



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**“Efecto del Factor Liberador de Corticotropina sobre las acciones del Factor de  
Crecimiento Similar a la Insulina a nivel de la vía de las MAP cinasas”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

MAYÉN RUÍZ MARIANA

TUTOR: Dr. JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres María Eugenia y Javier que han estado en todo momento apoyando mis decisiones buenas o malas, pero siempre respetándome como persona, infinitas gracias porque son años de constancia a mi lado. Gracias por toda la tolerancia, la paciencia, por los consejos y por los límites perfectamente marcados que me enseñaron a respetar normas y hoy hacen esto que soy. Los amo.

A mi hermana, por escucharme todas esas noches en que cuento todo mi día, por guiarme cuando tengo ganas de correr en dirección opuesta, y mejor aún, por correr junto a mí gracias.

A toda mi familia Ruíz porque están sin necesidad de pedirlo.

A mi tutor de tesis, el Dr. Olivares por aceptarme en su laboratorio, por la paciencia y los conocimientos que compartió conmigo. A la Bióloga Judith Hernández por su apoyo en el laboratorio y por todo el tiempo que me dedico y a Roberto por el apoyo técnico y su amistad.

A los amigos del laboratorio Moni, Gustavo y Lucecita, a los amigos de la carrera, especialmente a Bre y a mi amiga de toda la vida Kareen.

## ÍNDICE

### Abreviaturas

<b>Resumen</b>	8
<b>Introducción</b>	9
El factor liberador de corticotropina y sus acciones.	9
El CRF <sub>1</sub> R y su distribución.	11
El CRF, sus análogos y sus receptores.	12
El CRF <sub>1</sub> R y sus rutas de señalización	14
El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, sus acciones y su distribución	16
El IGF-1, su receptor y sus vías de señalización.	17
<b>Antecedentes</b>	22
<b>Hipótesis</b>	25
<b>Objetivos</b>	25
<b>Material y métodos</b>	26
Cultivo celular	26
Transfección celular	27
Detección de proteínas mediante ensayos de inmunodetección Western Blot	27
<b>Análisis de resultados</b>	30
<b>Resultados</b>	31
El CRF induce la activación de ERK1/2	31
El IGF-1 induce la activación de ERK 1/2	32
El CRF inhibe la fosforilación de ERK 1/2 inducida por IGF-1	33

El CRF inhibe la fosforilación de la proteína Shc inducida por IGF-1	34
El CRF altera la fosforilación del receptor de IGF-1	36
$\beta$ -arrestina2 puede estar participando en la desensibilización del sistema de IGF-1	37
Las fosfatasas pueden intervenir en la transinhibición ejercida por el CRF sobre el IGF-1	39
La proteína PKA participa en el sistema de transinhibición del CRF hacia IGF-1	41
<b>Discusión</b>	42
<b>Conclusiones</b>	46
<b>Bibliografía</b>	47

## ABREVIATURAS

AC	AdenilCiclase
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa (del inglés Adenocorticotropic Hormone)
ATP	Adenosina Trifosfato
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CRF	Factor Liberador de Corticotropina (del inglés CorticotropinReleasing Factor)
CRF1R Y CRF2R	Receptores tipo 1 y tipo 2 para CRF
C-terminal	Extremo Carboxilo Terminal
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés EpidermalGrowth Factor)
ERK	Cinasas Reguladoras de Señales Extracelulares (del inglés Extracellular-signal-regulatedkinases 1 y2)
GAP	ProteínaActivadora de GTPasas (del inglés GTPaseActivatingProtein)
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G (del inglés G-ProteinCoupled Receptor)
Grb2	Proteína 2 de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento (del inglés Growth factor receptor-boundprotein 2)
GRK	Cinasa de los Receptores Acoplados Proteínas G (del inglés coupled Receptor Kinase)
HPA	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenales (del inglés

	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis)
IGF-1	Factor de Crecimiento Relacionado con la Insulina-1 (del inglés InsulinLikeGrowth Factor-1)
IP3	1,4,5-inositol trisfosfato
IRS-1	Sustrato del Receptor de Insulina-1 (del inglés Insulin Receptor Substrate-1)
JNK	Cinasa de la proteína c-Jun (del inglés c-Jun kinase)
MAPK	Cinasa de Proteínas Activadas por Mitógenos (del inglés Mitogen-ActivatedProteinKinase)
MEK	Cinasa de la proteína MAPK (del inglés Mitogen-ActivatedProteinKinaseKinase)
MEKK	Cinasa de la proteína MEK (del inglés Mitogen-ActivatedProteinKinaseKinaseKinase)
mTOR	Cinasa Blanco de la Rapamicina en Mamíferos (del inglés Mammalian target of rapamycin)
N-terminal	Extremo Amino Terminal
NPY	Neuropéptido Y
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa
PKA	Proteína cinasa A (del inglés ProteinKinase A)
PKC	Proteína cinasa C (del inglés ProteinKinase C)
PLC	Fosfolipasa C (del inglés Phospholiphase C)
POMPK	Proopiomelanocortina
RTKs	Receptores con actividad de cinasa de tirosina (del inglés TyrosineKinasesReceptors)

Shc	Proteína con homología a Src y parecida al Colágeno (del inglés SrcHomologous and Collagen-LikeProtein)
SH2	Dominio con homología a Src 2 (del inglés SrcHomology 2 domain)
SVG	Sauvagina
URO	Urotensina I
UCN I-III	Urocortina tipo 1-3



## RESUMEN

El estrés es un estímulo al que el organismo responde mediante la síntesis y secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) en el hipotálamo. Éste péptido se une a su receptor, perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, para promover el inicio de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Cuando el estrés se presenta de manera crónica hay una sobreactivación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, esto puede desencadenar enfermedades como la anorexia nerviosa, la depresión y la ansiedad. Por otro lado, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo uno (IGF-1), es un péptido relacionado con el desarrollo y supervivencia celular. Estas acciones las lleva a cabo al unirse a su receptor con actividad de tirosina cinasa que desencadena la vía de señalización de las cinasas reguladoras de señales extracelulares 1 y 2. Además, se ha reportado que niveles bajos del IGF-1 están relacionados a patologías como anorexia nerviosa, y depresión. Lo anterior indica que hay una interacción entre estos sistemas, y se sabe que el CRF ejerce una regulación negativa sobre la liberación del IGF-1. En el presente trabajo se trató de dilucidar el papel del CRF en la regulación negativa a nivel molecular de las acciones del IGF-1, si esta regulación se da a nivel del receptor y que proteínas pueden estar involucradas. Para esto se utilizó la línea celular proveniente de ovario de hámster chino, que expresa de manera endógena al receptor para IGF-1; sin embargo, no expresa al receptor para CRF, por lo tanto se realizaron transfecciones transitorias con la secuencia del CRF<sub>1</sub>R. Los datos que se obtuvieron indican que el CRF y el IGF-1 pueden activar a la vía de las MAPK cinasas y dicha fosforilación es dependiente del tiempo; que la transinhibición del sistema se da a nivel del receptor para IGF-1 y de la proteína adaptadora Shc. La proteína cinasa A no participa en la transinhibición, mientras que las fosfatasas de tirosina regulan de manera negativa al IGF-1; y que la proteína  $\beta$ -arrestina 2 puede participar en la transinhibición ejercida por CRF al sistema del IGF-1.

## **INTRODUCCIÓN**

Los diferentes sistemas que conforman a los seres vivos no funcionan de manera aislada, estos sistemas están en constante comunicación para lograr responder a diversos estímulos y mantener al organismo en homeostasis. Sin embargo, esto se dificulta cuando algún estímulo se genera de manera crónica y el organismo se ve afectado, pudiendo generar diversas patologías (Joseph-Bravo y Gortari 2007; Naranjo 2009).

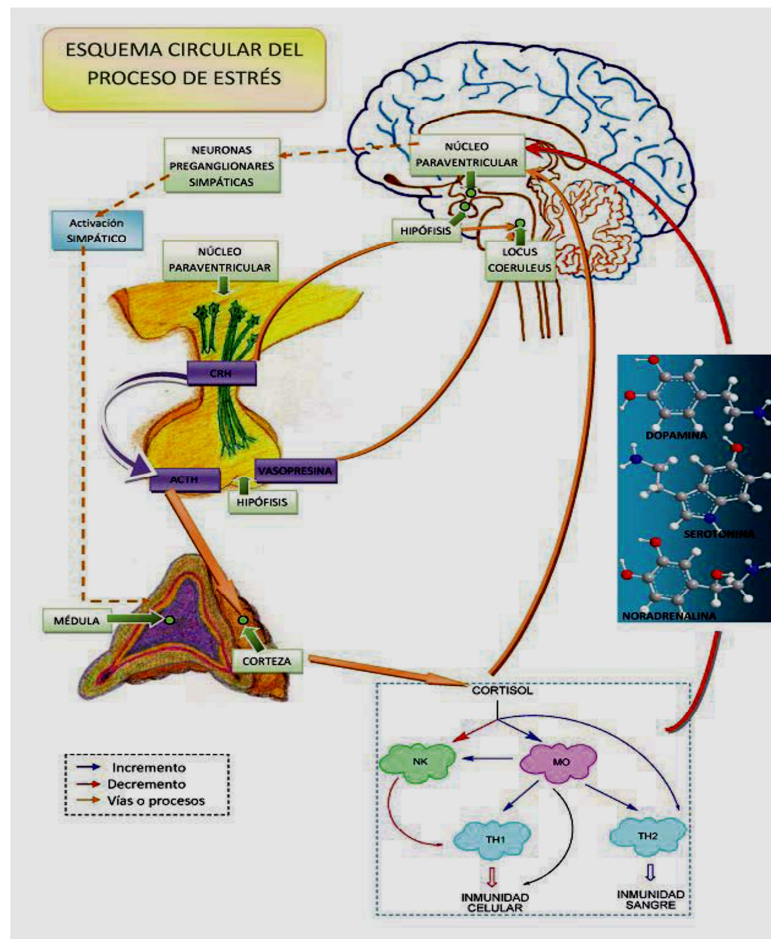
El estrés es percibido como un estado de amenaza al que el organismo reacciona mediante la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Charmandari et al., 2005 y Moya-Albiol et al., 2005), debido a que áreas específicas del Sistema Nervioso Central (SNC) están involucradas en la homeostasis, recibiendo información de los cambios periféricos intracelulares y extracelulares, desempeñando un papel integrativo en la respuesta a dichos cambios (Ruginsk et al., 2009; Gert et al., 2006).

