucho más baja, a causa de que éste es un componente minoritario de los fosfolípidos en muchos tipos de células. No obstante, esta ruta puede resultar muy importante ya que genera LPA rápidamente como respuesta a varios estímulos (Romero, 2010).

2.6 Receptores para LPA y sus análogos

EL LPA que es detectado en suero y producido por las plaquetas y consiste en una mezcla de varios ácidos grasos. Existen varios LPA con ácidos grasos saturados (esteárico, palmítico) o insaturados (oleico, linoleico, araquidónico) (Baker *et al.*, 2001; Gerrard and Robinson, 1989).

Estos diferentes ácidos grasos pueden unirse a las posiciones sn-1 o sn-2 del glicerol, por tanto, *in vivo* pueden estar presentes variedades moleculares de LPA y lípidos similares o análogos a LPA (Fischer *et al.*, 1998; Romero, 2010). Sin embargo, estos LPA presentan actividades biológicas distintas, posiblemente porque activan de manera diferente a cada uno de los receptores de LPA (LPARs que van del 1 al 5) (Bandoh *et al.*, 2000). La relación estructura-actividad de estas moléculas de LPA y sus análogos depende de la célula y el tejido (Gueguen *et al.*, 1999).

Los LPARs pertenecen a la súper familia de receptores de siete dominios transmembranales, también llamados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los GPCRs se han clasificado en tres familias con base en la homología en su secuencia de aminoácidos (Kolakowski, 1994).

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 un 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 heterotrimérica. Esta interacción cataliza el recambio del 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 potasio (Figura 8).

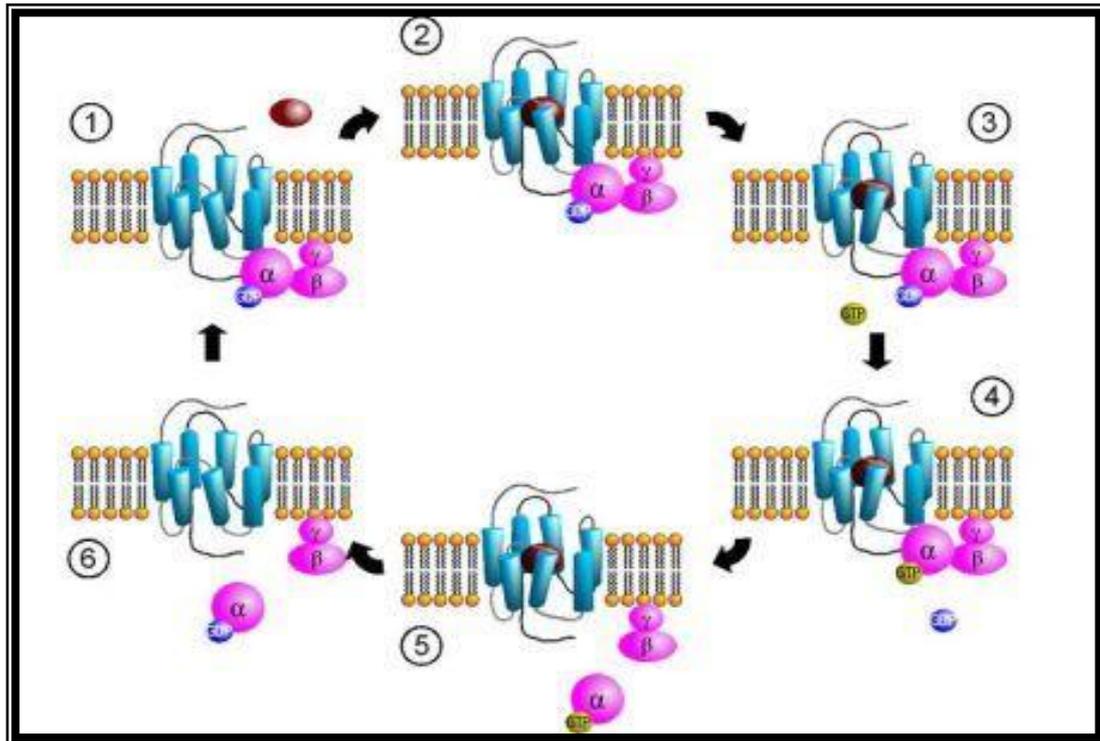


Figura 8. Ciclo de activación de proteínas G por GPCRs. (1) unión de la proteína G. (2) unión del ligando. (3) activación del receptor. (4) activación de la proteína G. (5) disociación de la proteína G y transducción de señales. (6) inactivación de la proteína G. (http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelter_Rezeptor).

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 su 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).

Los LPARs (Figura 9), pueden estar acoplados a diferentes miembros de las subfamilias de las proteínas G: LPAR₁ y LPAR₂ son conocidos por interactuar con las subfamilias Gi, Gq y G_{12/13}, el LPAR₃ interactúa con Gi y Gq, LPAR₄ interactúa con Gq, Gs y G_{12/13} y hasta el momento se sabe que LPAR₅ interactúa con Gq y G_{12/13} (Mu-En, 2010).

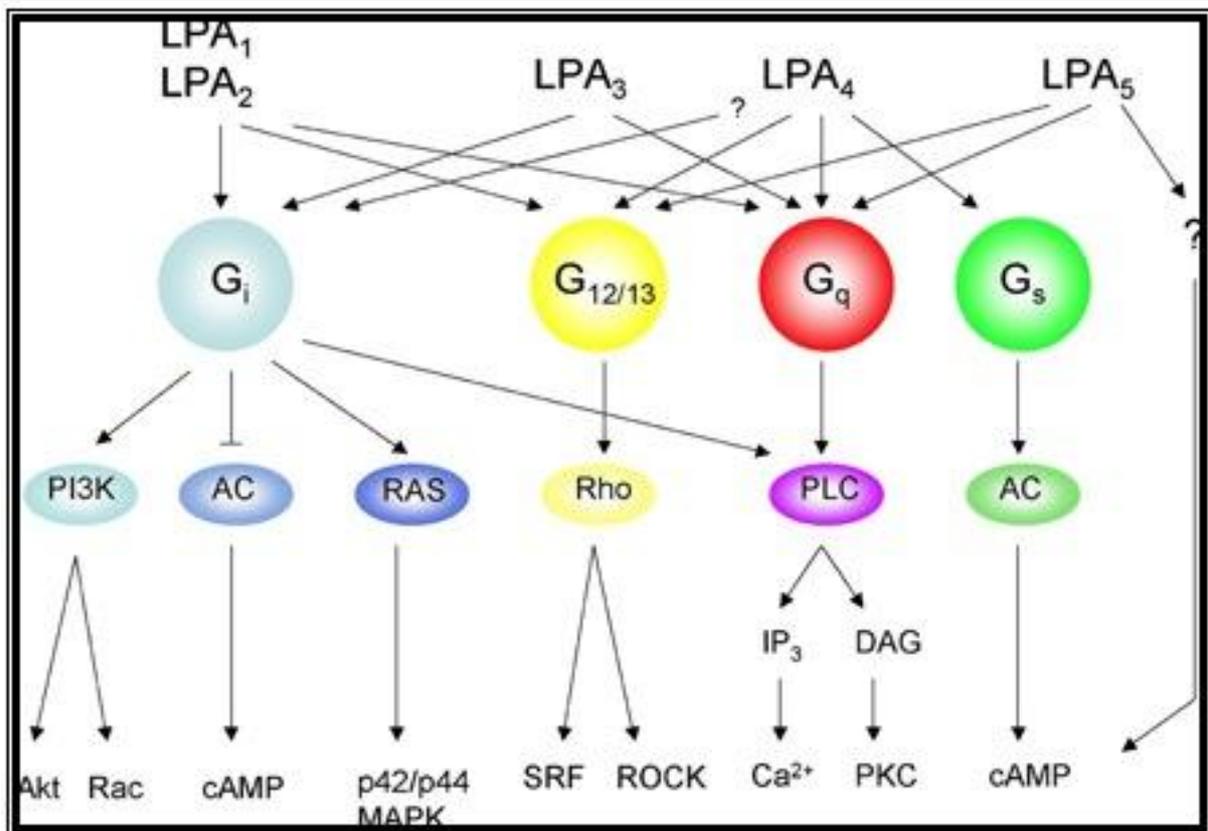


Figura 9. Rutas de señalización activadas por los receptores del LPA. (imagen tomada de Mu-En et al., 2010).

En estos receptores, la unión del ligando a su receptor le causa un cambio conformacional, induciendo la correspondiente respuesta de la proteína G.

- I) Activación de Rho vía G_{12/13}.
- II) Activación vía G_q de la fosfolipasa C (PLC) con subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) y movilización de calcio.
- III) Activación G_i, mediada por las GTPasas Ras, con cambio en la actividad de MAPK, o bien, por activación de PI3K con subsiguiente activación de Akt Ser (serina) y Thr (treonina), ambas con consecuencias en la proliferación, supervivencia y apoptosis.
- IV) Inhibición/activación vía G_s, de la adenil ciclasa (AC) resultando en la activación de la acumulación de AMPc y la movilización de calcio.

Se ha descrito recientemente que para la línea celular de epitelio de hígado de rata C9 se encuentran tres diferentes tipos de LPARs (LPAR₁, LPAR₂ y LPAR₃) (González et al., 2008).

2.7 Transactivación de RTKs.

Como se mencionó, las respuestas celulares mitogénicas son generadas principalmente por estimulación de RTKs que activan la vía Ras-Raf-MEK-ERK, la cual ha sido ampliamente estudiada hasta hace una década, conociéndose sólo que el mecanismo involucraba proteínas G sensibles a la toxina de *Bordetella pertusis* (Gi/o), y que dependía fuertemente del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G y de cinasas de tirosina no identificadas (van Corven *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1994; Koch, *et al.*, 1994). No obstante, tan sólo un par de años después el número de investigaciones orientadas a este tópico creció significativamente y varios estudios indicaron que en ausencia de ligandos para RTKs, la activación de Gq (GPCRs-Gq) inducía la fosforilación de la proteína Shc y la formación del complejo Shc-Grb2 (Cazaubon *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Sadoshim and Izumo, 1996), siendo ambas proteínas adaptadoras involucradas en la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK a través de su unión a las fosfotirosinas de un RTK activado, sugiriendo que el RTK había sido activado sin necesidad de interactuar con su ligando (Figura 10) (Sánchez y Arias, 2004)

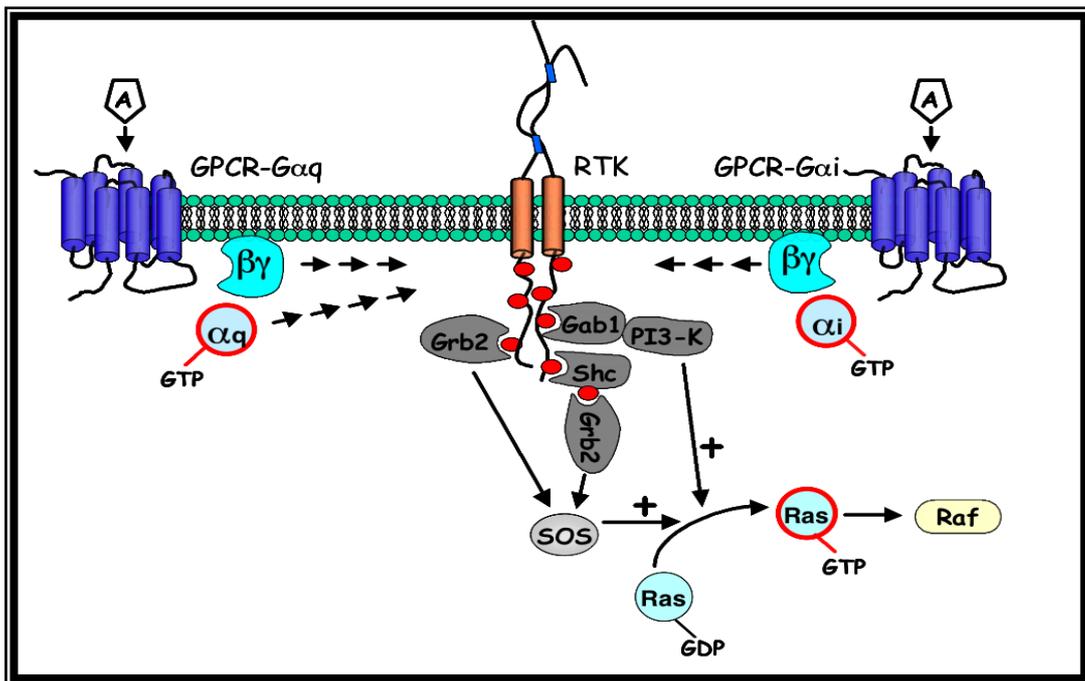


Figura 10. Mecanismos de transactivación de RTKs por receptores acoplados a proteínas Gq y Gi. La activación de proteínas Gq induce transactivación de RTKs a través de procesos mediados tanto por la subunidad q como el complejo $\beta\gamma$, mientras que los receptores acoplados a proteínas Gi inducen la transactivación sólo a través de los complejos $\beta\gamma$. Una vez que el RTK se autofosforila, la cascada de señalización es idéntica a la que seguiría un RTK activado por ligando, con la unión de proteínas que posean dominios SH2 a las fosfotirosinas del receptor y la activación subsiguiente de la vía Ras-Raf-MEK-ERKs (Sánchez y Arias, 2004).

La activación de un RTK en ausencia de su ligando respectivo no era un concepto completamente nuevo. Anteriormente los grupos de Greenberg, de Rahmsdorf, de Kruijer y de Herrlich, entre otros, habían mostrado que el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) podía ser regulado al activarse canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Rosen and Greenberg, 1996), y que el EGFR, los receptores para insulina y para el factor de crecimiento derivado de plaquetas eran activados por la radiación ultravioleta (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996). Sin embargo, el hallazgo de que los GPCRs, la familia más grande de receptores membranales, podía inducir la activación de los RTKs y por lo tanto generar señales mitogénicas, condujo a una oleada de trabajos enfocados en los puntos clave de este fenómeno, denominado ahora transactivación (Sánchez y Arias, 2004).