Uno de los aspectos más interesantes de los sistemas biológicos es conocer la manera en que las células perciben y responden adecuadamente a diversos estímulos, esta respuesta puede estar mediada por un sin fin de sustancias endógenas de diversa naturaleza (Kawasaki et al., 2009).

### **El factor liberador de corticotropina y sus acciones**

El factor liberador de corticotropina (CRF) es un péptido de 41 aminoácidos, fue aislado de hipotálamo ovino y estructuralmente caracterizado en 1981 (Martínez et al., 2002). Se sabe que las neuronas del sistema límbico inciden sobre neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, donde es sintetizado el CRF y posteriormente liberado como respuesta a un estímulo estresante (figura 1), participando así en la activación del eje HPA. El CRF llega a la pituitaria por la circulación portal y libera a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que viaja por torrente sanguíneo a la glándula adrenal provocando la liberación de glucocorticoides (Cassano y Argibay, 2010). Los glucocorticoides no solo regulan la respuesta al estrés, también están involucrados en el

mecanismo metabólico e inmunológico, movilizan las reservas de energía, mantienen la presión arterial y ejercen un control negativo sobre el eje HPA (Barr et al., 2008; Choi et al., 2007; Galli et al., 2008; Atkinson et al., 2008).



**Figura1: Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.** La activación del eje HPA se inicia como un mecanismo de respuesta al estrés en el núcleo paraventricular del hipotálamo por las neuronas hipofisiotróficas. El CRF es secretado en dicho núcleo a través de los vasos portales a la adenohipófisis. El CRF entra al sistema circulatorio que une al hipotálamo con la pituitaria y se libera ACTH, posteriormente se estimula la liberación de glucocorticoides por parte de las glándulas adrenales, y finalmente el encendido del eje es regulado por retroalimentación negativa. (Imagen modificada de Sánchez et al., 2008).

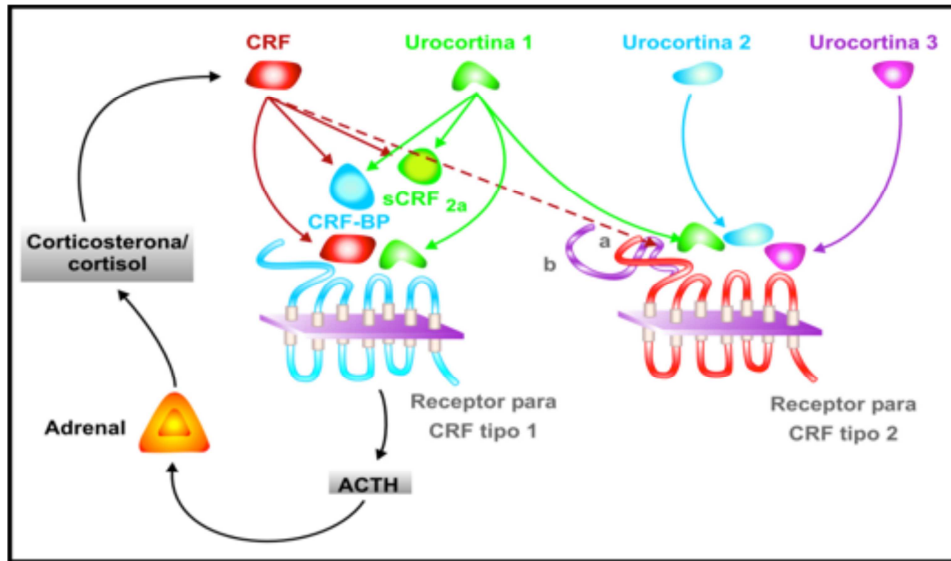
## **El CRF<sub>1</sub>R y su distribución**

El receptor para CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub> pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales, también conocidos como receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos receptores están constituidos por una sola cadena de aminoácidos que cruza siete veces la membrana celular. Los GPCRs se componen de tres dominios funcionales, uno de ellos es el extremo N-terminal localizado en la región extracelular y es responsable de la unión del agonista y la activación del receptor; el segundo dominio es la región intracelular que se conforma de las asas y el extremo carboxilo terminal, esta región también permite la regulación del receptor ya que está expuesta a proteínas como las cinasas y la  $\beta$ -arrestina que se encargan de la sensibilización, desensibilización e internalización de los GPCRs, y el tercer dominio está constituido por las asas que se encuentran en la membrana (Sánchez-Lemus y Arias-Montaña., 2004).

Los receptores para CRF<sub>1</sub> se expresan ampliamente en cerebro, hipotálamo, sistema límbico, núcleo coeruleus, pituitaria y el tracto gastrointestinal (Zorrilla et al., 2003; Valenzuela-Harrington et al., 2007; Ugolini et al., 2008). Sin embargo, hay evidencia creciente que indica que el CRF y los péptidos relacionados actúan como moduladores locales del estrés en órganos periféricos y en órganos endócrinos (Zmijewski et al., 2007; Markovic et al., 2007). También, se sabe que el CRF contribuye al comportamiento y la respuesta autónoma del estrés (Liu. et al., 2004; Matsuda et al., 2011), esto debido a que es un factor de activación del eje HPA y una exposición crónica al estrés puede resultar en una serie de cambios biológicos y alteraciones, que desencadena en diferentes enfermedades (Dunn y Swiergiel., 2008; Stengel y Taché., 2009).

### **El CRF, sus análogos y sus receptores.**

El CRF es miembro de una familia de péptidos con estructura y actividad biológica similares. En esta familia se encuentra la urocortina uno (UCN I, de 40 aminoácidos) la urocortina dos (UCN II, de 38 aminoácidos) y la urocortina tres (UCN III, de 38 aminoácidos). También se agrupa a las urotensina 1, (UTn1), urotensina 2 (UTn2), la urotensina 3 (UTn3) y la sauvagina (Svg). Dicha familia de péptidos tiene una distribución filogenéticamente amplia debido a que el CRF y las urocortinas se encuentran en anfibios y mamíferos, las urotensinas en peces, anfibios y mamíferos, y las sauvagina en anfibios (Dautzenberg y Hauger 2007; Fekete y Zorrilla 2007; Yhang et al., 2010; Ronan y Summers 2011). Todos estos péptidos median sus acciones a través de la unión a dos principales receptores el CRF<sub>1</sub>R y el CRF<sub>2</sub>R; sin embargo, se ha reportado que existe un tercer tipo de receptor, el CRF<sub>3</sub>R localizado en peces. No obstante, la unión de los péptidos a estos receptores no es inespecífica (figura 2), la UCN I y el CRF presentan mayor afinidad por el receptor tipo uno y las UCN II y III son selectivas para el receptor tipo dos (Li et al., 2002; Abuirmeileh et al., 2007; Wang y Li, 2007).



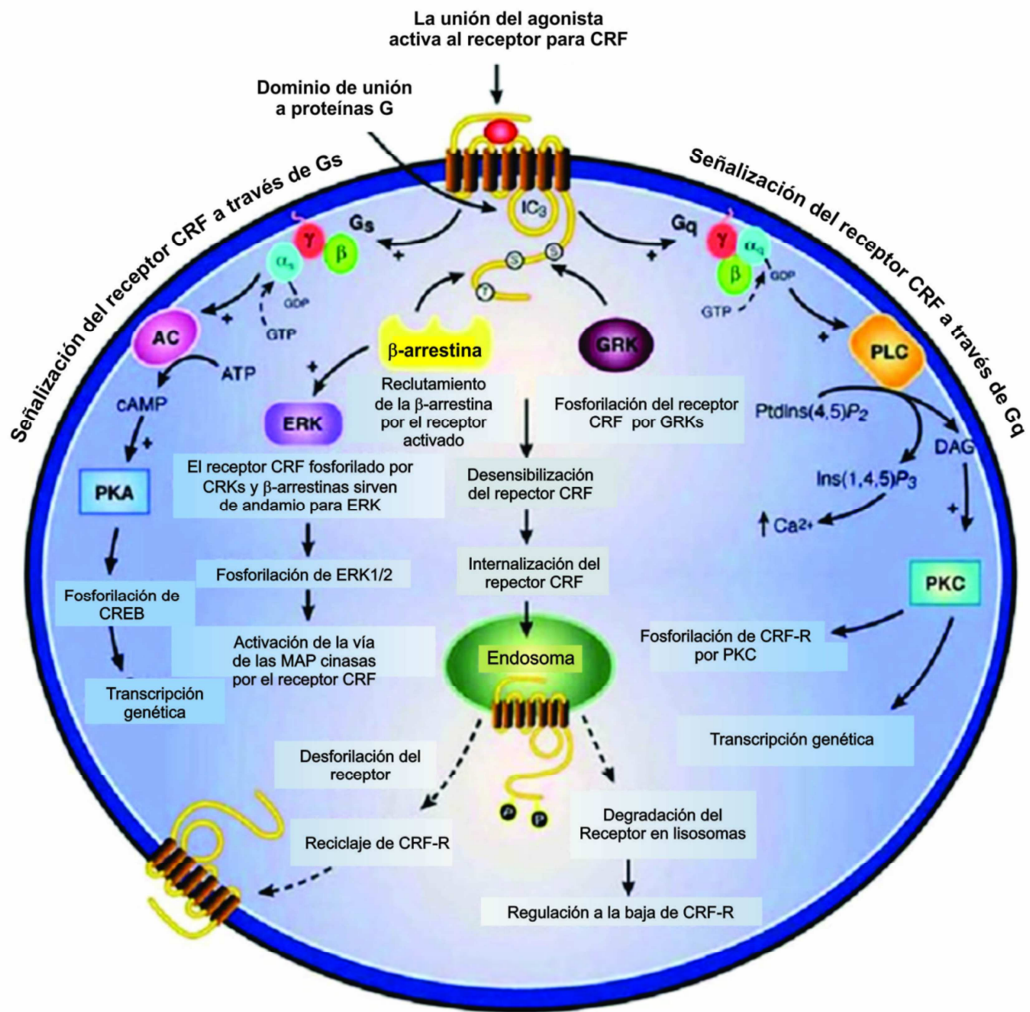
**Figura 2: Receptores CRF<sub>1</sub>, CRF<sub>2</sub> y sus ligandos.** Los receptores para el CRF y sus análogos muestran una similitud del 70% y pertenecen a la familia A de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. El CRF y las Ucn1, Ucn2 y Ucn3 presentan una similitud de 45%-48%. Sin embargo, las urocortinas 2 y 3 son afines únicamente al CRF<sub>2</sub>R, la urocortina 1 es afín para ambos receptores y el CRF es afín para ambos receptores aun que presenta mayor afinidad por el CRF<sub>1</sub>R (imagen modificada de Taché y Bonaz, 2007).

## **El CRF<sub>1</sub>R y sus rutas de señalización.**

La señalización se desencadena una vez que el CRF se une a su receptor, el CRF<sub>1</sub>R generando un cambio conformacional del mismo, lo que permite el intercambio de guanosíndifosfato (GDP) por guanisíntrifosfato (GTP) mediante la interacción con las proteínas heterotriméricas recambiatoras de nucleótidos de guanina o G triméricas que constan de tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Estas proteínas fueron nombradas así porque son proteínas fijadoras de moléculas de guanina y son muy importantes en las rutas de señalización, debido a que actúan como transductores de los receptores. Las proteínas G se acoplan a la porción C-terminal y el asa 3-4-citoplasmática de los receptores, sin embargo, el acople de una proteína G para una señalización intracelular requiere de una estructura específica de las asas y la región C-terminal del receptor (Zmijewske et al., 2007).

Debido a la similitud de las subunidades  $\alpha$  las proteínas se clasifican en Gs si estimula la actividad de la adenilatociclasa, Gi si inhibe a la adenilatociclasa, Gq si activa a la fosfolipasa C y G12/13 si activan a proteínas G pequeñas.

La subunidad  $\alpha$  unida al GTP interactúa con efectores como la adenilatociclasa, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C y los canales de calcio y potasio, que subsecuentemente resulta en la producción o disminución del adenosínmonofosfato cíclico (AMPc), guanosínmonofosfato cíclico (cGMP), inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y cambios en el potencial de membrana (Alistair, 2007; Grammatopoulos y Crhrousos, 2002; Hillhouse y Grammatopoulos, 2006).



**Figura 3: Vías de señalización activadas por CRF<sub>1</sub>R y CRF<sub>2</sub>R.** Hay evidencia que indica que los receptores CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub> pueden acoplarse a diferentes proteínas G. en el caso de su interacción con Gs se estimula a la adenilato ciclasa y como segundo mensajero se tiene AMPc; para el caso de Gq se regula la actividad de la fosfolipasa C, y como segundos mensajeros se obtienen IP<sub>3</sub> y DAG (imagen modificada de Olivares-Reyes et al., 2006).



Dentro de las vías de señalización en las que el CRF está implicado, está la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), particularmente las cinasas reguladas por señales extracelulares o ERK. Estas cinasas pertenecen a una subfamilia compuesta por dos isoformas de 42 y 44 kDa cada una (ERK 1/2). Son cinasas de proteínas serina/treonina ampliamente conservadas, implicadas en procesos como supervivencia, neurogénesis, cambios en la transmisión sináptica, proliferación y movilidad celular, además de ser un regulador importante del eje HPA y estar implicadas con la expresión del polipéptido proopiomelanocortina (POMC, que es el precursor de la ACTH), y en la regulación de la expresión génica. La cascada de señalización puede estar mediada por Gs, Gq, G12 y Gβγ (Van et al., 2009; Bhawanji et al., 2007; Conde de la Rosa et al., 2008; Mejía et al., 2009). Se ha reportado que esta familia de cinasas tiene un papel importante en la transducción de señales en células eucariontes.

#### **El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, sus acciones y su distribución.**

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) tiene dos isoformas: (IGF-1 e IGF-2) de 7 y 8 kDa, respectivamente; fueron nombrados así por la similitud estructural que presentan con la insulina y forman parte de la familia de factores de crecimiento cuyas acciones desencadenan la proliferación celular. El IGF-1 está constituido por una sola cadena polipeptídica de 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro intracatenarios. Los residuos 1 a 29 del IGF-1 presentan grandes homologías con los residuos 2 a 30 de la cadena β de la insulina, y los residuos 42 a 62 son homólogos a los aminoácidos 1 a 21 de la cadena A de la insulina. A pesar de la similitud que se presenta entre el IGF-1 y la insulina, cuando estos se unen a su receptor específico los efectos son distintos ya que la insulina promueve principalmente el metabolismo de la glucosa, mientras que el IGF-1 desencadena acciones relacionadas con el crecimiento y proliferación celular (Boucher et al., 2010).

El IGF-1 es uno de los factores de crecimiento más importantes debido a que regula el crecimiento prenatal y posnatal, la proliferación, la sinaptogénesis, la supervivencia celular, el desarrollo e implantación a nivel del endometrio e induce la migración de las células endoteliales (Vivas et al., 2005; Gomes de Souza et al., 2009; Pandey et al., 2009).

La síntesis del IGF es estimulada por la hormona del crecimiento (GH), que es segregada por las células somatotrofas de la hipófisis anterior; sin embargo, el aporte dietético, energético y proteico forman parte del proceso de síntesis. Los hepatocitos tienen receptores para la GH, y al ser estimulados aumentan la transcripción del gen de IGF-1. La síntesis y liberación del IGF se da cuando este actúa sobre la pituitaria inhibiendo a la GH, además de provocar la liberación hipotalámica de somatostatina. De esta forma se establece un circuito de retroalimentación negativa entre el IGF-1 y la GH (Bayes-Genis et al., 2000; Lima et al., 2009).

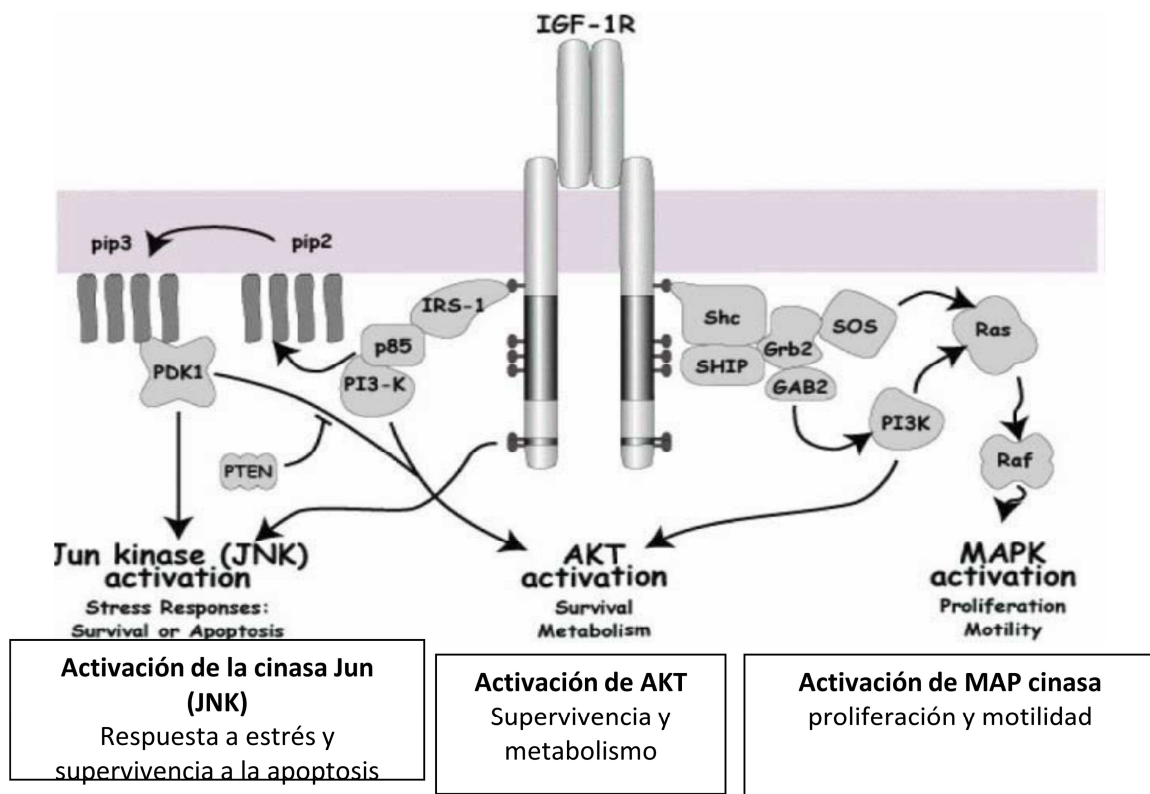
El IGF-1 se sintetiza en el intestino, riñón, pulmón, corazón, testículos y SNC; sin embargo, el principal lugar de síntesis durante la vida adulta es el hígado, a diferencia del desarrollo fetal en el que casi todos los tejidos tienen la capacidad de sintetizarlo (Belfiore y Frasca, 2008).

### **El IGF-1, su receptor y sus vías de señalización.**

Los efectos del IGF-1 se deben a la activación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs). Una vez que el IGF-1 se une a su receptor (IGF-1R), se desencadena una autofosforilación cruzada en sitios de tirosina entre las subunidades  $\beta$  del receptor. Esta autofosforilación se presenta en los residuos de tirosina 950, 1003, 1131, 1135, 1136, 1250, 1251 y 1316. La fosforilación de dichos residuos del receptor permite el acople de proteínas como IRS-1, IRS-2, Shc y Grb10 (Playford et al., 2000).