III. Antecedentes

Cuando insulina activa a la vía de señalización PI3K/Akt , lo hace de manera dependiente del tiempo y concentración en la línea celular C9, fosforilando a Akt en sus dos residuos Ser473 en el dominio del carboxilo terminal y Thr308 en el asa de activación, aunque la temporalidad de fosforilación fue diferente para cada residuo se evaluó que al estar estos dos residuos fosforilados, Akt se encuentra completamente activa. La fosforilación de la Ser473 es mediada por la cinasa PDK2 y sucede primero, permitiendo la fosforilación por la cinasa PDK1 de la Thr308 (Arellano, 2008).

Holmström (2010) demostró que la activación de ERK1/2 inducida por LPA en un cultivo primario de pre-adipocitos marrón y en la línea celular 3T3-F442A pre-adipocitos, no está mediado a través de la transactivación de receptores de EGF, ni en ninguno de los receptores de PDGF. También propone que la activación de ERK1/2 inducida por LPA se produjo a través de dos vías diferentes, una dependiente de la proteína Gi y una independiente a Gi insensible a la Toxina Pertusis (PTX).

Recientemente se ha identificado al LPA como un agente biológico de señalización, además de ser un intermediario clave en la síntesis *de novo* de los lípidos, es un mensajero intracelular importante. Existen estudios que sugieren que el LPA puede tener una función clave en la regulación de la obesidad. En un trabajo reciente, empleando dos tipos diferentes de cultivo celular, la línea L6 GLUT4myc y adipocitos 3T3-L1, se demostró que el LPA promueve la incorporación de glucosa a través de la movilización de transportadores Glut-4, mecanismo que depende de la activación de Akt-1. Se observó que este efecto fue independiente de la activación o sensibilización de la vía de la insulina en estos modelos celulares, demostrando un efecto aditivo sobre la señalización de la insulina. Además, se demostró que en un modelo animal de diabetes el LPA es capaz de disminuir los niveles de glucosa en sangre (Yea, 2008).

Kim en el 2008 demostró que en una línea celular de epitelio de esófago de gato el LPA activa a la vía MAPK, en la fosforilación de ERK1/2 de una manera dependiente del tiempo y la concentración.

IV. Justificación e Hipótesis

Debido a la importancia que tiene el hígado en las funciones de la insulina y a que poco es lo que se ha estudiado con relación al efecto del LPA en la señalización de la insulina en este tejido, en el presente trabajo nos propusimos investigar los mecanismos de regulación del LPA en la señalización de la insulina, poniendo especial atención en la activación de Akt, una proteína clave en las acciones metabólicas de la insulina.

La línea celular C9 es derivada de hígado normal de rata, tiene fenotipo epitelial, expresa de manera endógena LPARs (LPAR₁, LPAR₂, LPAR₃) acoplados a diferentes proteínas G, así como receptores para la insulina, y ha sido un modelo ampliamente utilizado en el estudio de mecanismos de señalización individual o de interacciones GPCRs y RTKs.

Con esta justificación se propone la siguiente hipótesis: en la línea celular hepática C9, el ácido LPA, sensibilizará las vías de señalización de insulina regulándolas de manera positiva.

V. Objetivos

General:

Determinar el efecto del LPA sobre el estado de activación de la vía de señalización de la insulina en células de origen hepático C9.

Particulares:

1. Caracterizar el efecto de la insulina y el LPA en células de origen hepático (C9) sobre la vía de activación de PI3K/Akt y en la vía de las MAPK, para ello se evaluará:
 - a) La activación de la cinasa Akt, a través de la fosforilación de los residuos Ser473 y Thr308.
 - b) La activación de la cinasa ERK1/2 a través de la fosforilación en los residuos Thr202/Tyr204.
2. Determinar la participación del LPA en la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK, inducida por insulina, evaluando:
 - a) La fosforilación de los residuos Ser473 y Thr308 para PI3K/Akt.
 - b) La fosforilación de ERK1/2 en los residuos Thr202/Tyr204 para MAPK
3. Determinar los mecanismos involucrados en la regulación de la señal de la insulina por efecto del LPA:
 - a) Evaluando el efecto del antagonista VPC 32183 en la activación de PI3K/Akt (fosforilada en Ser473), inducida por LPA.ç
 - b) Evaluando la participación del LPA sobre la vía de activación de PI3K/Akt (fosforilada en Ser473) inhibiendo al IR y EGFR.

VI. Materiales y Métodos

a. Cultivo Celular

Se utilizó como modelo de estudio a las células C9 provenientes de epitelio de hígado de rata, la línea celular fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection ATCC*: Manassas, VA).

Estas células fueron cultivadas en medio Ham's F-12K (Kaighn's Modification F12) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 µg/ml de estreptomina, 100 IU/ml de penicilina y 0.25 µg/ml de amfotericina B. 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.

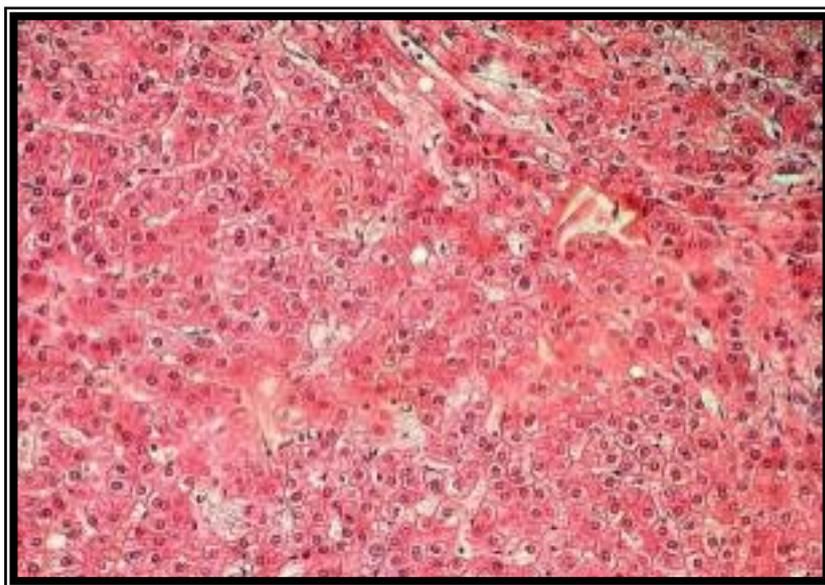


Figura 11. Células C9. Células de epitelio de hígado de rata

b. Detección de Proteínas por Western Blot

Para los experimentos las células se sembraron en cajas de cultivo de 6 o 12 pozos, fueron mantenidas en medio con suero al 2% durante 16 horas y después en medio libre de suero durante 3 horas previas al experimento.

Después de transcurridas las 3 horas con medio libre de suero, las células fueron estimuladas con insulina y LPA de SIGMA, a diferentes tiempos y concentraciones. También se utilizaron inhibidores y un antagonista para diferentes receptores: AG1024 (inhibe al receptor de insulina), AG1478 (inhibe al receptor de EGF) y VPC 32183 de Avanti Polar Lipids (antagonista de LPAR₁ y LPAR₃).

Inhibidor /Antagonista	Concentración	Tiempo
AG1024	50 μ M	30 min.
AG1478	100 nM	30 min.
VPC 32183	1 μ M	30 min.

Una vez terminados los experimentos, se removió el medio y las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS frío (Buffer de fosfatos casero que contiene: NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄O 10 mM y KH₂PO₄O 2 mM, con un pH de 7.4) Este último también fue retirado por completo y a cada pozo se le añadieron 100 μ l de Laemli 1X (*SDS-protein gel loading solution* 2X Quality Biological, INC + β -mercaptoetanol + agua). Cada muestra se sonicó dando pulsos de 40 khz por 10 segundos (Sonios Vibra cell TM. Ultrasonic Processor).

Posteriormente se calentaron las muestras a 99°C durante 5 minutos (Termomixer Comfort Eppendorf) y finalmente se centrifugaron 5 minutos a 14, 500 rpm (MiniSpinPLUS eppendorf). Después se tomó una alícuota de cada muestra (15 μ l del sobrenadante en pozos pequeños y 20 μ l en pozos grandes) y ésta fue cargada en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Éstos fueron separados por electroforesis a 80V durante 15 minutos y posteriormente a 120V por aproximadamente 80 minutos.

Las proteínas contenidas en los geles, al término de la electroforesis, se transfirieron a membranas PVDF en cámara de transferencia semiseca (Biorad) a 15V durante 60 minutos, para posteriormente llevar a cabo la detección de proteínas con anticuerpos específicos.

Todos los blots se bloquearon durante una hora con buffer TBS-Tween (TBS-T Tris base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 a 0.05% o 0.1%, pH 7.5) y leche al 5% para posteriormente incubarlos con los anticuerpos primarios (tabla) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-T 0.05% o 0.1% antes de colocar el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 1) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Proteína	Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Fosfo-Akt 1/2/3	α -p-Akt Ser473 (Santa Cruz Biotechnology)	1:5000 **	α -rabbit (ZYMED)	1:5000 **
	α -p-Akt Thr308 (Santa Cruz Biotechnology)	1:2500 **	α -rabbit (ZYMED)	1:5000 **
Fosfo-ERK 1/2	α -p-ERK 1/2 (Thr 202/ Tyr 204) (santa Cruz Biotechnology)	1:4000 *	α -rabbit (ZYMED)	1:5000 *
ERK 2 TOTAL	α -ERK 2 (Santa Cruz Biotechnology)	1:5000 *	α -rabbit (ZYMED)	1:5000 *
Akt TOTAL	(Santa Cruz Biotechnology)	1:5000 **	α -mouse (ZYMED)	1:3000 **
Actina	Actina (sc-19) (Santa Cruz Biotechnology)	1:4000 *	α -goat (KPL)	1:5000 ***

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios. Todos los anticuerpos fueron diluidos en buffer TBS-T * 0.1% y ** 0.05% y leche 5% excepto *** que fue con leche 3%.

Después se detectaron las bandas por medio de un kit de inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence reagent*. Millipore), siguiendo las indicaciones del fabricante, por 2 minutos y fueron reveladas en cuarto oscuro con los reactivos Kodak, para finalmente detectar la intensidad de cada banda obtenida en las placas, por medio del densitómetro GS-800 (Bio-Rad laboratorios). La cuantificación de estos datos se llevó a cabo en el programa Quantity One® Versión 4.6.3.

c. Análisis Estadístico de Resultados

Con una $n = 5$ o 6 , los experimentos fueron evaluados en porcentajes y posteriormente analizados con el programa PRISM™, versión 4.0 (GraphPad Software: San Diego, CA) para ser graficados. En este mismo programa se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía tomando como diferencia significativa $p \leq 0.05$.

VII. Resultados

Dentro de los procesos metabólicos que son activados por la insulina en hígado, hay aumento en la síntesis de glucógeno y disminución de la glucogenólisis, procesos que son mediados por la activación de la vía IR/IRS/PI3K/Akt/GSK-3/GS para el caso de la síntesis de glucógeno (Patel *et al.*, 2004; Srivastava and Pandey, 1998) y de la vía IR/IRS/PI3K/Akt/FOXO1 para el caso de la inhibición de la transcripción de genes gluconeogénicos (Dong *et al.*, 2006; Langhans, 2003). De tal manera que la fosforilación y activación de Akt se considera un paso clave para activar las vías de señalización involucradas en las funciones de la insulina (Downward, 1998; Kido *et al.*, 2001; Lawlor and Alessi, 2001).

Akt es activada por la fosforilación en Ser473 y Thr308, lo que genera la máxima activación de la proteína. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito la importancia funcional de cada sitio de fosforilación, ya que parece que cada sitio promueve procesos diferentes: mientras que la fosforilación en Thr308 favorece la incorporación de glucosa, la fosforilación en Ser473 parece activar proteínas que participan en procesos de proliferación celular (Bayascas *et al.*, 2008; Chan and Tschlis, 2001; Kondapaka *et al.*, 2004; Morisco *et al.*, 2005).