La activación del IGF-1 y su vía de señalización están fuertemente implicadas en patologías como el cáncer y desórdenes alimenticios como la anorexia nerviosa, que se asocia a bajos

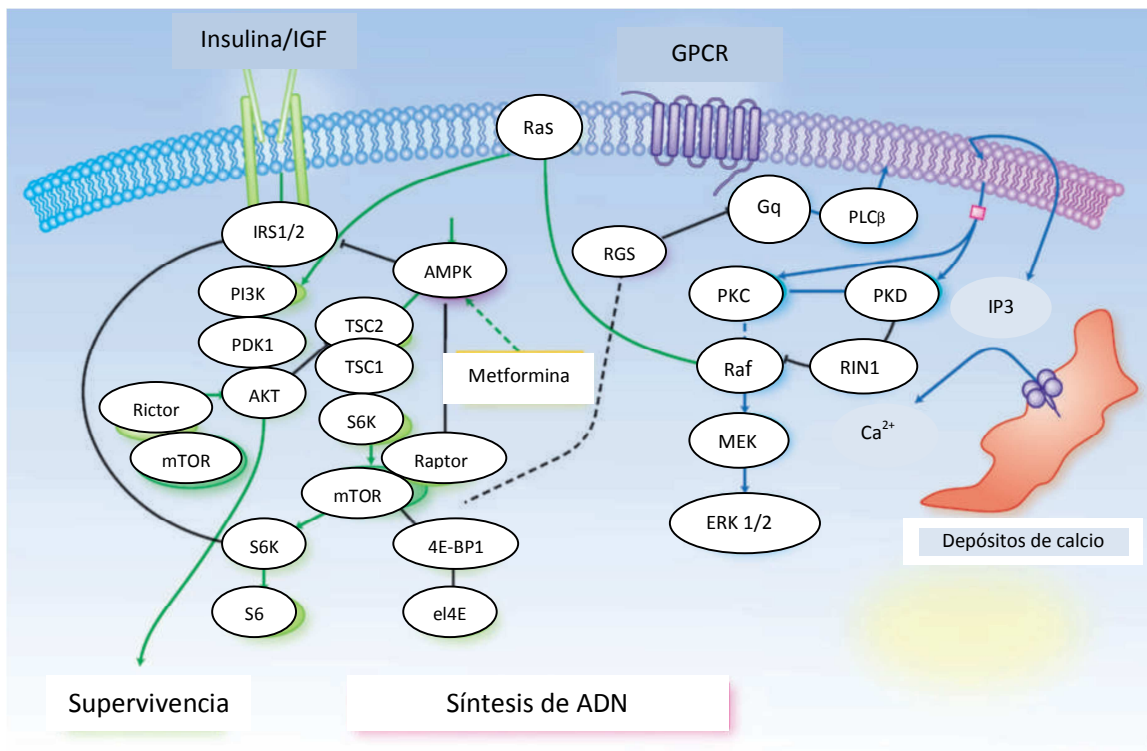
niveles del IGF-1; este desorden psicológico es caracterizado por malnutrición progresiva (Sierra et al., 2006). Si la ingesta calórica es inferior a 12 kcal/kg se desarrolla insensibilidad fisiológica de la GH como mecanismo adaptativo, debido a la reducción de sus receptores periféricos, particularmente hepáticos, y consecuentemente se deja de favorecer la expresión del gen del IGF-1 por lo que las concentraciones de este son menores (Muñoz y Argente, 2002; Calzada, 2005).



**Figura 4: Vías de señalización activadas por IGF-1R.** Una vez que el IGF-1 se une a su receptor, este se autofosforila de forma cruzada y permite el acople de proteínas como IRS y Shc. Estas proteínas se fosforilan y sirven como reclutadoras, de esta manera se forman complejos proteicos que permiten activar de p85, PI3K y AKT, y se ha descrito que esta vía está asociada a supervivencia celular. De igual manera se puede formar otro complejo proteico en el que interviene Grb2 y SOS, para después activar la vía de las MAPK cinasas que media los efectos del crecimiento celular. La proteína Shc recluta sustratos que encienden la vía de JNK (Imagen modificada de Kiely et al., 2004).

Por otra parte, existe un proceso de comunicación entre sistemas de receptores para factores de crecimiento como el de EGF, el de la insulina y el de IGF-1, que interactúa a nivel molecular con el sistema de receptores acoplados a proteínas G. Este proceso de comunicación entre receptores de membrana, también conocido como transactivación y transinhibición, ha generado un amplio campo de estudio y en los últimos años se ha demostrado que no es exclusivo de un tipo celular o GPCRs particulares, y que el GPCR puede estar participando mediante un acoplamiento a Gq o G $\alpha$  (Hus-Citharl et al., 2010; Taboubi et al., 2010).

Como se mencionó las investigaciones acerca de la transactivación de RTKs abrió un gran campo donde se demostró que G $\alpha$ q de los GPCRs induce la fosforilación de la proteína Shc y esto permite la formación del complejo Shc-Grb2 (Sánchez-Lemus y Arias-Montaña, 2004). Además, de haber sido identificados en este proceso de comunicación cruzada, los receptores para factores de crecimiento y los receptores acoplados a proteínas G son asociados a diversas enfermedades como la diabetes tipo dos y diferentes tipos de cáncer(Hus-Citharl et al., 2010; Taboubi et al., 2010).



**Figura 5: Proceso de comunicación cruzada entre vías de transducción de señales.** La activación sinérgica de mTOR se da a través del encendido de la vía PI3K/AKT, que se desencadena de la activación de la PLC/PKD/ERK que es activada por la proteína Gq. Siendo así mTOR el punto de convergencia entre las dos vías de señalización (Imagen modificada de Rozengurt et al., 2010).

## **ANTECEDENTES**

El CRF es el principal péptido anorexigénico cuya secreción puede estimular al neuropéptido Y (NPY), que está relacionado con las alteraciones del sistema de estrés pues es uno de sus principales efectores junto con la arginina-vasopresina y los péptidos derivados de POMC; sin embargo, una respuesta inadecuada del sistema puede derivar en enfermedades metabólicas, endocrinas e incluso desencadenar trastornos psicológicos. Todo esto debido a que tiene implicaciones neuroendocrinas que pueden adaptar al eje HPA y generar estados de patología. Este desequilibrio del encendido crónico del eje HPA, causado por el CRF, está fuertemente asociado con enfermedades como la anorexia nerviosa cuyo origen es psicológico, ya que los alimentos pueden estar presentes y disponibles. No obstante, este padecimiento es una respuesta conductual de adaptación al desequilibrio metabólico (Charmandari et al., 2005; De Gortari, 2009).

La exposición crónica al estrés puede inducir adaptaciones en los sistemas de CRF hipotalámicos y extra hipotalámicos, lo cual puede resultar en alteraciones del comportamiento y de algunas respuestas fisiológicas debido a que el CRF puede actuar a nivel central inhibiendo el apetito (Seres et al., 2004; Zopf et al., 2009). También se ha reportado que el CRF, en concentraciones elevadas, inhibe la actividad de la aromatasas y suprime la esteroidogénesis ovárica. Estos efectos supresores del CRF en la liberación de estrógeno ovárico pueden ser mediados por una disminución en la producción de IGF-1 (Calogero et al., 1998). La liberación del CRF puede modular la función gonadal durante el estrés e inhibir la liberación de estrógenos e IGF-1 en células de la granulosa de rata (Calogero et al., 2002).

En el 2008 Neumann y colaboradores reportaron que existe una relación entre los estudios a nivel molecular y los estudios fisiológicos y etológicos, en los que el estrés se ve involucrado. Este grupo de investigadores demostraron que la pérdida de la función de la proteína Shc está relacionada a un acelerado envejecimiento, con aumento en la sensibilidad al calor y aumento en estrés oxidativo. La proteína Shc es clave en la señalización de algunas vías, debido a que actúa río arriba de proteínas como PI3K, además de ser una proteína de andamio, activa a JNK e interactúa con el gen DAF-2.

Rozengurt y colaboradores reportaron en el 2010, que la comunicación cruzada entre los sistemas de receptores para factores de crecimiento y los GPCRs están involucrados en una amplia variedad de enfermedades una de ellas es el cáncer pancreático. Este grupo de trabajo encontró, que la metformina activa a la AMPK y que ésta interrumpe la comunicación entre el receptor para IGF-1 y la señalización del GPCR en células de cáncer de páncreas. Otros estudios fueron realizados a nivel del receptor de IGF-1, debido a que se ha asociado a enfermedades como la hipertrofia muscular, en la que induce elevaciones significativas de la expresión de IGF-1 y promueve el crecimiento muscular a través de la vía de señalización AKT-mTOR (Espen et al.,2008).

Por otra parte la proteína  $\beta$ -arrestina 2, considerada como uno de los principales reguladores de la señalización de los GPCRs, participa en la desensibilización e internalización y sirve como molécula de andamio en la transducción de señales de estos receptores. Hua y colaboradores (2004) reportaron que la  $\beta$ -arrestina 2 interactúa directamente con I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor de NF- $\kappa$ B) evitando su fosforilación y degradación, esto conlleva a la activación de NF- $\kappa$ B y a la expresión de los genes responsables de la respuesta al estrés, a la apoptosis, a la proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, la estimulación del receptor adrenérgico  $\beta_2$  mejora cuando  $\beta$ -arrestina 2 interactúa con I $\kappa$ B $\alpha$ . Este trabajo demostró que la  $\beta$ -arrestina 2 participa en el proceso de comunicación cruzada de vías de transducción de señales, y de esta manera regular el sistema inmune y de sistema nervioso simpático.



La proteína PKA y las fosfodiesterasas son piezas clave en diversas vías de señalización, y por ello están relacionadas en procesos como la comunicación cruzada, ya que no son exclusivas de una sola vía, y se ha reportado que interactúan con otras proteínas para llevar a cabo sus funciones. En el 2011 Dickinson y colaboradores reportaron la interacción de la PKA con DUSP9/MPK4, a través de un dominio de interacción con la PKA que está conservado. En este estudio ellos encontraron que DUSP9/MPK4 media la inactivación de ERK1/2 y p38 y que este proceso está asociado al desarrollo de la placenta, la diabetes tipo 2 y está considerada como una probable candidata en la regulación de la respuesta al estrés involucrado con la respuesta a la resistencia a la insulina (Brice et al., 2007).