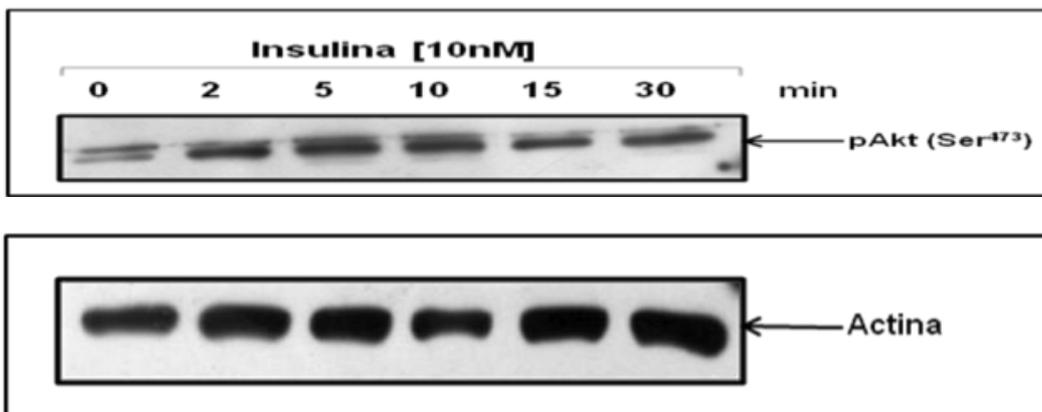
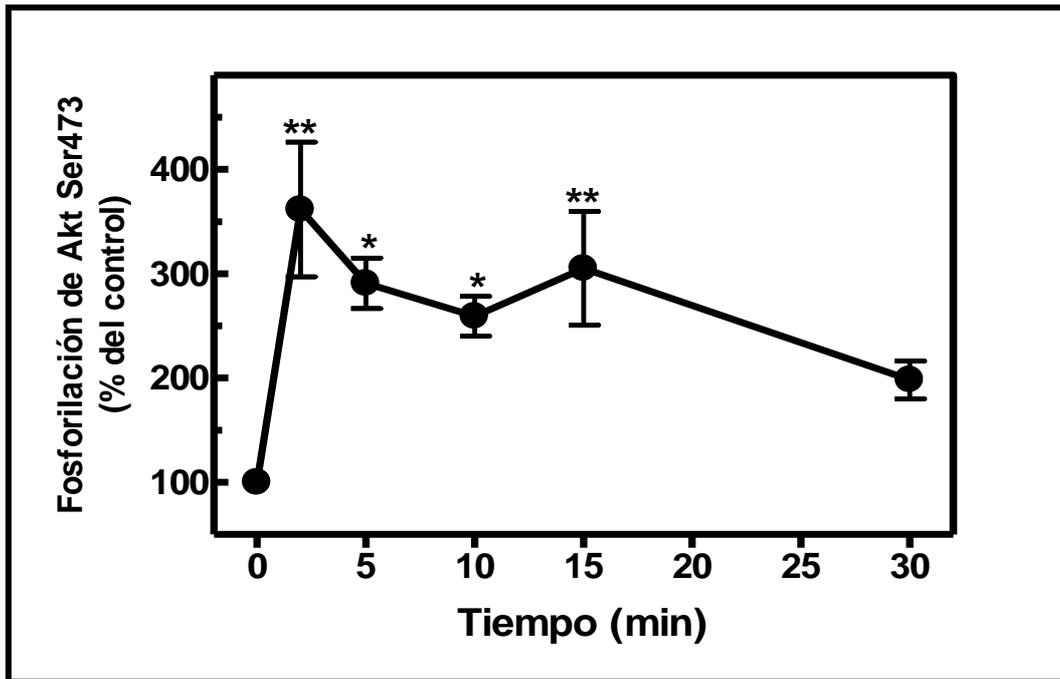
7.1 La insulina induce la activación de Akt

Debido a la importancia de activar Akt en la señalización de la insulina y a la reciente implicación que parece tener la fosforilación por separado de cada residuo, se decidió determinar el efecto de la insulina en la fosforilación de los residuos Ser473 y Thr 308 de Akt, evaluando la concentración y el tiempo máximo de fosforilación.

Con el fin de caracterizar el efecto de la insulina sobre dicha activación, las células C9 fueron estimuladas a diferentes tiempos con insulina 10nM (figura 12. A) observándose una máxima fosforilación de Akt Ser473 a los 2 minutos, la cual disminuye a partir de los 5 minutos y se mantiene por lo menos durante 15 minutos, como control de carga se utilizó actina.

Se observó algo similar con respecto al efecto de la insulina en la fosforilación de Akt Thr308 (figura 12. B), teniendo una máxima fosforilación a los 2 minutos la cual disminuye a partir de los 5 minutos y se mantiene constante por lo menos hasta los 30 minutos, como control de carga se utilizó actina.

A)



B)

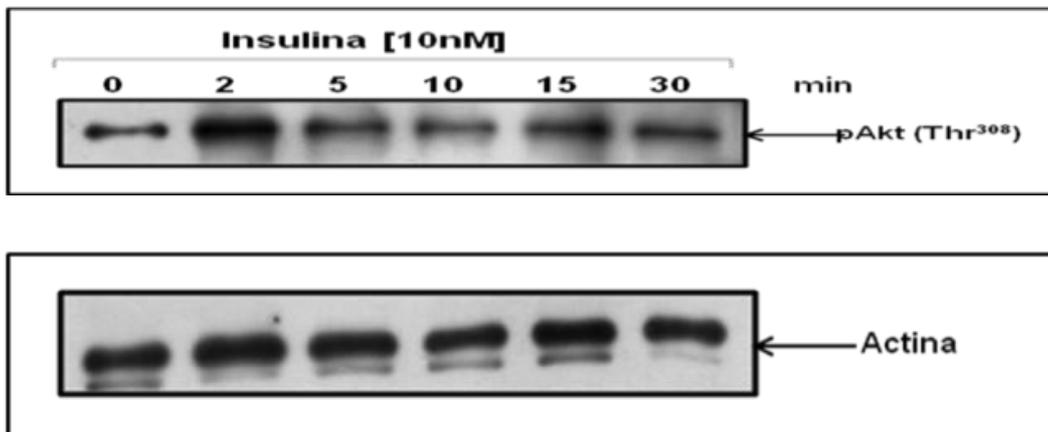
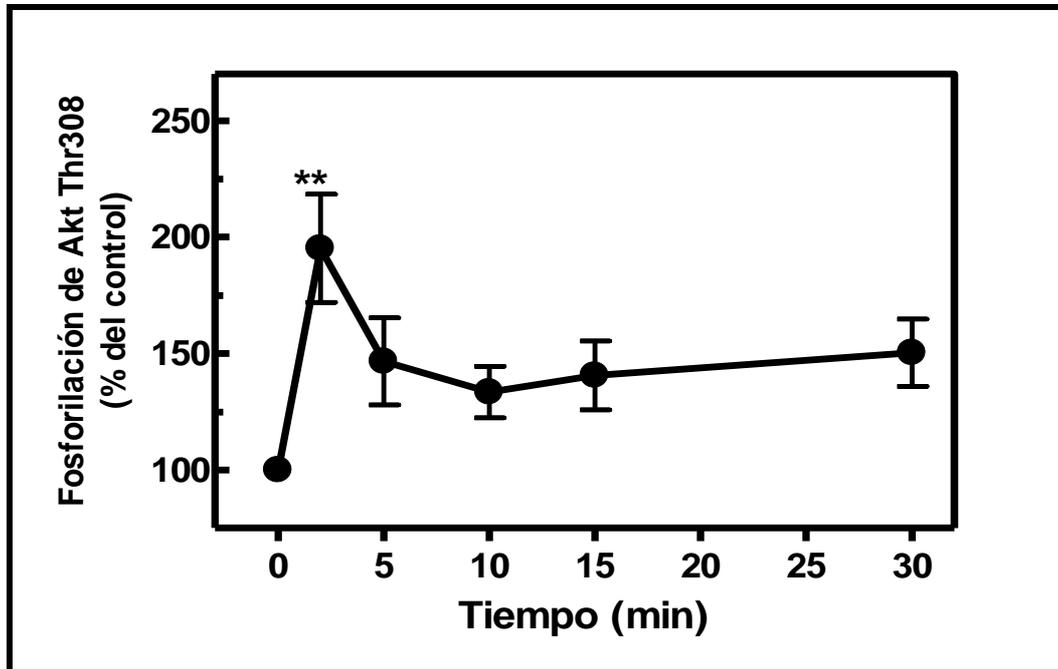


Figura 12. Fosforilación de Akt inducida por insulina. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con 10nM de insulina por 2, 5, 10, 15 y 30 minutos. **A)** Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Ser473. **B)** Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Thr308. Las gráficas representan los datos obtenidos de 3 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje, para **A)** * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control, **B)** * $p < 0.05$ vs control. Para ambos casos (**A** y **B**) se determinó como control de carga actina. Se muestra un blot representativo de cada gráfica, $n=3$.

7.2 La insulina tiene un efecto dependiente de la concentración sobre la activación de Akt Ser473.

El efecto inducido por insulina en la activación de Akt Ser473 también es dependiente de la concentración del agonista (figura 13), ya que se observa que a partir de una concentración de 10pM (1×10^{-11} M) se obtiene fosforilación de Akt Ser473. Sin embargo, la fosforilación máxima se da con la concentración de 100nM (1×10^{-7} M) de insulina durante 5 minutos.

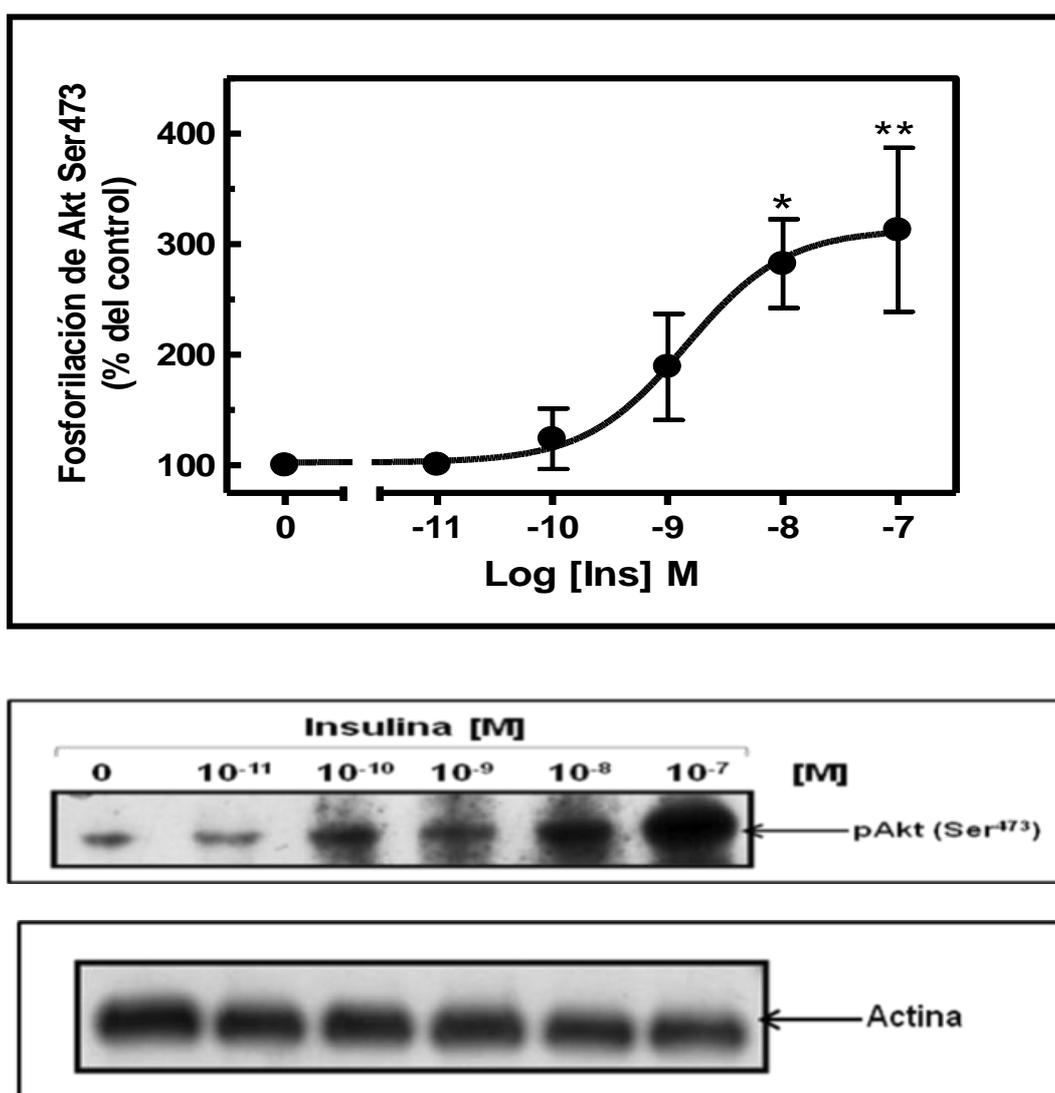


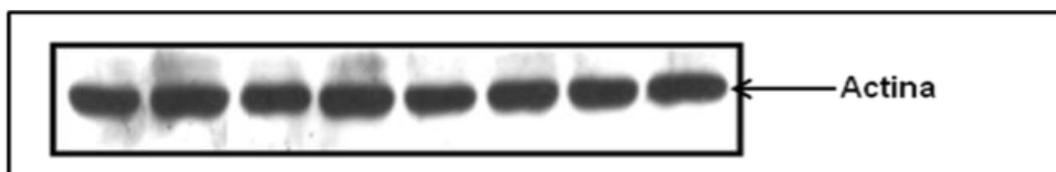
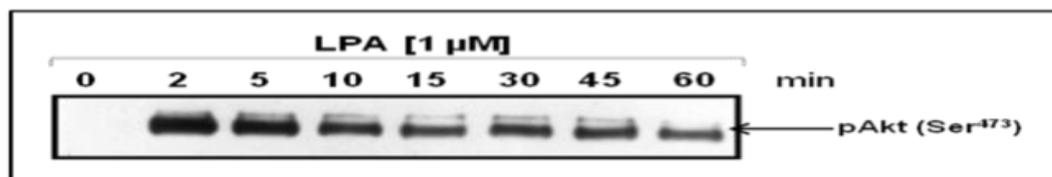
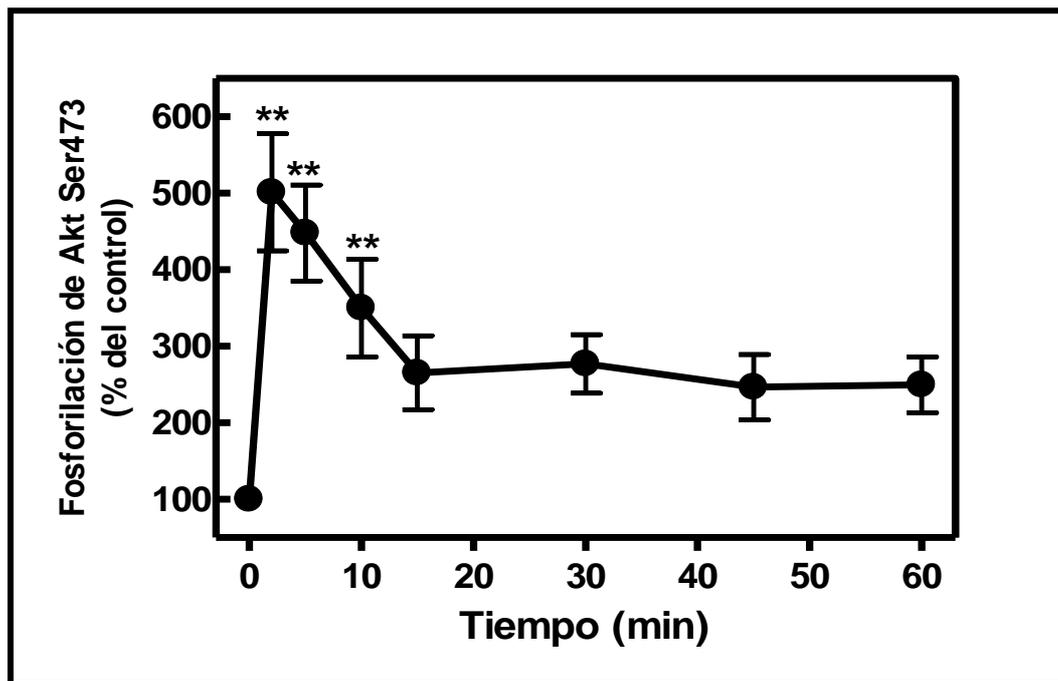
Figura 13. Ensayo concentración-respuesta en la activación de Akt Ser473 con insulina. Las células C9 fueron mantenidas 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con diferentes concentraciones 1×10^{-11} hasta 1×10^{-7} [M] durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas utilizando el anticuerpo anti-pAkt Ser473. Como control de carga se utilizó actina. La gráfica representa los datos obtenidos de 5 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica *p < 0.05 vs 0, **p < 0.01 vs 0 n=5.