## **HIPÓTESIS**

El CRF desencadena una serie de eventos, dando como resultado alteraciones fisiológicas como la depresión y la anorexia nerviosa donde la respuesta del IGF-1 se encuentra disminuida. Debido a esto la hipótesis del presente trabajo plantea que el CRF es capaz de inhibir las acciones del IGF-1 a nivel molecular, alterando la activación de proteínas clave en la señalización del IGF-1, como su receptor o proteínas implicadas en mediar la activación en la vía de las MAP cinasas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del CRF sobre las acciones del Factor IGF-1 en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1)

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- i. Determinar la respuesta del CRF en la activación de las vías de ERK1/2 para verificar la funcionalidad del sistema.
- ii. Determinar el efecto del IGF-1, evaluando su capacidad de activación de la vía de ERK1/2.
- iii. Determinar el papel de CRF sobre la regulación de las acciones del IGF1, a nivel de su receptor y de proteínas río abajo importantes en la señalización de la vía de las MAP cinasas.

## MATERIAL Y METODOS

### Cultivo Celular

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo, se utilizó como modelo de estudio a las células CHO-K1, línea celular de origen epitelial proveniente de ovario de hámster chino, la cual expresa de manera endógena al receptor para IGF-1 (Hansen et al., 1996). Las células se mantuvieron en medio DMEM F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (medio completo), en una incubadora con una atmósfera húmeda a 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

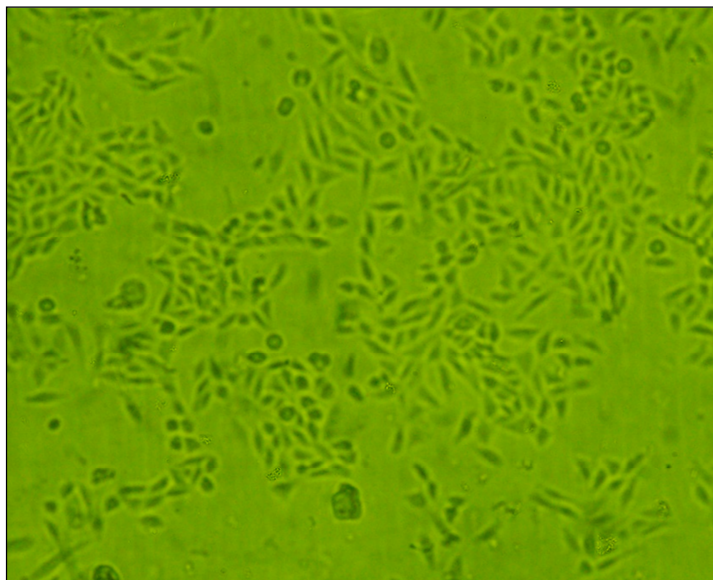


Figura 6: Células CHO-K1 objetivo 10X, células provenientes de ovario de hámster chino

### **Transfección celular**

La línea celular CHO-K1 no expresa al CRF<sub>1</sub>R, por lo cual se realizaron transfecciones transitorias a una confluencia del 70% aproximadamente, con el plásmido pcDNA3.1/CRF<sub>1</sub>R (Dautzenberg, 1999) que contiene el cDNA del receptor CRF1. La transfección celular se realizó mediante la técnica de liposomas catiónicos, que consiste en mezclar un lípido de carga y similitud a la composición de la membrana celular (lipofectamina 2000), con el pcDNA3.1/CRF<sub>1</sub>R; una vez que el plásmido es rodeado por la lipofectamina es incorporado a la célula. Después de seis horas, se retiró el medio de transfección y se dejaron en medio completo toda la noche. Las células transfectadas se sembraron en cajas de 6 pozos y de manera previa a los experimentos, se mantuvieron en medio sin suero por 6 horas.

### **Detección de proteínas mediante ensayos de inmunodetección western blot**

Para realizar los experimentos, las células se dejaron en medio sin suero durante 6 horas, una vez transcurrido este tiempo se realizaron estímulos con las siguientes hormonas: CRF, IGF-1 o CRF más IGF-1 a diferentes tiempos. Por otra parte, se utilizaron inhibidores específicos para diferentes cinasas de proteínas, como H89 (dihydrochloride) para PKA y ortovanadato que inhibe fosfatasa de tirosina, esto con la finalidad de conocer si estas enzimas participan en la transinhibición del sistema de IGF-1. Los inhibidores se incubaron por 30 minutos a las concentraciones que se indican en los pies de figura, esto de manera previa al estímulo con los agonistas. Después de los estímulos correspondientes, el medio se removió y las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos fría (PBS, NaCl 137mM, KCl 2.1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7.4), el lisado celular se hizo con el regulador Laemmli1X (SDS-protein gel loading solution 2X QualityBiological, Inc, β-mercaptoetanol y agua). Posteriormente, los lisados fueron sonicados con pulsos de 40 Khz durante 10 segundos por muestra, se calentaron a 99°C durante 5 min y se centrifugaron por 5 minutos a 14,500 rpm. Las muestras se cargaron en geles del 8% o del 10% de poliacrilamida, con la finalidad de separar las proteínas por electroforesis.

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron fijadas en membranas de PVDF mediante transferencia semiseca por una hora con un voltaje fijo de 15V. Para fijar a las proteínas del receptor se utilizó la transferencia húmeda durante una hora y media, con una corriente constante de 300 mA. Finalmente, mediante la técnica de inmunodetección (western blot), las proteínas se identificaron empleando anticuerpos específicos. Las membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios a 4°C, posteriormente se lavaron 3 veces por 10 minutos con la solución amortiguadora TBS-Tween (Tris-base 20mM, NaCl 137mM y Tween20 0.1%, pH 7.5); el anticuerpo secundario, acoplado a la peroxidasa de rábano macho (HRP), se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Las membranas fueron visualizadas con ECL (enhancedchemiluminescencereagent) y cuantificadas con un densitómetro GS 800 BioRad.

#### **Detección de p-MAPK por Inmunodetección (western blot)**

Para detectar el estado fosforilado de las ERK1/2 se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (CellsignalingTechnology) a una dilución de 1:5000. El anticuerpo secundario anti-conejo se utilizó a una dilución de 1:5000.

#### **Detección de p-Shc por Inmunodetección (western blot)**

Para determinar el estado fosforilado de la proteína Shc se utilizó el anticuerpo primario fosfo-Shc (Tyr239/240) (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000 y el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución de 1:5000 (Zymed/Invitrogen), conjugado con HRP.

#### **Detección de p-IR/IGF-1R por Inmunodetección (western blot)**

Para determinar el estado de fosforilación del receptor IR o IGF-1, se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfo-IR/IGF-1R (Tyr1131) (Biosource) a una dilución de 3.3µl/5ml y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-conjugado anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (Invitrogen).

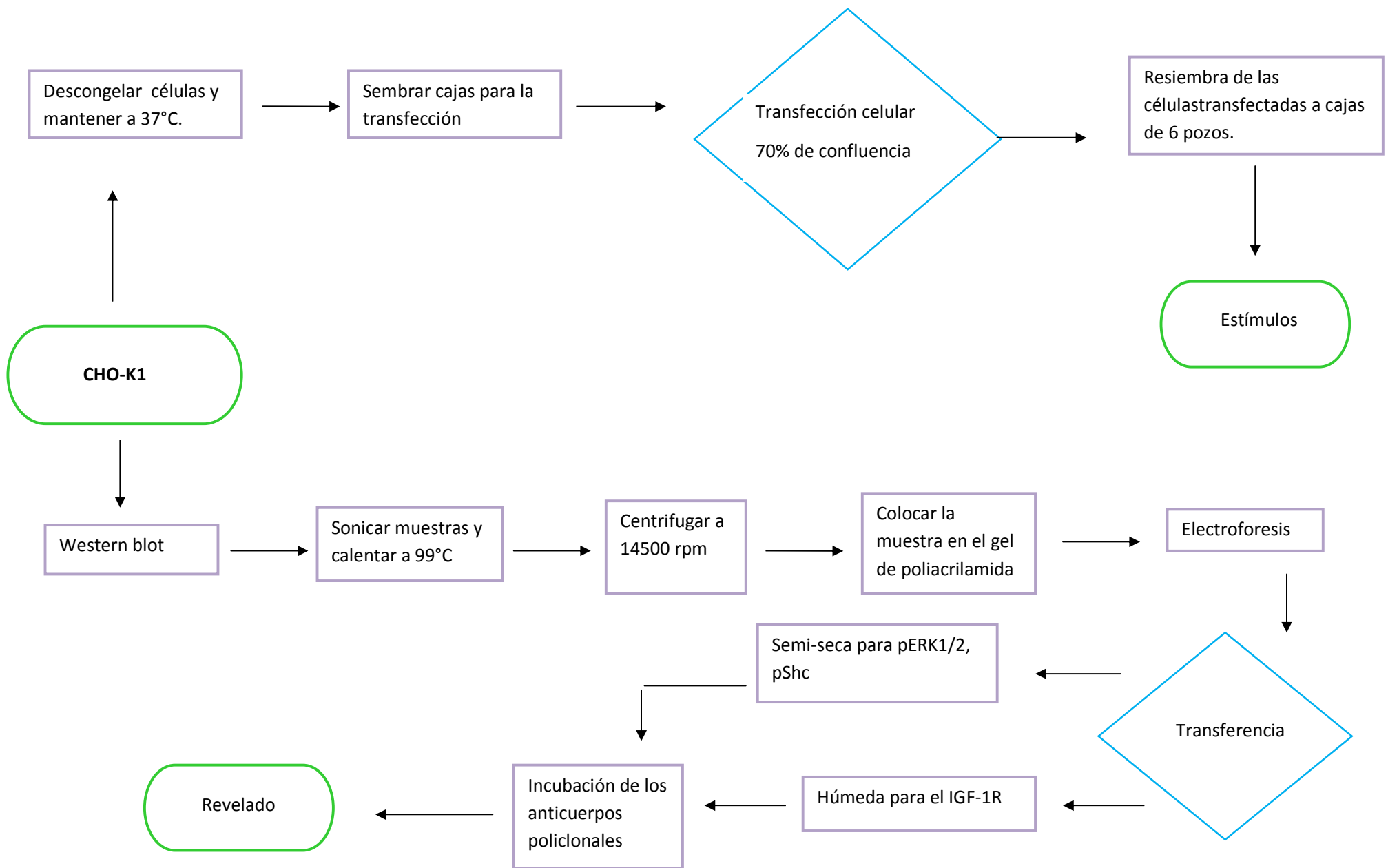


Figura 7: Diagrama de flujo de metodología.