7.3 El LPA induce la activación de Akt.

Se sabe que el LPA es un fosfolípido cuyos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los receptores pueden estar acoplados a diferentes miembros de las subfamilias de proteínas G. Sin embargo, se sabe que cuando el LPA se une a su receptor (LPA₁, LPA₂, LPA₃) y este se acopla a la proteína Gi, se activa la vía de señalización de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) con subsiguiente activación de Akt Ser y Thr (Mu-En *et al.*, 2010).

Con el fin de caracterizar el efecto del LPA sobre dicha activación, las células C9 fueron estimuladas a diferentes tiempos con LPA 1µM (figura 14 A) observándose la máxima fosforilación de Akt Ser473 a los 2 minutos la cual disminuyó a los 5 minutos hasta los 15 minutos y, a partir de ahí, se mantuvo constante por lo menos hasta los 60 minutos, como control de carga se utilizó actina.

A)



Con respecto al efecto del LPA en la fosforilación de Akt Thr308 (figura 14 B), se observó la máxima fosforilación a los 2 minutos, después de ese tiempo la fosforilación de Akt Thr308 disminuyó hasta llegar a niveles por debajo del basal después de los 45 minutos, como control de carga se utilizó actina.

B)

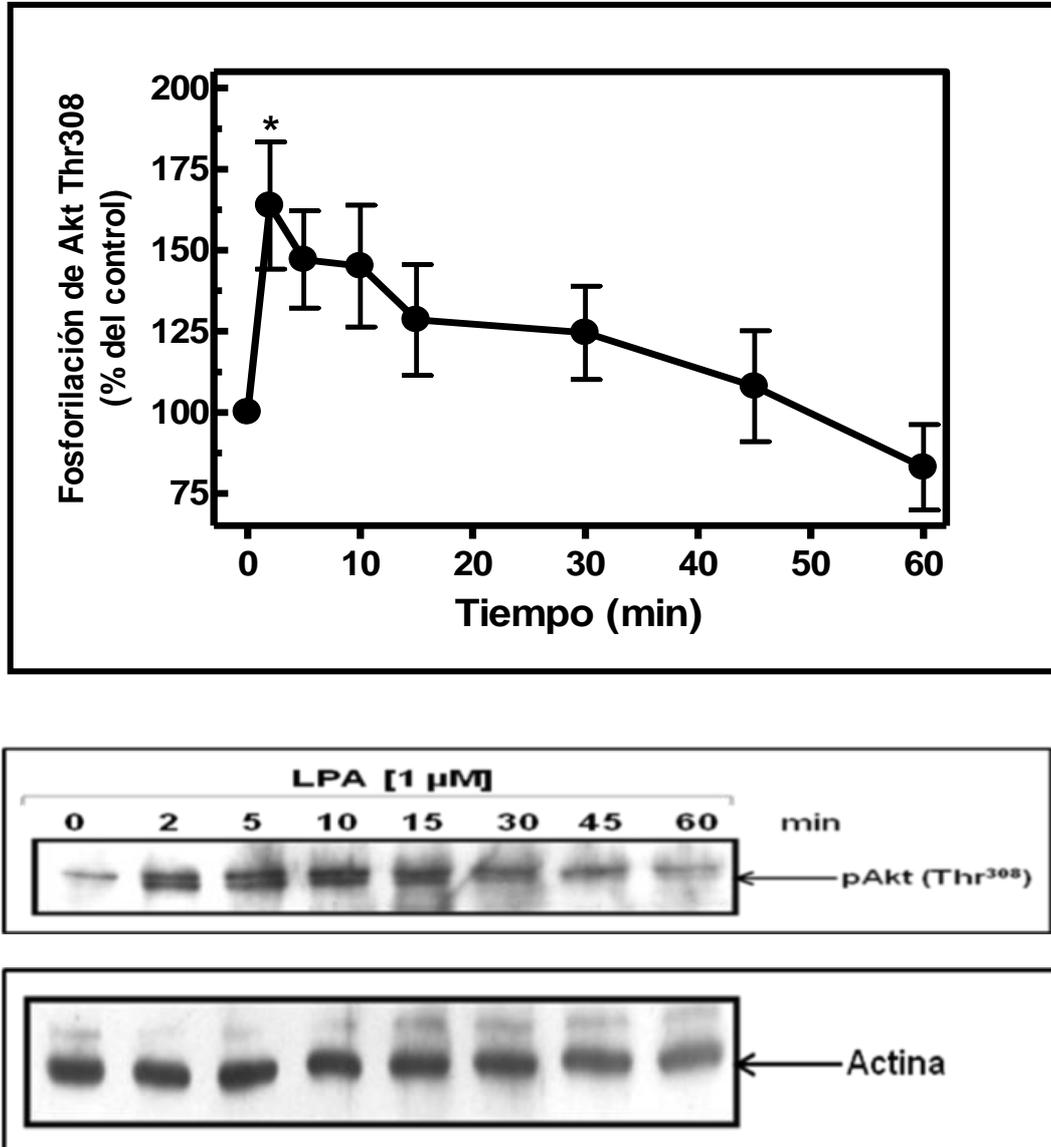


Figura 14. Fosforilación de Akt inducida por LPA. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con 1μM de LPA por 2, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. **A)** Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Ser473. **B)** Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Thr308. Las gráficas representan los datos obtenidos de 5 y 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje, para **A)** ** $p < 0.01$ vs control, **B)** * $p < 0.05$ vs control. Para ambos casos (**A** y **B**) se determinó como control de carga actina. Se muestra un blot representativo de cada gráfica, **A)** $n=5$, **B)** $n=4$.

7.4 El LPA tiene un efecto dependiente de la concentración sobre la activación de Akt Ser473.

El efecto inducido por el LPA en la activación de Akt Ser473 también es dependiente de la concentración del agonista (figura 15), ya que se observa que a partir de la concentración 1nM (1×10^{-9} M) se obtiene fosforilación de Akt Ser473. Sin embargo, la fosforilación máxima se obtuvo con la concentración de $10 \mu\text{M}$ (1×10^{-5} M) de LPA durante 2 minutos.

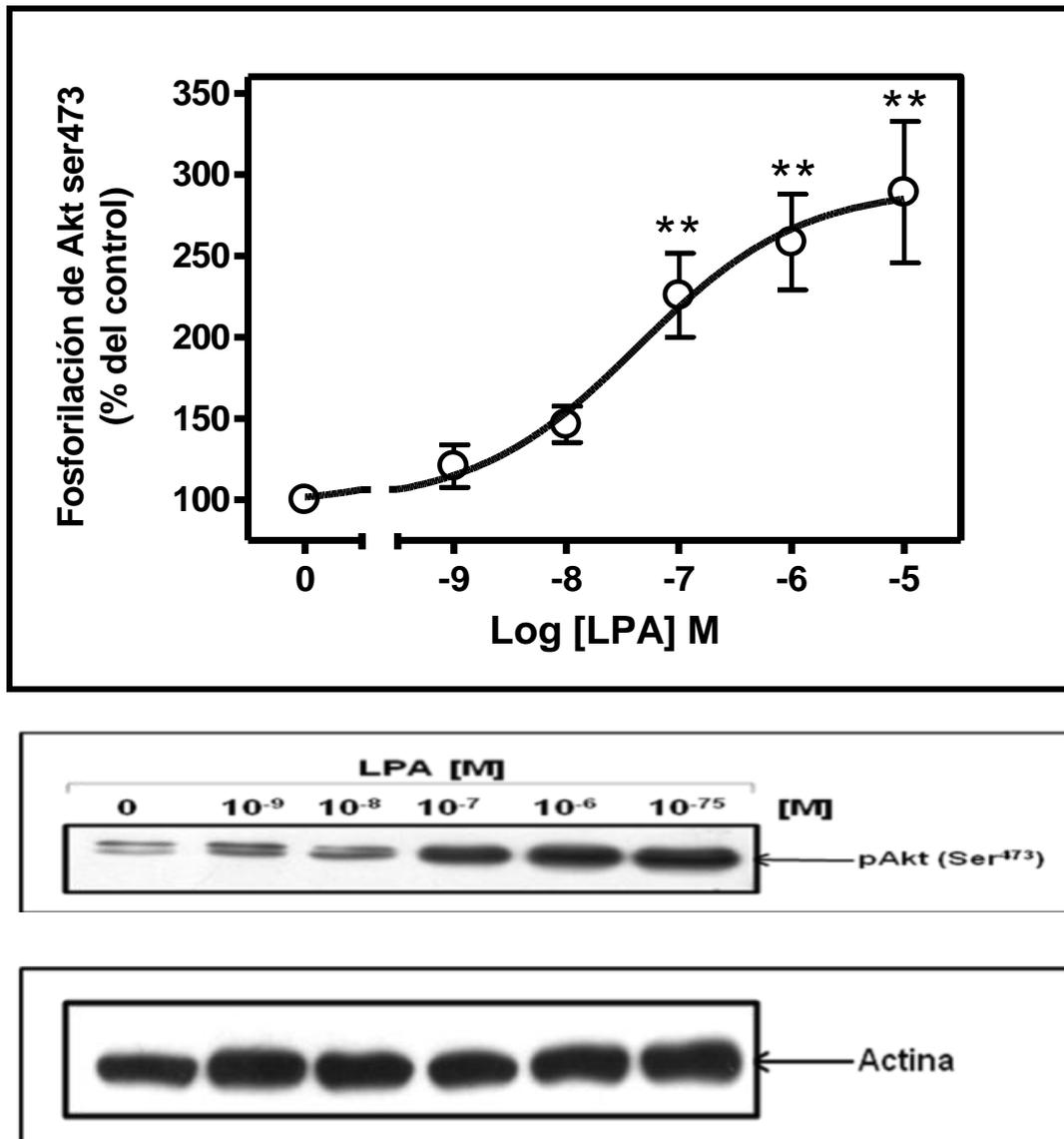


Figura 15. Ensayo concentración-respuesta en la activación de Akt Ser473 por LPA. Las células C9 fueron mantenidas 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con diferentes concentraciones 1×10^{-9} hasta 1×10^{-5} [M] durante 2 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas utilizando el anticuerpo anti-pAkt Ser473. Como control de carga se utilizó actina. La gráfica representa los datos obtenidos de 6 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la grafica ** $p < 0.01$ vs 0 n=6.

7.5 El LPA incrementa la fosforilación de Akt inducida por insulina.

Una vez caracterizados los sistemas, se procedió a analizar si el LPA incrementaba la señal de insulina en las células C9. No sabemos si exista una posible relación entre el LPA y la insulina, de manera que el LPA tenga efectos reguladores sobre las acciones de la insulina. Para determinar si en las células C9 el LPA puede regular la vía de PI3K/Akt de la insulina, se realizaron preincubaciones con el LPA 1 μ M a diferentes tiempos y un posterior estímulo con insulina 10nM por 15 minutos (figura 16). Estos resultados sugieren que el LPA incrementa la fosforilación de Akt Ser473.