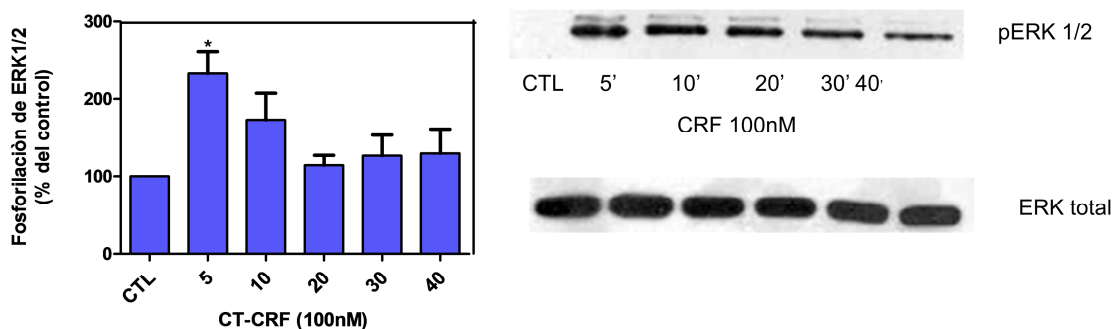
### **Análisis de resultados**

Por cada experimento se realizaron al menos tres repeticiones independientes. Para hacer la cuantificación de las Inmunodetecciones se utilizó el programa QuantityOne 1-D Analysis Software 2000 (BIORAD). Los datos obtenidos son reportados como unidades arbitrarias de la  $\Sigma$ pixeles-  $\Sigma$ del fondo  $\pm$  error estándar. Para determinar las pruebas estadísticas se realizaron pruebas de ANOVA y post-hoc de Dunnett, con ayuda del programa de estadística GraphPadPrism 5.0. Se consideró que la diferencia era significativa cuando la probabilidad de la hipótesis nula era menor del 5%  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### El CRF induce la activación de ERK1/2

Actualmente se sabe que las MAP cinasas son activadas en diferentes líneas celulares (McDonald, 2000), a través de la acción de diferentes hormonas. Para caracterizar la activación de las cinasas ERK1/2 en las células CHO-K1, estas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA 3.1/HA-CRF<sub>1</sub>R, después fueron sembradas en cajas de 6 pozos y se dejaron en medio sin suero, 6 horas previas a los estímulos con CRF a una concentración de 100nM. La gráfica (figura 7) muestra que a los 5 min de estímulo con CRF se alcanza una fosforilación máxima de las ERK1/2 en comparación con el control, y su fosforilación comienza a disminuir a partir de los 10min. Esto indica que la fosforilación inducida por el CRF es dependiente del tiempo.

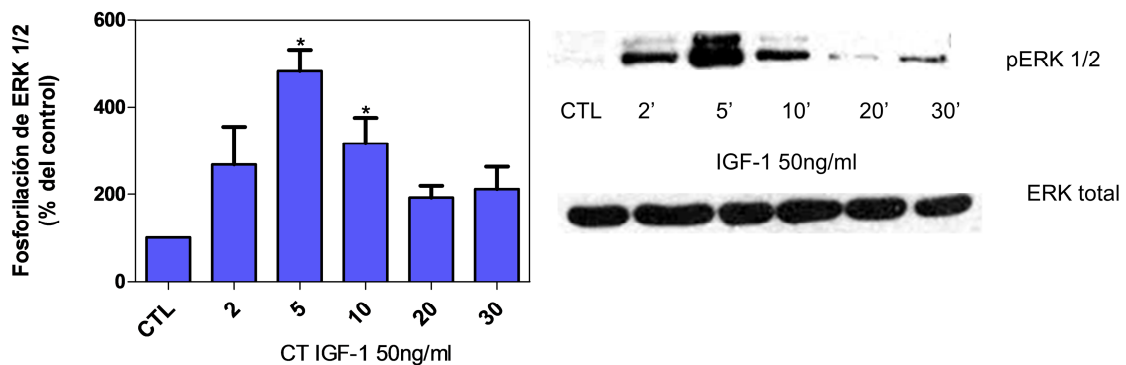


**Figura 7: El CRF induce la fosforilación de ERK1/2 de manera dependiente del tiempo.** Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el vector pcDNA/HA-CRF<sub>1</sub>R y transferidas a cajas de seis pozos, se dejaron en medio sin suero por seis horas antes de comenzar los estímulos con CRF 100nM por los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot con los anticuerpos pERK1/2 y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 4 experimentos ± el error estándar. \*p<0.05 con respecto al control.



## El IGF-1 induce la activación de ERK1/2

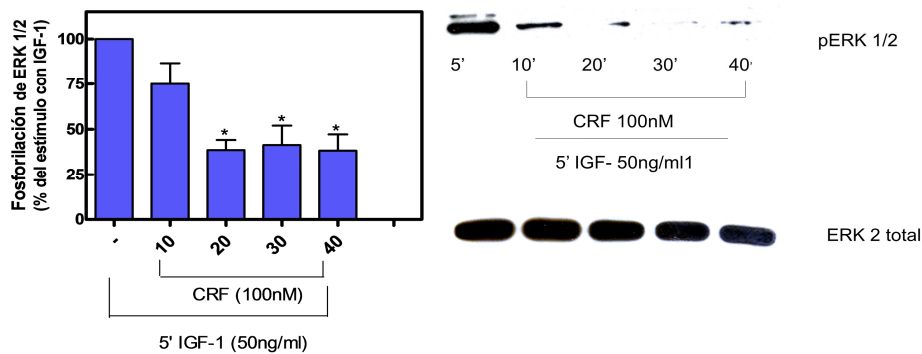
Se ha reportado que las células CHO-K1 tienen gran cantidad de receptores para el IGF-1 de manera endógena, además, se sabe que el IGF-1 puede activar la vía de las MAP cinasas (Hansen, et al., 1996; Belfiore y Frasca, 2008). Para caracterizar la activación de las ERK1/2, por acción del IGF se realizaron estímulos a una concentración de 50ng/ml de IGF a diferentes tiempos. La gráfica (figura 8) muestra que la activación de las ERK 1/2 comienza a los 2 min; sin embargo, el estímulo máximo observado fue a los 5 min y a partir de los 10min la fosforilación de ERK 1/2 disminuye. Esta gráfica indica que la fosforilación de las ERK 1/2 por acción del IGF es dependiente del tiempo, y una vez que la fosforilación de las ERK 1/2 disminuye, este efecto ya no se recupera en los tiempos observados.



**Figura 8: El IGF-1 induce la fosforilación de ERK1/2 de manera dependiente del tiempo.** Las células CHO-K1 fueron sembradas en cajas de seis pozos, se dejaron en medio si suero por seis horas antes de comenzar los estímulos con IGF-1 a una concentración de 50 ng/ml por los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot con los anticuerpos pERK1/2 y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 4 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al control.

### El CRF inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1

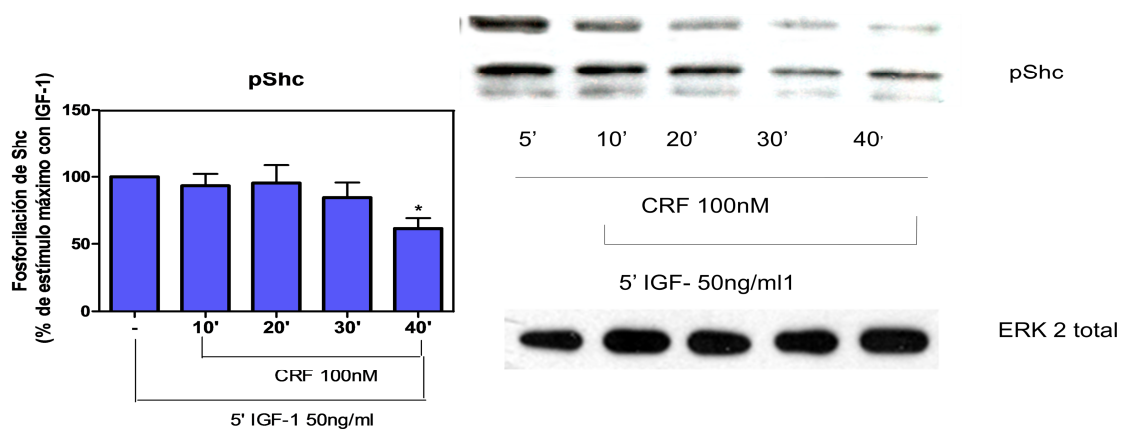
Como se mencionó, el CRF y el IGF-1 interactúan a través del eje HPA bajo condiciones de estrés, en donde los niveles del CRF se incrementan y los niveles del IGF-1 disminuyen, lo que indica que posiblemente el CRF está regulando de manera negativa al IGF-1. Con el fin de identificar un posible mecanismo regulador de las acciones del IGF por acción del CRF, se realizaron estímulos con 100nM de CRF, y una vez transcurridos los tiempos de estímulo (10, 20, 30 y 40 min), las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de IGF-1 por 5 min, que es el tiempo de fosforilación máxima de las ERK1/2 inducida por dicha hormona. La gráfica (figura 9) muestra que la fosforilación de las MAP cinasas disminuye en presencia de CRF a partir de los 10 min. Sin embargo, a los 40min de exposición previa al CRF la disminución de la fosforilación de ERK1/2 es evidente. Lo anterior muestra que efectivamente el CRF media la activación de un mecanismo que regula negativamente la vía de señalización del IGF-1, proceso conocido como transinhibición.



**Figura 9: El CRF inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1.** Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el vector pcDNA/HA-CRF-1R y transferidas a cajas de seis pozos, se dejaron en medio si suero por seis horas antes de estimular con CRF 100nM por los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot con los anticuerpos pERK1/2 y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al control.