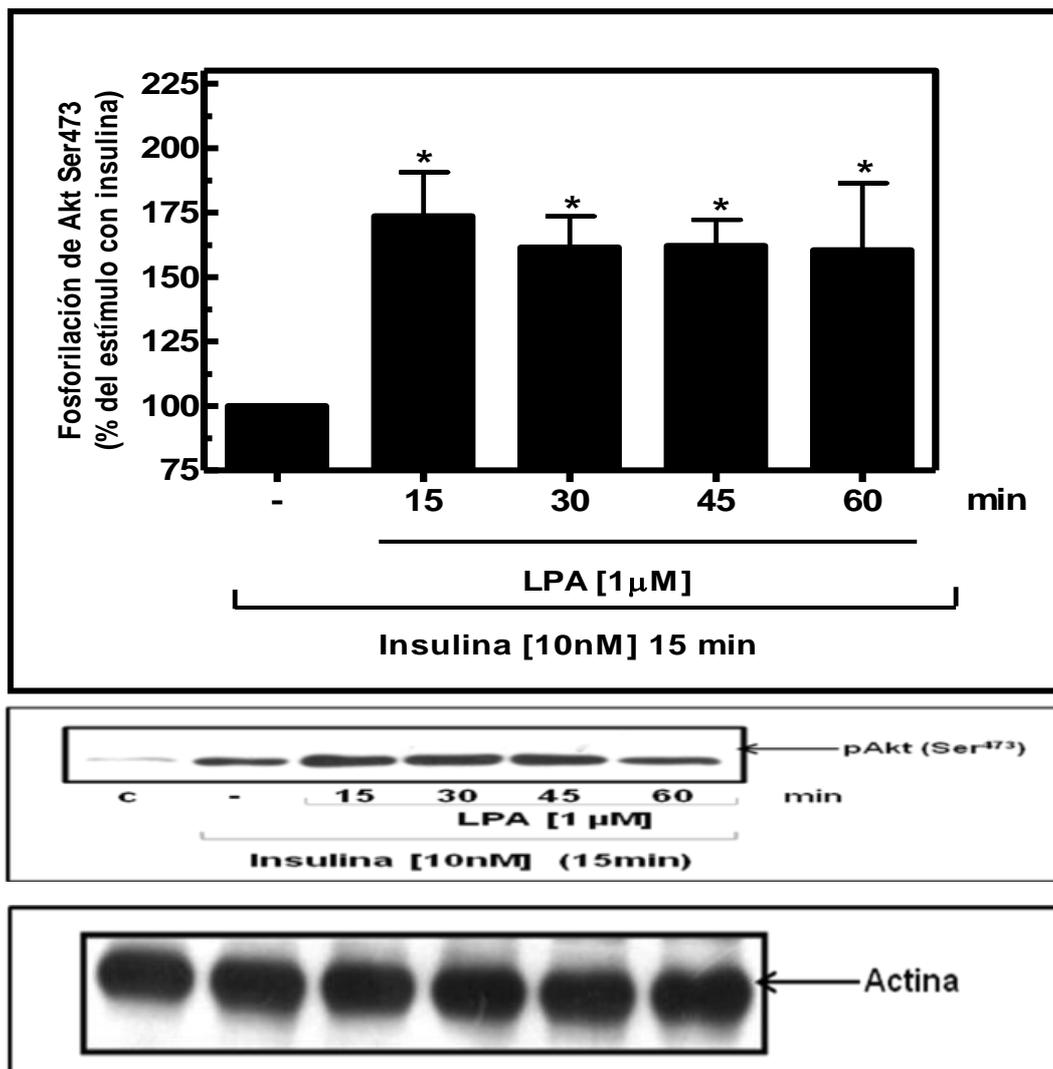


Figura 16. Efecto del LPA en la fosforilación de Akt Ser473 inducido por insulina. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con 1 μ M de LPA por 15, 30, 45 y 60 minutos y después con 10nM de insulina durante 15 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Ser473. Como control de carga se detectó actina. La gráfica representa los datos obtenidos de 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. * p <0.05 vs control n =4.

En el caso del efecto del LPA en la fosforilación de Akt Thr308 inducido por insulina en la vía de PI3K/Akt de la insulina, se realizaron preincubaciones con el LPA $1\mu\text{M}$ a diferentes tiempos y un posterior estímulo con insulina 10nM por 15 minutos (figura 17). Estos resultados sugieren que el LPA incrementa la fosforilación de Akt Thr308 cuando las células son preincubadas con el LPA durante 15 minutos; sin embargo, la señal de Akt Thr308 disminuye después de los 30 minutos de preincubación con el LPA.

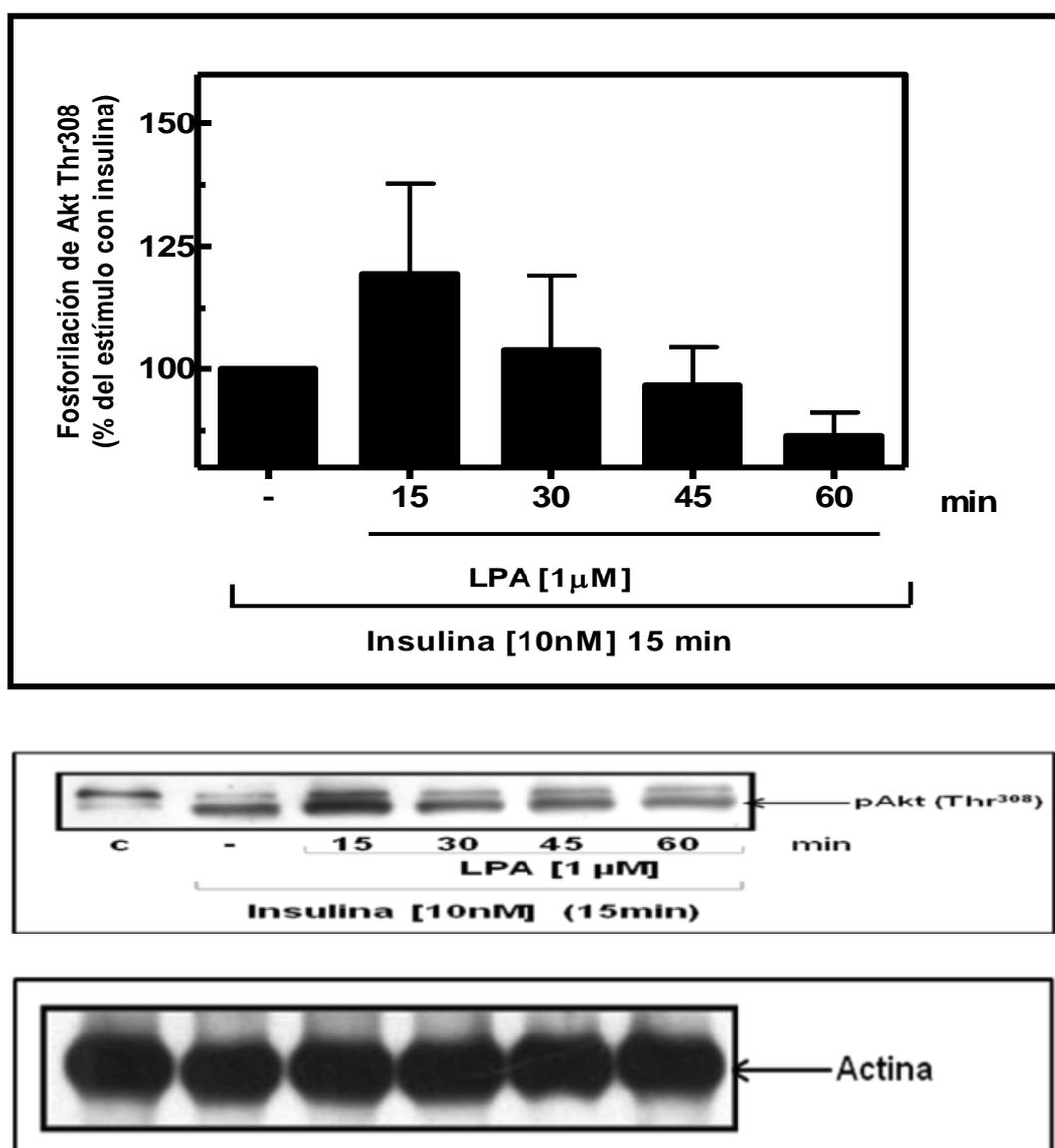


Figura 17. Efecto del LPA en la fosforilación de Akt Thr308 inducido por insulina. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con $1\mu\text{M}$ de LPA por 15, 30, 45 y 60 minutos y después con 10nM de insulina durante 15 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Thr308. Como control de carga se detectó actina.. La gráfica representa los datos obtenidos de 3 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica $n=3$.

7.6 La fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA puede estar regulada por la transactivación de los receptores IR y EGFR.

Existen fenómenos intracelulares originados por la activación de GPCRs, que inciden sobre RTKs induciendo la dimerización y autofosforilación necesarias para su activación. El fenómeno de transactivación fue utilizado por Ullrich (Daub H, *et al.*, 1997), quien demostró que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que pertenece a la familia de los RTKs, era activado por el LPA en ausencia del ligando de EGF en una línea celular de fibroblastos Rat-1 (Sánchez y Arias, 2004). Con estos antecedentes, se procedió a evaluar si el LPA participaba en el fenómeno de transactivación en el modelo celular C9, activando a los receptores IR y EGFR. Las células fueron preincubadas con los inhibidores para IR (AG1024) y para EGFR (AG1478) y posteriormente estimuladas con insulina, EGF y LPA (figura 18). Se puede observar que cuando las células son tratadas con los inhibidores AG1024 y AG1478 la señal de Akt Ser473 disminuye, lo mismo sucede cuando se inhiben a los receptores IR y EGFR y se estimula con LPA. Este resultado nos sugiere que el efecto de LPA sobre la activación de PI3K/Akt puede estar mediado por la transactivación de los receptores de IR y EGFR.

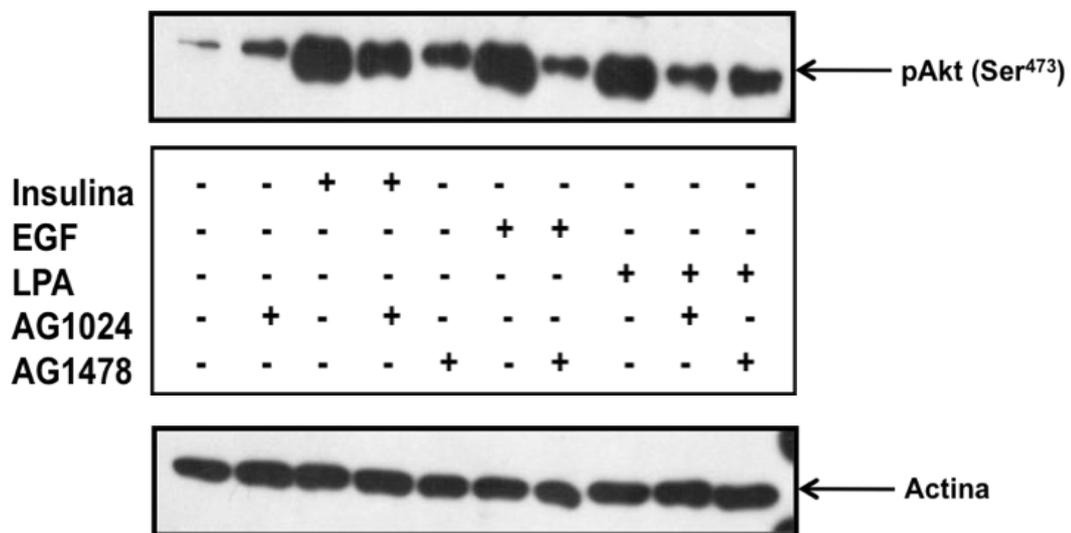
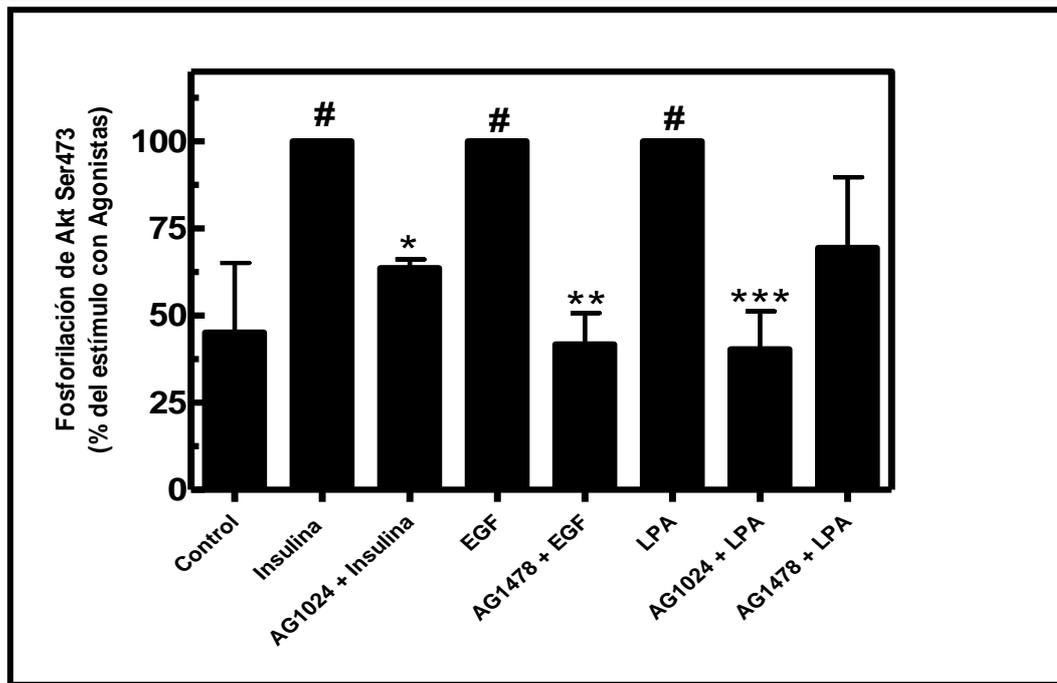


Figura 18. La fosforilación de Akt Ser473 puede estar regulada por la transactivación de los receptores IR y EGFR. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con los inhibidores AG1024 [50µM] y AG1478 [100nM]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con los agonistas insulina [10nM] durante 15 minutos, EGF [50ng/ml] durante 5 minutos y LPA [1µM] durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Ser473. Como control de carga se detectó actina. La gráfica representa los datos obtenidos de 3 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica, * $p < 0.05$ vs insulina, ** $p < 0.01$ vs EGF, *** $p < 0.01$ vs LPA, # $p < 0.05$ vs control, $n = 3$.

7.7 El antagonista VPC 32183 bloquea de manera parcial al LPA a diferentes tiempos.

En la línea celular C9 se localizan LPAR₁, LPAR₂, LPAR₃ (González *et al.*, 2008). Para verificar si el efecto anteriormente visto en la fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA, es mediada por los LPARs en la línea celular C9, se procedió a incubar a las células con el antagonista VPC 32183, específico para LPAR₁ y LPAR₃, durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con LPA a diferentes tiempos. Se puede observar que la señal de Akt Ser473 disminuyó en presencia del antagonista (Figura 19).

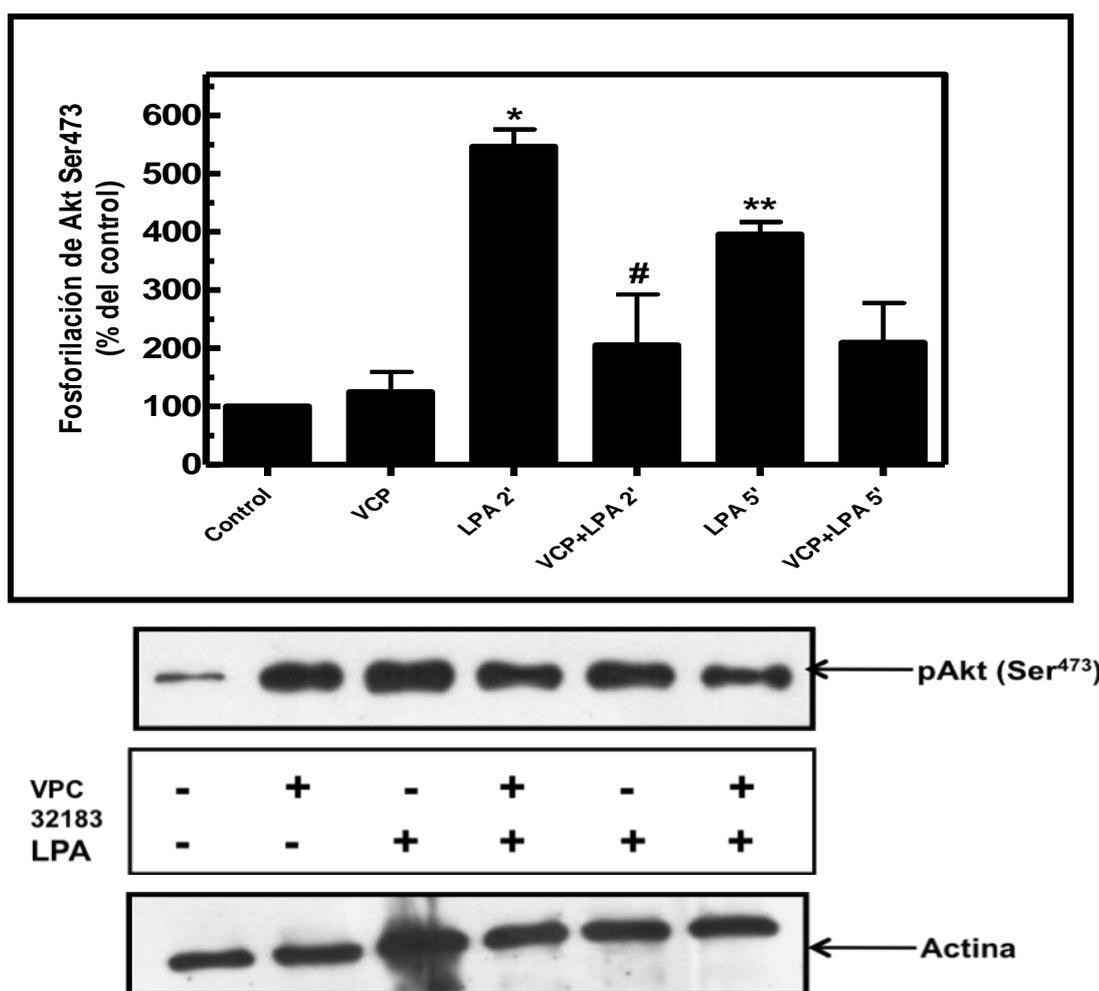


Figura 19. Participación del antagonista VPC 32183 en la fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Se realizaron preincubaciones de 30 minutos con el antagonista VPC 32183 [1 μ M]. Transcurridos los 30 minutos se estimuló con el agonista LPA [1 μ M] durante 2 y 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pAkt Ser473. Como control de carga se detectó actina. La gráfica representa los datos obtenidos de 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica, * p <0.001 vs control, ** p <0.05 vs control, # p <0.01 vs LPA 2'. n =4.

7.8 La insulina induce la activación de ERK1/2.

La insulina activa a la vía de las MAPK a través de dos mecanismos distintos, en el primero por la activación del IR que promueve la asociación de la proteína Shc, la cuál se une al complejo Grb2/SOS, que inicia el encendido de las MAPK y subsecuentemente lleva a la fosforilación de MEK y de las ERK1/2, y la segunda es independiente de Shc pero dependiente de la activación de IRS, el cual se une al complejo Grb2/SOS y el mecanismo es el mismo que se describió para Shc (Oliveres y Arellano, 2008). De acuerdo con esto, se decidió determinar el efecto de la insulina en la fosforilación de ERK1/2 evaluando el tiempo máximo de fosforilación.

Con el fin de caracterizar el efecto de la insulina sobre dicha activación, las células C9 fueron estimuladas a diferentes tiempos con insulina 10nM (figura 20), observándose la máxima fosforilación de ERK1/2 a los 5 minutos, la cual disminuye a los 10 minutos y se mantiene por lo menos hasta los 30 minutos llegando casi al nivel basal, como control de carga se utilizó ERK total.

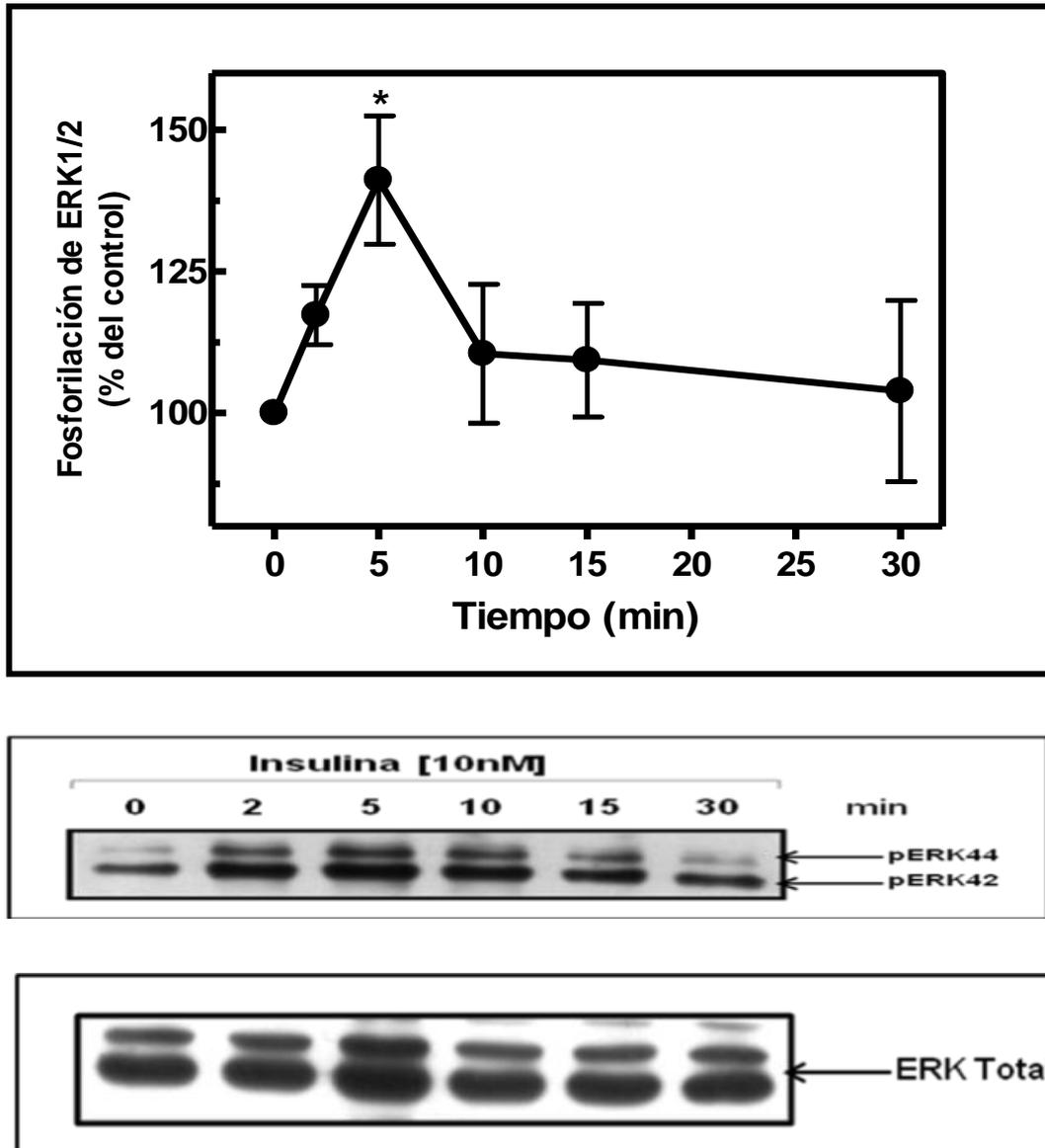


Figura 20. Fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 por insulina. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con 10nM de insulina por 2, 5, 10, 15 y 30 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pERK1/2 Thr202/Tyr204. Como control de carga se detectó ERK total. La gráfica representa los datos obtenidos de 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. * $p < 0.05$ vs control $n=4$.

7.9 El LPA induce la fosforilación de ERK1/2.

Con respecto a la fosforilación de ERK1/2 y el efecto que pudiera tener el LPA sobre esta cinasa, se caracterizó el efecto del LPA sobre dicha activación, las células C9 fueron estimuladas a diferentes tiempos con LPA 1 μ M (figura 21), observándose la máxima fosforilación de ERK1/2 a los 2 minutos, que disminuye a los 5 minutos y a partir de los 15 minutos se mantuvo constante por lo menos hasta los 60 minutos, como control de carga se utilizó Akt total.

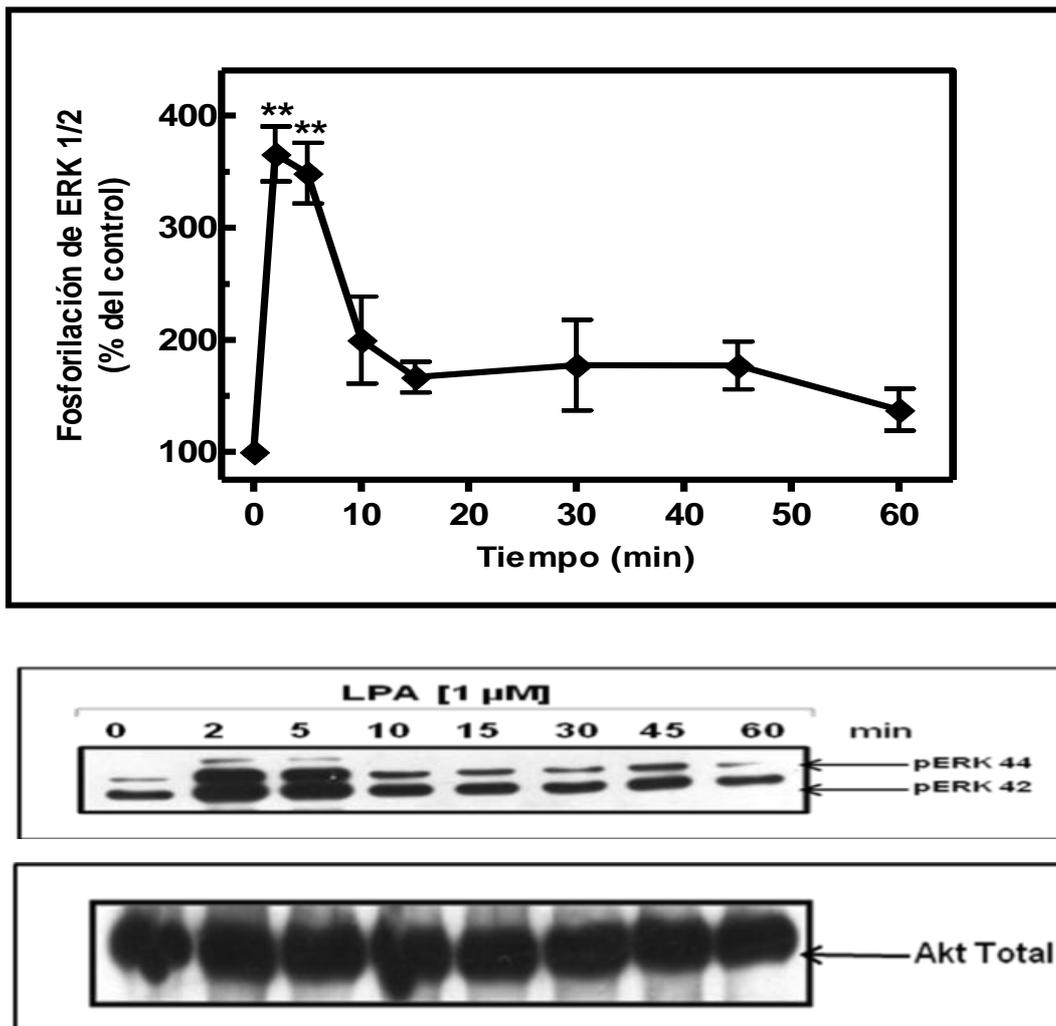


Figura 21. Fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 por LPA. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con 1 μ M de insulina por 2, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pERK1/2 Thr202/Tyr204. Como control de carga se detectó Akt total. La gráfica representa los datos obtenidos de 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. ** $p < 0.01$ vs control $n=4$.