### **El CRF inhibe la fosforilación de la proteína Shc inducida por IGF-1**

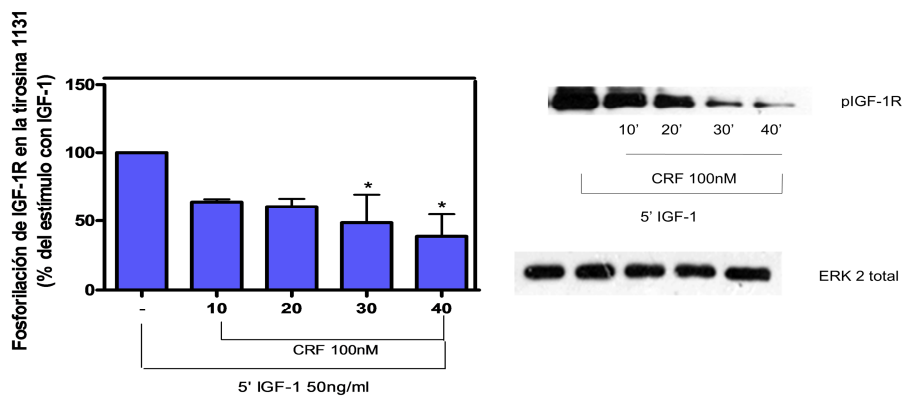
La proteína Shc es una proteína adaptadora con sitios de unión para receptores de factores de crecimiento como el de IGF-1, se localiza en la membrana plasmática y su función es reclutar a través de sitios activos proteínas como Grb-2, SOS, RAS, RAF y las MAP cinasas (Song et al., 2004), esto hace de Shc una proteína clave en la activación de las vías de señalización reguladas por factores de crecimiento, principalmente la vía de las MAP cinasas, específicamente de ERK 1/2. Por ello, se evaluó la fosforilación en tirosinas de Shc inducida por IGF-1. Para esto se realizaron estímulos de manera previa con CRF por 10, 20, 30 y 40 min y un estímulo final por 5 min con IGF-1. La gráfica (figura 10) muestra que la fosforilación de Shc disminuye en presencia del CRF a partir de los 30 min; sin embargo, la disminución de la fosforilación a los 40 min no es significativa con respecto a los 5 min de estímulo con IGF-1. Esto indica que la inhibición por parte del CRF hacia la fosforilación inducida por IGF-1 puede estar actuando a nivel del receptor, además puede estar involucrado el sustrato del receptor de insulina (IRS).



**Figura 10: El CRF inhibe la fosforilación de Shc inducida por IGF-1.** Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el vector pcDNA/HA-CRF-1R y transferidas a cajas de seis pozos, se dejaron en medio sin suero por seis horas antes estimular con CRF 100nM por los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot, con los anticuerpos pShc y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al control.

### El CRF altera la fosforilación del receptor de IGF-1.

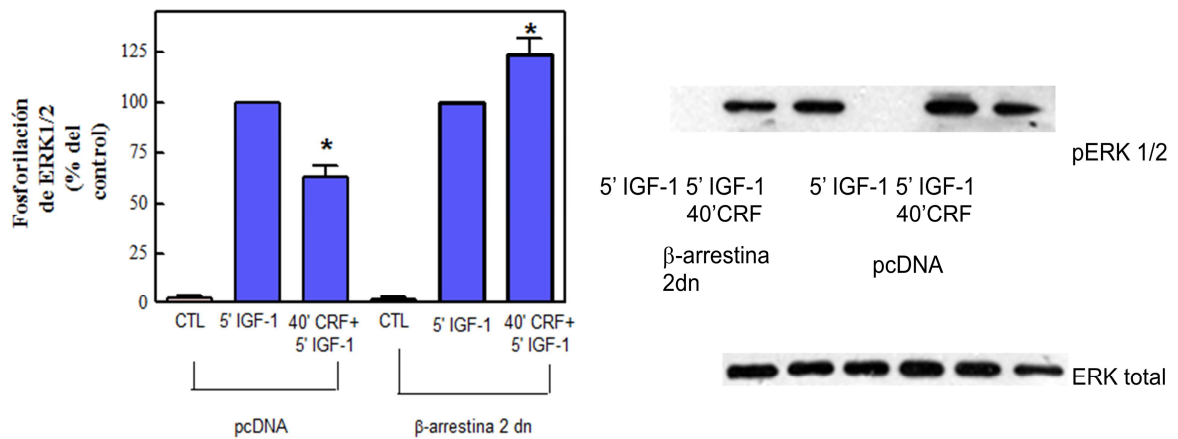
El IGF-1 su receptor y vía de señalización son piezas claves en procesos de diferenciación y desarrollo celular y, por tanto, también están asociados a desórdenes como el cáncer y la anorexia nerviosa (Okamoto et al., 2009; Isebaert et al., 2011). Un blanco fácil de alteración puede ser el receptor, por ello se decidió investigar si el estado de fosforilación en tirosina del receptor de IGF se ve afectado por el CRF. Las células CHO-K1 transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> se colocaron en cajas para experimento, se realizaron estímulos con CRF por 10, 20, 30 y 40 min y un estímulo final por 5 min con IGF-1. La gráfica (figura 11) muestra que la fosforilación del receptor para IGF-1 disminuye en presencia del CRF a partir de los 10 min y ésta no se recupera, lo que sugiere que el CRF transinhibe la señalización del IGF-1 a nivel de receptor.



**Figura 11: El CRF altera la fosforilación del receptor de IGF-1.** Las células CHO-K1 fueron transfectadas de manera transitoria con la secuencia del receptor para CRF1, posteriormente sembradas en cajas de seis pozos, se dejaron en medio sin suero por seis horas antes de estimular con CRF por 10, 20, 30 y 40 min a 100nM y un estímulo final de IGF-1 a una concentración de 50ng/ml por 5 min. Para el lisado celular se siguió el protocolo descrito en material y métodos. Se determinó el estado fosforilado de la proteína mediante Western blot y para el control de carga se utilizó ERK 2 total. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos. \*p < 0.05 con respecto a 5 minutos.

### **$\beta$ -arrestina 2 puede estar participando en la desensibilización del sistema de IGF-1.**

$\beta$ -arrestina 2 es una proteína considerada de andamio y participa en el proceso de internalización y reciclaje de los GPCRs. Sin embargo, se tiene evidencia de su participación en la comunicación de sistemas entre GPCRs y RTKs (Oakley et al., 2007). Para saber si la proteína  $\beta$ -arrestina2 está participando en la desensibilización del sistema de IGF-1; se realizó la co-transfección de las células CHO-K1 con los vectores de expresión que contiene a la  $\beta$ -arrestina 2 dominante negativa y al CRF<sub>1</sub>R. Después de seis horas en medio sin suero se estimularon con CRF por 40min y un estímulo final con IGF-1 por 5min. La gráfica (figura 12) muestra una recuperación en cuanto a la fosforilación de las ERK 1/2 cuando la dominante negativa de la  $\beta$ -arrestina 2 se sobreexpresa, esto indica que dicha proteína puede tener implicación como efector en la señalización regulada de manera negativa por CRF.

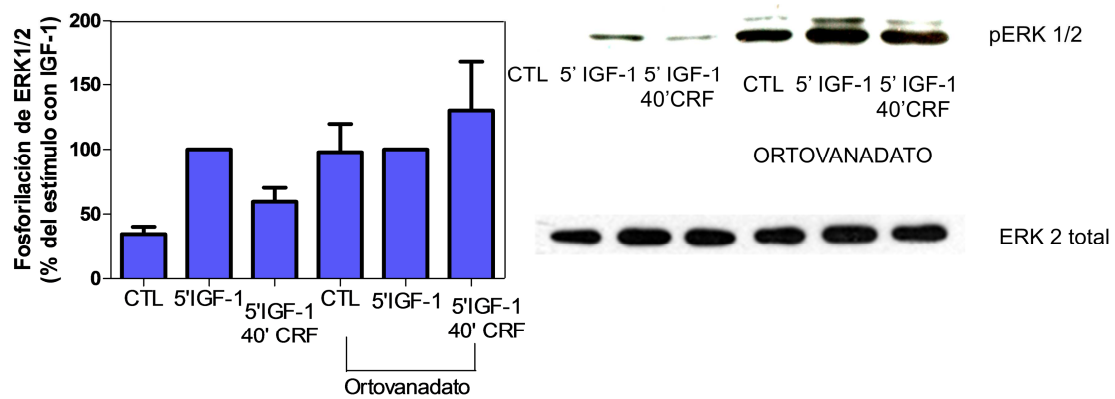


**Figura 12. β-arrestina 2 puede estar participando en la desensibilización del sistema de IGF-1.** Las células CHO-K1 fueron co-transfectadas con los vectores de expresión que contienen a la β-arrestina 2 dominante negativa y al CRF<sub>1</sub>R; como control se co-transfectó con el vector pcDNA/HA-CRF<sub>1</sub>Ry un plásmido vacío, las células fueron transferidas a cajas de seis pozos y se dejaron en medio sin suero por seis horas antes de estimular con CRF 100nM y 5 min con el IGF-1 a una concentración de 50ng/ml por los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de Western Blot, con los anticuerpos pERK1/2 y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 3 experimentos ± el error estándar.\*p<0.05 con respecto al control.

**Las fosfatasas pueden intervenir en la transinhibición ejercida por el CRF sobre el IGF-1.**

Se ha demostrado que el CRF inhibe las acciones del IGF-1 por transinhibición, pero existen proteínas encargadas del proceso de defosforilación, que están presentes en los diversos sistemas de transducción de señales. Las fosfatasas forman parte de un grupo de enzimas que catalizan la eliminación de grupos fosfato. La fosforilación y defosforilación de las proteínas son de gran importancia en el control de la actividad de las vías de señalización intracelulares, además se ha reportado que dichos procesos se dan con mayor frecuencia en sitios de tirosina (Xu y Cheng-Kui, 2008). Para determinar si las fosfatasas están participando de manera activa en el apagado del sistema de IGF-1, se colocaron las células en cajas para experimento y después de seis horas sin suero se incubaron con el inhibidor de las fosfatasas de tirosina (el ortovanadato) posteriormente se realizaron los estímulos con CRF por 40min y el estímulo final con IGF-1 por 5min. La gráfica (figura 13) muestra que al ser estimuladas las células con CRF e IGF-1 disminuyó la fosforilación de las ERK 1/2; sin embargo, cuando el ortovanadato se preincuba al CRF y al IGF-1 la fosforilación de las ERK 1/2 está por arriba del estímulo máximo con IGF-1.