7.10 El LPA incrementa la fosforilación de ERK inducida por insulina.

En el caso del efecto del LPA en la fosforilación de ERK1/2 inducido por insulina en la vía MAPK de la insulina, se realizaron preincubaciones con el LPA $1\mu\text{M}$ a diferentes tiempos y un posterior estímulo con insulina 10nM por 15 minutos (figura 22). Estos resultados sugieren que el LPA incrementa la fosforilación de Akt Thr308 cuando las células son preincubadas con el LPA durante 15 minutos; sin embargo, la señal de ERK1/2 disminuyó después de los 30 minutos de preincubación con el LPA llegando a niveles por debajo del basal.

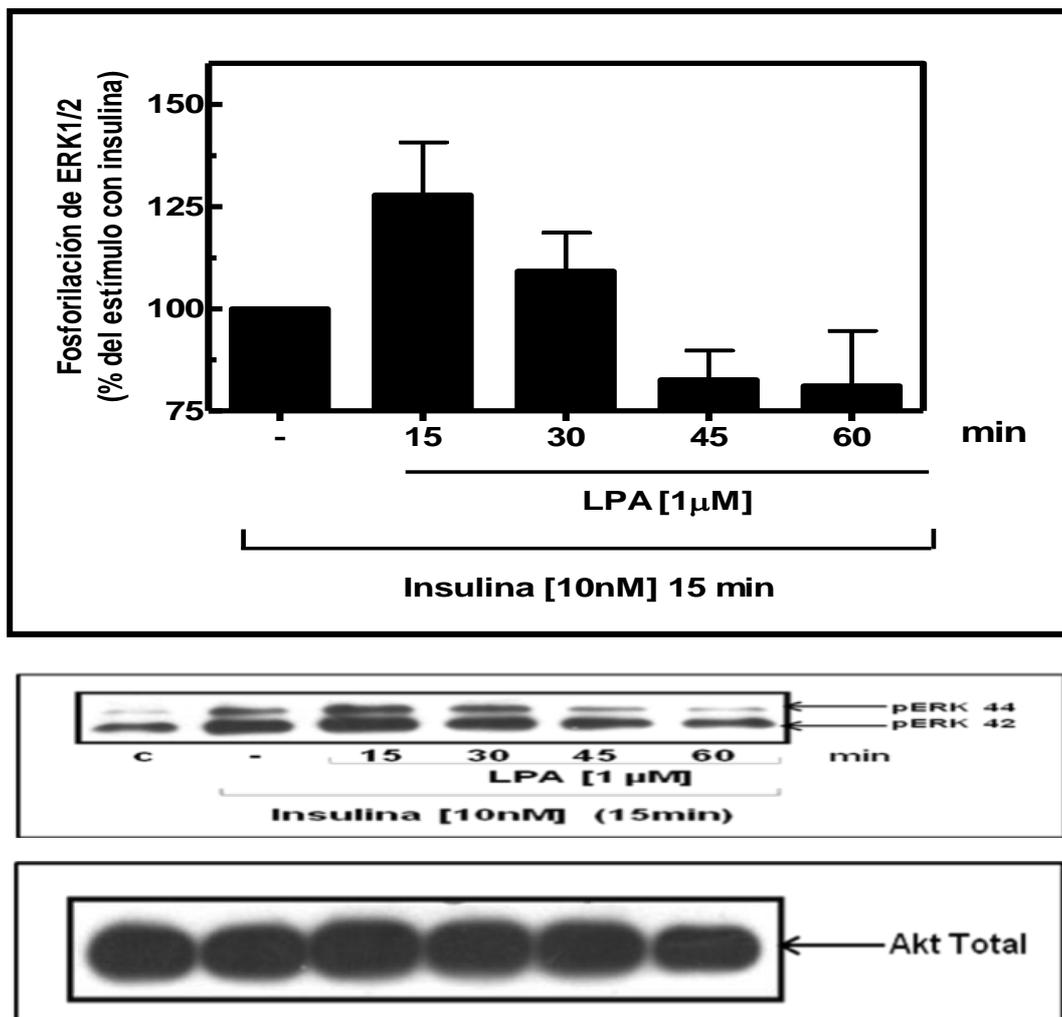


Figura 22. Efecto del LPA en la fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204 inducido por insulina. Las células C9 fueron mantenidas durante 16 h en medio con suero al 2% y después en medio sin suero durante 3 h. Fueron tratadas con $1\mu\text{M}$ de LPA por 15, 30, 45 y 60 minutos y después con 10nM de insulina durante 15 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas utilizando un anticuerpo anti-pERK1/2 Thr202/Tyr204. Como control de carga se detectó Akt total. La gráfica representa los datos obtenidos de 4 experimentos independientes, los datos son expresados como el promedio \pm ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica $n=4$.

VIII. Discusión

En el presente trabajo evaluamos cómo es que se lleva a cabo la regulación de las dos cascadas de señalización que se activan por insulina, PI3K/Akt y MAPK en la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata. Se conocen bien los mecanismos que activan a la vía metabólica PI3K/Akt, bajo el estímulo de insulina a diferentes concentraciones. Por otro lado, analizamos la posible participación del LPA sobre las vías de señalización de la insulina.

La activación de Akt por la insulina involucra la fosforilación en los residuos Ser473 en el dominio carboxilo terminal y Thr308 en el asa de activación. Cuando los dos residuos se encuentran fosforilados, la proteína está completamente activa. La fosforilación de la Ser473 es mediada por la cinasa PDK2 y sucede primero, permitiendo la fosforilación por la cinasa PDK1 de la Thr308. La mutación de la Thr308 a alanina (Ala), bloquea la activación de Akt, indicando que este sitio es importante para la actividad de Akt. Sin embargo, la mutación de la Ser473 a Ala, sólo parcialmente altera la actividad de Akt, sugiriendo que este residuo es importante para la completa activación de Akt (Arellano, 2008).

En nuestro grupo de trabajo recientemente se demostró que la vía de PI3K/Akt puede ser activada a través del estímulo con insulina, evaluando la fosforilación de Akt en la línea celular C9, a la concentración de 100 nM, induce una rápida fosforilación de Akt (Arellano, 2008).

Estos datos los confirmamos en este trabajo, a diferencia de que utilizamos una concentración menor en nuestros estímulos con insulina (10 nM); sin embargo, de igual manera pudimos observar que la insulina, como era de esperar, promovió la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 como en el residuo Thr308, aunque la temporalidad de fosforilación fue diferente para cada residuo.

En la estructura de los GPCRs existen residuos específicos de fosforilación importantes para la regulación de su señalización. El papel fundamental de estos sitios radica en que, dada su composición, pueden inducir el reclutamiento de proteínas. Este efecto se provoca, tanto por la fosforilación del receptor, como por los consecuentes cambios conformacionales que provocan la exposición de dominios de unión a estas proteínas (Díaz, 2007).

El grupo del Dr. Sung Ho Ryu, en un reciente trabajo demostró la participación del LPA en la activación de Akt en su isoforma 1, sugiriendo que el LPA aumenta la fosforilación de Akt-1 sin efectos sobre el IRS-1; por otro lado, demostraron que la captura de glucosa en las

células 3T3-L1 adipocitos y en L6 GLUT4 miotubos, se ve disminuida cuando las células son pretratadas con un inhibidor de PI3K, el LY294002 (Yea, 2008).

De igual manera evaluamos la participación del LPA sobre la activación de Akt, el anticuerpo que nosotros utilizamos detecta las tres isoformas principales de Akt (Akt₁, Akt₂, Akt₃) y observamos que el LPA tiene un efecto sobre la fosforilación de los dos residuos de activación de Akt a través de un estímulo con LPA: a la concentración de 1 μ M, la temporalidad de fosforilación de la Ser473 y Thr308 fue diferente; sin embargo en ambos casos pudimos observar que Akt es activada a tiempos muy cortos. Por otra parte, pudimos observar que la fosforilación en Akt Ser473, a través del estímulo con LPA, es semejante a la fosforilación a través del estímulo con insulina, este dato nos sugiere que el LPA actúa de manera similar a la insulina en la línea celular C9, sobre la activación de Akt Ser473.

Se sabe que tanto el LPA como la insulina, en condiciones fisiológicas y normales, circulan en el torrente sanguíneo en concentraciones μ M, de tal manera que también realizamos ensayos de concentración respuesta, para evaluar la concentración adecuada que utilizamos en los experimentos; de igual manera, observamos que tanto la insulina como el LPA provocan la respuesta en nuestra línea celular, a diferentes concentraciones, incrementando la fosforilación de la Ser473 de Akt, lo cual nos sugiere que el efecto es dependiente de la concentración y en comparación con nuestros datos anteriores, observamos que tanto insulina como LPA tienen un efecto dependiente de la concentración y del tiempo.

El aspecto principal que se encontró en este trabajo, fue cuando las células fueron expuestas al LPA de manera previa a la insulina y evaluamos la fosforilación de los dos residuos de activación de Akt: observamos que en ambos casos el LPA incrementó la fosforilación, aunque la temporalidad de fosforilación fue diferente para cada residuo, pudimos observar que en el caso de la Ser473, ese incremento en la señal se mantiene por lo menos hasta los 60 minutos, con estos datos sugerimos que el LPA sensibiliza la señal de Akt en la línea celular C9. Por otra parte, la fosforilación de la Thr308 incrementa transitoriamente y disminuye después de los 15 minutos. Además, es el primer estudio en donde se observa que el tratamiento con LPA podría tener un efecto aditivo o sensibilizando de manera distinta la fosforilación de Akt de cada residuo y hasta el momento no hay reportes que sustenten su participación específica en respuestas metabólicas.

Con respecto a la activación de la vía de las MAPK, evaluamos la fosforilación de ERK1/2 Thr202/Tyr204, a través de un estímulo con insulina, en este resultado observamos,

como era de esperarse, que la insulina activara esta vía fosforilando a ERK1/2 a los pocos minutos, estos datos ya han sido reportados por diferentes grupos de investigación y en diferentes líneas celulares (Holmström, 2010; Kim, 2008).

Cuando evaluamos el efecto que produce el LPA en la activación de ERK1/2, observamos que, de igual manera, esta vía se activa en pocos minutos, ya que el LPA está muy relacionado con la proliferación y supervivencia celular, y la principal función de ERK1/2 está relacionada con la diferenciación celular y transcripción de genes. Estos datos concuerdan con lo reportado por el grupo de la Dra. Therese Holmström, el cual dice que el LPA fosforila a ERK1/2 en tiempos muy cortos en una línea celular de adipocitos; por otro lado, el Dr. Do Young Kim reportó que en una línea celular de epitelio de esófago de gato, ERK1/2 incrementó su señal a los 10 minutos; sin embargo, este grupo de investigadores utilizó una concentración menor (10 nM). Estos datos sugieren que en nuestra línea celular C9, el LPA tiene los mismos efectos que en cualquier otra línea celular de las ya reportadas, en el sistema de señalización de la vía de las MAPK.

De manera interesante, observamos en los datos obtenidos al evaluar la respuesta que tuvieron las células al ser preestimuladas con el LPA y posteriormente con insulina, la fosforilación de ERK1/2 incrementó, no de manera significativa, a los 15 minutos del preestímulo; sin embargo, después de los 30 minutos de preestímulo con LPA la señal disminuyó, este dato sugiere que el LPA estuviera actuando de manera negativa en la activación de ERK1/2 después de 30 minutos de exposición y posteriormente con insulina, sin embargo, los experimentos realizados no nos permiten saber si está ocurriendo esto.

Para determinar el mecanismo por el cual actúa el LPA sobre la activación de la vía de PI3K/Akt en la señalización por insulina, en el presente trabajo nos propusimos evaluar si la vía que sigue el LPA es la vía que es activada por la proteína Gi, o lo hace a través del receptor de insulina (IR) o del receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por el mecanismo determinado como transactivación de RTKs a través de GPCRs. Nosotros inhibimos a los receptores IR y EGFR y posteriormente hicimos un estímulo con LPA para determinar su participación, el resultado que obtuvimos nos sugiere que el LPA transactiva a los receptores de IR y EGFR en esta línea celular, estos datos concuerdan con los resultados de la Dra. Holmström donde en dos líneas celulares diferentes de adipocitos, el LPA transactiva al receptor de EGF fosforilando a ERK1/2; sin embargo, este grupo de

investigadores observó lo contrario en un cultivo primario de adipocitos, donde el LPA no transactivó al EGF.

Por último, se probó un antagonista para el receptor de LPA, ya que como recientemente se reportó por el grupo del Dr. García Sainz, en la línea celular C9 se encuentran de manera endógena LPARs (3 de los 5 descritos). Evaluamos si el efecto en la fosforilación de Akt Ser473 inducida por LPA, es bloqueada por el antagonista VPC 32183, que es específico para LPAR₁ y LPAR₃. Nuestros datos sugieren que el LPAR₁ pudiera tener mayor participación, el LPAR₃ se expresa menos, en la activación de Akt Ser473 en las células C9 y el LPAR₂ no es bloqueado por el VPC 32183. De tal manera que al seguir observando un ligero incremento en la fosforilación de Akt, aún cuando 2 de los 3 receptores están bloqueados por el VPC 32183, sugerimos que los LPARs 1,2 y 3 participan en la activación de Akt Ser473.

IX. Conclusiones

En conclusión nuestros resultados sugieren que el LPA podría tener un efecto aditivo sobre la activación de las vías de insulina, sin embargo, tenemos evidencias de que podría estar sensibilizando tanto a la vía PI3K/Akt y MAPK, al inhibirse la activación de Akt Ser473 cuando bloqueamos a IR y EGFR inducido con LPA. Aunque desconocemos los mecanismos por los cuales el LPA inicia sus efectos, en resumen podemos decir que:

- Los efectos de insulina y LPA en la vía de señalización de PI3K/Akt son dependientes del tiempo y la concentración.
- La insulina y el LPA tienen la capacidad de inducir la fosforilación de los dos residuos de activación de Akt (Ser473 y Thr308).
- La fosforilación de ERK1/2 es mediada por insulina y LPA.
- Los LPARs que se expresan de manera endógena en las células C9, posiblemente estén participando en la activación de Akt Ser473 de manera simultánea. Con nuestros datos, sugerimos que el LPAR₁ pudiera tener mayor participación en esa activación.
- Los receptores de IR y EGFR son transactivados por LPA.

X. Bibliografía

Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T. (2002). Serum Lysophosphatidic Acid Produced Through Diverse Phospholipase Pathways. *The Journal Biological Chemistry*. **277**:696-702.

Arellano PA. (2008). Regulación de las Funciones de la Insulina por la Angiotensina II: Inhibición de la señalización de la insulina por la Transactivación del Receptor EGF y un Aumento en la Fosforilación del IRS-1 en Ser636/639. *Tesis de Doctorado en la Especialidad de Bioquímica, CINVESTAV IPN, México D. F.* pp.72.

Avruch J. (1998). Insulin Signal Transduction Through Protein Kinase Cascades. *Mol Cell Biochem*. **182**:31-48.

Baker DL, Umstot ES, Desiderio DM, Tigyi GJ. (2000). Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid in Human Blood Fractions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **905**:267-269.

Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, Tigyi GJ. (2001). Direct Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid Molecular Species by Stable Isotope Dilution Electrospray Ionization Liquid Chromatography-mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. **292**:287-295.

Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, arai H, Inove K. (2000). Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptors of the EDG Family are Differentially Activated by LPA Species-Structure-Activity Relationship of Cloned LPA Receptors. *FEBS Letters*. **478**:159-165.

Bayascas JR, Wullschleger S, Sakamoto K, García-Martínez JM, Clacher C, Komander D, van Aalten DMF, Boini KM, Lang F, Lipina C, Logie L, Sutherland C, Chudek JA, van Diepen J, Voshol PJ, Lucoca JM, Alessi DR. (2008). Mutation of PDK1 PH Domain Inhibits PKB/Akt Leading to Small Size and Insulin-Resistance: Molecular and Cellular Biology. *PMCB*. **28**:3258-3272.

Cazaubon SM, Ramos-Morales F, Fischer S, Schweighoffer F, Strosberg AD, Couraud PO. (1994). Endothelin Induces Tyrosine Phosphorylation and Grb2 Association of Shc in Astrocytes. *J Biol Chem*. **269**:24805-24809.

Chan TO, Tschichlis PN. (2001). PDK2: A Complex Tail in One Akt. *Science signaling*. p.el

Chen Y, Grall D, Salcini AE, Pelicci PG, Pousségur J, van Obberghen-Schilling E. (1996). Shc Adaptor Proteins are Key Transducers of Mitogenic Signaling Mediated by the G Protein-Coupled Thrombin Receptor. *EMBO J*. **15**:1037-1044.

Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. (2002). International Union of Pharmacology XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacological Reviews*. **54**:265-269.

Coffer PJ, Burgering BM, Peppelenbosch MP, Bos JL, Kruijer W. (1995). UV Activation of Receptor Tyrosine Kinase Activity. *Oncogene*. **11**:561-569.

Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. (1997). Signal Characteristics of G Protein-Transactivated EGF Receptor. *EMBO J*. **6**:7032-7044.

Díaz CM. (2007). Determinantes Estructurales del Receptor Tipo 1 para el Factor Liberador de Corticotropinas en la Activación de las MPA Cinasas. *Tesis de Licenciatura UNAM Facultad de Ciencias.*

Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. (2006). Irs1 and Irs2 Signaling is Essential for Hepatic Glucose Homeostasis and Systemic Growth. *J Clin Invest.* **116**:101-114.

Downward J. (1998). Mechanisms and Consequences of Activation of Protein Kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* **10**:262-267.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID. (1985). The Human Insulin Receptor cDNA: The Structural Basis for Hormone-Activated Transmembrane Signaling. *Cell.* **40**:747-758.

Engelman JA, Lou J, Cantley LC. (2006). The Evolution of Phosphatidylinositol 3-Kinases as Regulators of Growth and Metabolism. *Nat Rev Genet.* **7**:606-619.

Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR. (1994). cAMP and Subunits of Heterotrimeric G Proteins Stimulate the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in COS-7 Cells. *J Biol Chem.* **269**:7851-7854.

Fischer DJ, Liliom K, Guo Z, Nusser N, Virag T, Murakami-Murofushi K, Kobayashi S, Erickson JR, Sun G, Miller DD, Tigyi G. (1998). Naturally Occurring Analogs of Lysophosphatidic Acid Elicit Different Cellular Responses Through Selective Activation of Multiple Receptor Subtypes. *Molecular Pharmacology.* **54**:979-988.

Galloway JA, Hooper SA, Spradlin CT. (1992). Biosynthetic Human Proinsulin. Review of chemistry, in vitro and in vivo receptor binding animal and human pharmacology studies, and clinical trial experience. *Diabetes care.* **15**:666-692.

Gerrard JM and Robinson P. (1989). Identification of the Molecular Species of Lysophosphatidic Acid Produced when Platelets are Stimulated by Thrombin. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1001**:282-285.

González AA, Avendaño VE, Cabrera WA, Tapia CD, Larrea F, García BR, García SA. (2008). Regulation of LPA Receptor Function by Estrogens. *Biochim Biophys Acta.* **1783**:253-262.

Goodman LS, Gilman JH, Gilman AG. (2001). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *New York: McGraw-Hill, Medical Pub.* 10th international ed. Division, cop 2001. Chapter 61 pp 1679.

Gueguen G, Gaige B, Grevy JM, Rogalle P, Bellan J, Wilson M, Klæbe A, Pont F, Simon MF, Chap H. (1999). Structure-Activity Analysis of the Effects of Lysophosphatidic Acid on Platelet Aggregation. *Biochemistry.* **38**:8440-8450.

Gribble FM. (2005). Metabolism a Higher Power for Insulin. *Nature.* **434**:965-966.

Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H. (2002). Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptors are Activated Differentially by Biological Fluids: Possible Role of LPA-Binding proteins in Activation of LPA Receptors. *FEBS Letters.* **523**:187-192.

Holmström ET, Mattson LC, Wang Y, Iakovleva I, Petrovic N, Nedergaard J. (2010). Non-Transactivational, Dual Pathways for LPA-Induced Erk1/2 Activation in Primary Cultures of Brown Pre-Adipocytes. *Experimental Cell Research*. **316**:2664-2675.

Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Kempainen J, Solin O, Ferrannini E, Knuut J, Nuutila P. (2003). Insulin-Mediated Hepatic Glucose Uptake is Impaired in Type 2 Diabetes: Evidence for a Regulation with Glycemic Control. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. **88**:2055-2060.

Kahn CR, Crettaz M. (1985). Insulin Receptors and the Molecular Mechanism of Insulin Action. *Diabetes Metab rev*. **1**:1-2.

Kenebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P. (1996). Dehydrophorylation of Receptor Tyrosine Kinases as Target of Regulation by Radiation, Oxidants or Alkylating Agents. *EMBO J*. **15**:5314-5325.

Kido Y, Nakae J, Accili D. (2001). The Insulin Receptor and its Cellular Targets. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. **86**:972-979.

Kim DY, Song HJ, Jeong JH, Suh JS, Sohn UD. (2008). Regulation of Lysophosphatidic Acid-Induced COX-2 Expression by ERK1/2 Activation in Cultured Feline Esophageal Epithelial Cells. *Archives Pharmacol Research*. **31**:1331-1338.

Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RB. (1994). Direct Evidence that Gi-coupled Receptor Stimulation of Mitogen-Activated Protein kinase is Mediated by G Activation of p21^{ras}. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**:12706-12710.

Kolakowsky LF Jr. (1994). GCRDb: A G-Protein Coupled Receptor Database. *Receptors Channels*. **2**:1-7.

Kondapaka SB, Zarnowski M, Yver DR, Sausville EA, Cushman SW. (2004). 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) Inhibition of Akt Thr308 But Not Ser473 Phosphorylation: A Basis for Decreased Insulin-Stimulated Glucose Transport. *Clinical Cancer Research*. **10**:7192-7198.

Langhans W. (2003). Role of the Liver in the Control of Glucose-Lipid Utilization and Body Weight. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **6**:449-455.

Lawlor MA, Alessi DR. (2001). PKB/Akt: A Key Mediator of Cell Proliferation, Survival and Insulin Responses?. *J Cell Sci*. **114**:2903-2910.

Lefkowitz RJ and Shenoy SK. (2005). Transduction of Receptor Signals by Beta-Arrestins. *Science*. **308**:512-517.

LeRoith D, Taylor S, Olefsky J. (2003). Diabetes Mellitus Texto Básico y Clínico 2ª Edición. Editorial Mc Graw Hill México D.F.

McCarthy AM and Elmendorf JS. (2007). GLUT4's Itinerary in Health & Disease. *Indian J Med Res*. **125**:373-388.

Minneman KP. (2007). Heterodimerization and Surface Localization of G Protein Coupled Receptors. *Biochemical Pharmacology*. **73**:1043-1050.

Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. (2004). The ins and outs of Lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays*. **26**:870-881.

Morisco C, Condorell G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B. (2005). Akt Mediates the Cross-Talk Between Beta-Adrenergic and Insulin Receptors in Neonatal Cardiomyocytes. *Circulation Research*. **96**:180-188.

Mu-En L, Deron RH, Jerold C. (2010). Lysophosphatidic Acid (LPA) Receptors: Signaling Properties and Disease Relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* . **91**:130-138.

Myers MG Jr and White MF. (2002). The Molecular Basis of Insulin Action. En: Insulin Signaling: From Cultured cells to animal models. *Editor: Gruenberg G, Zick Y, Taylor and Francis, New York*. pp 55-87.

Patel S, Doble B, Woodgett JR. (2004). Glycogen Synthase Kinase-3 in Insulin and Wnt Signalling: A Double-Edged Sword?. *Biochem Soc Trans*. **92**:803-808.

Olivares RJ and Arellano PA. (2008). Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *Fac Med UNAM*. **27**:9-18.

Rivera J and Chun J. (2008). Biological Effects of Lysophospholipids. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*. **160**:25-46.

Romero JM. (2010). Identificación del Receptor del Ácido Lisofosfatídico en Poblaciones Mononucleares Aisladas de Sangre Periférica y su Papel en la Esclerosis Múltiple. *Tesis de Doctorado Universidad de Granada*.

Rosen CM. (1987). After Insulin Binds. *Science*. **237**:1452-4821.

Rosen LB and Greenberg ME. (1996). Stimulation of Growth Factor Receptor Signal Transduction by Activation of Voltage-Sensitive Calcium Channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**:1113-1118.

Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P, Rohmsdorf J. (1994). Involvement of Growth Factor Receptors in the Mammalian UVC Response. *Cell*. **78**:963-972.

Sadoshima J and Izumo S. (1996). The heterotrimeric Gq Protein-Coupled Angiotensin II Receptors Activate p21^{ras} Via Tyrosine Kinase-Shc-Grb2-Sos Pathway in Cardiac Myocytes. *EMBO J*. **15**:775-787.

Saltiel AR and Kahn CR. (2001). Insulin Signaling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*. **414**:799-806.

Sánchez LE, Arias-Montaña JA. (2004). Transactivación de Receptores con Actividad de Cinasa de Tirosina (RTKs) por Receptores Acoplados a Proteínas G. *Rev Biomed*. **15**:33-48.

Sano T, Baker DL, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G. (2002). Multiple Mechanisms Linked to Platelet Activation Result in Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate Generation in Blood. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**:21197-21206.

Srivastava AK and Pandey SK. (1998). Potential Mechanism(s) Involved in the Regulation of Glycogen Synthesis by Insulin. *Mol Cell Biochem*. **182**:135-141.

Stacy LS and Matthew SH. (2009). Regulation of Insulin Action by Diet and Exercise. *Rev Journal of Equine Veterinary Science*. **29**:274-284.

Steiner DF, Bell Gi, Tager Hs. (1990). Chemistry and Biosynthesis of Pancreatic Protein Hormones. *DeGroot LG, Endocrinology Philadelphia, WB Saunders, Harcourt Brace Jovanovich.* **1990**:1263.

Sugiura T, Nakane S, Kishimoto s, Waku K, Yoshioka Y, Tokumura A. (2002). Lysophosphatidic Acid, a Growth Factor-Like Lipid, in the Saliva. *Journal of Lipid Research.* **43**:2049-2055.

Sweatt JD. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinases in Synaptic Plasticity and Memory. *Curr opin Neurobiol.* **14**:311-317.

Tigyi G and Parrill AL. (2003). Molecular Mechanisms of Lysophosphatidic Acid Action. *Progress in Lipid Research.* **42**:498-526.

Tokumura A. (1995). A Family of Phospholipid Autacoids: Occurrence. *Progress in Lipid Research.* **34**:151-184.

van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, Moolenaar WH. (1993). Pertussis Toxin-sensitive Activation of p21 ras by G Protein-coupled Receptor Agonists in Fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:1257-1261.

Virkanaki A, Veki K, Kahn CR. (1999). Protein-protein Interaction in Insulin Signaling and the Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *J Clin Invest.* **103**:931-943.

Yea K, Kim J, Lim S, Park SH, Suh GP, Ryu HS. (2008). Lysophosphatidic Acid Regulates Blood Glucose by Stimulating Myotube and Adipocyte Glucose Uptake. *J Mol Med.* **86**:211-220.

Youngren J. (2007). Regulation of Insulin Receptor Function. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **64**:873-889.