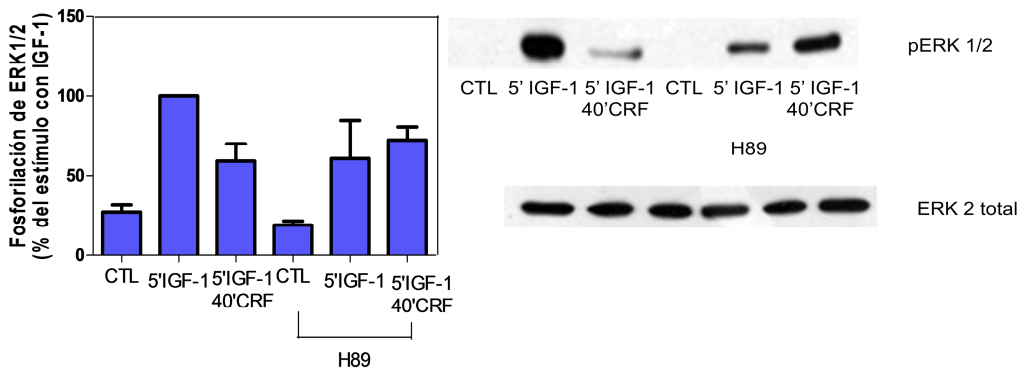




**Figura 13: Las fosfatasas intervienen en la transinhibición ejercida por el CRF sobre el IGF-1.** Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el vector pcDNA/HA-CRF-1R y transferidas a cajas de seis pozos, se dejaron en medio si suero por seis horas antes de comenzar los estímulos con ortovanadato a 100nM por 30 min posteriormente CRF a 100nM por 40 min y un estímulo final de IGF-1 por 5min a una concentración de 50ng/ml. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot con los anticuerpos ERK1/2y ERK2 Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al control.

### La proteína cinasa (PKA) participa en el sistema de transinhibición del CRF hacia IGF-1.

La PKA es una proteína involucrada en una gran cantidad de procesos celulares, dentro de los que se encuentra la regulación del metabolismo de la glucosa y de lípidos, y el ciclo celular. La actividad de esta proteína es dependiente de AMP cíclico y se ha demostrado que puede regular la expresión génica. Para determinar si la PKA está involucrada en el sistema, se incubaron las células de manera previa con H89, que es un inhibidor de la PKA, por 30min para después estimular con CRF por 40 min y el estímulo final con IGF-1 por 5min. La gráfica (figura 14) indica que la PKA participa en el sistema, ya que la fosforilación de las ERK 1/2 disminuye cuando las células se estimularon únicamente con CRF e IGF-1. En cambio, cuando se preincuban las células con H89 a una concentración 500nM para después ser estimuladas con CRF e IGF-1, la fosforilación de las ERK 1/2 se recupera.



**Figura 14:** La proteína PKA participa en la recuperación de la señal de ERK1/2 inducida por IGF-1.

Las células CHO-K1 fueron transfectadas con el vector pcDNA/HA-CRF-1R y transferidas a cajas de seis pozos, se dejaron en medio sin suero por seis horas antes de comenzar la preincubación con H89 500nM por 30 min posteriormente CRF a 100nM por 40 min y un estímulo final de IGF-1 por 5min a una concentración de 50ng/ml. Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por ensayo de western blot, con los anticuerpos p-ERK1/2 y ERK2. Se realizó un análisis densitométrico y los resultados se muestran en la gráfica que representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al control.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios que se han realizado acerca del proceso de la comunicación cruzada entre los sistemas de CRF e IGF-1, indican la participación de un sin fin de proteínas, algunas de ellas por ser blancos específicos para la activación de la vía, o bien por ser dependientes de segundos mensajeros que se generan una vez activas las vías. La comunicación entre los sistemas ha tomado gran importancia en los últimos años, debido a que este fenómeno se asocia a diversas respuestas fisiológicas, como la neuroprotección que se da mediante la transactivación del sistema del EGF a través de la activación del receptor para GABA<sub>B</sub> (Haijinet al., 2010);o bien el proceso contrario, la transinhibición que se ha asociado a la inhibición del apetito por los niveles bajos de la hormona de crecimiento, que se libera de manera conjunta con el IGF-1, que es uno de los factores de crecimiento más importantes y aunque aún no es molecularmente claro el proceso, el estrés también se asocia a enfermedades como el Alzheimer (Rissman et al., 2011).

En el presente trabajo se realizaron experimentos que muestran que la vía de las MAP cinasas, específicamente las ERK 1/2,se activan una vez que el IGF-1 se une a su receptor, los resultados que se obtuvieron en la línea celular CHO-K1 coinciden (figura 8) con lo reportado en trabajos previos en los que se determinó que el IGF-1, una vez que se ha unido a su receptor, desencadena la vía de las MAP cinasas y que esto está asociado a la neurogénesis y a la plasticidad (Yun-Sik et al., 2008; Bosch-Barrera et al.,2009).Además, se determinó que el IGF-1 fosforila a las MAP cinasas de manera dependiente del tiempo y que el tiempo óptimo de fosforilación es a los 5 min. De igual manera, se realizaron experimentos para saber si el CRF activa la vía de las ERK 1/2 (figura 7), una vez que se une a su receptor. Se sabe por trabajos previos que las MAP cinasas participan en la cascada de señalización del CRF (Van et al., 2009); esto coincide con los datos obtenidos de los experimentos que se realizaron en la línea de celular CHO-K1.

Actualmente se ha descrito que, a nivel molecular, las enfermedades no son eventos aislados que se presentan por desequilibrio de una vía de señalización exclusiva, sino que pueden estar participando otras vías de señalización. Como ejemplo se tiene que el CRF en situaciones de estrés crónico desencadena anorexia nerviosa, depresión y ansiedad; no obstante, estos padecimientos no son exclusivos de la sobre activación de dicho sistema, también están asociados al sistema de IGF-1; sin embargo, en este caso sucede lo contrario el IGF-1 se ve disminuido (Okamoto et al., 2009). Esta interacción entre los sistemas ha comprobado la regulación negativa ejercida del CRF sobre el sistema de IGF-1. Aunque la información a nivel molecular es escasa, nuestros datos sugieren que la fosforilación de las ERK 1/2, inducida por IGF-1, disminuye en presencia de CRF a tiempos largos (figura 9). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se determinó la transinhibición de los sistemas mencionados (Calogero et al., 1998; Filardo et al., 2000).

Se sabe que Shc es un adaptador molecular y un eslabón clave en las primeras fases de la señalización por ser una proteína de andamiaje y localizarse río arriba de las MAP cinasas (Sweet y Tzima, 2009); además, se ha reportado que es blanco de procesos de transinhibición entre GPCRs y RTKs (Obreztkhikoba et al., 2006); por esas razones se decidió saber si Shc se ve afectada en su estado de fosforilación cuando el CRF está presente y activa a sus receptores. Los resultados que obtuvimos indican que esta proteína puede ser blanco del proceso de transinhibición (figura 10); debido a la menor fosforilación que se presenta. En este sentido, la investigación demostró que el receptor de IGF-1 es otro blanco de la transinhibición, debido a que la fosforilación disminuye en la tirosina 1131 (figura 11), que es uno de los sitios en los que el receptor se autofosforila para permitir el acople de proteínas que participan en la cascada de las MAP cinasas.

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos para tratar de dilucidar algunas de las proteínas que pueden estar interviniendo en la transinhibición que el CRF ejerce sobre la señalización del IGF-1 en la línea celular CHO-K1. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que la  $\beta$ -arrestina, además de participar en la internalización de los GPCRs,

también está descrita como proteína de andamio e interviene en la transducción de señales de RTKs y de GPCRs (Feng et al., 2011). Otros estudios han demostrado la importancia de las  $\beta$ -arrestinas en procesos antiapoptóticos mediante el encendido de las ERK1/2, p38 y AKT. De igual manera se demostró que niveles bajos de  $\beta$ -arrestina 1 y  $\beta$ -arrestina 2 derivan en la muerte celular. A estas proteínas se les ha asociado con procesos de comunicación cruzada con un papel dual. Por dichas razones se decidió saber si  $\beta$ -arrestina 2 puede participar en la transinhibición del sistema. Nuestros resultados muestran una recuperación en la fosforilación de ERK 1/2 (figura 12), en presencia de CRF cuando la  $\beta$ -arrestina 2 dominante negativo está presente. Esto puede deberse a que la  $\beta$ -arrestina 2 puede estar evitando que la proteína G se acople al CRF-1R y más allá de una regulación negativa del sistema, se desencadene la transinhibición porque se sabe que las proteínas G no son exclusivas de la señalización de GPCRs, y se ha sugerido que las proteínas G así como las subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  están implicadas en la mitogénesis mediada por IGF-1 (Hupfeld y Olefsky, 2007).

El estado de fosforilación de los residuos de tirosina, serina y treonina son una de las principales señales reguladoras en el citoplasma de células eucariontes. La transducción de las señales depende del equilibrio entre las cinasas que fosforilan y las fosfatasas que defosforilan, con el fin de lograr una comunicación adecuada. Se ha reportado que hay aproximadamente 1,000 veces más actividad de fosfatasas de tirosina en el citoplasma de células animales, que actividad de tirosina cinasa. Las fosfatasas son parte importante de un mecanismo de control a nivel molecular de diversos procesos biológicos (Uhlik et al., 2004) Una vez que las proteínas son defosforiladas, presentan un cambio conformacional que modifica su localización celular, su actividad y las interacciones con otras moléculas. Por dichas razones en el presente trabajo se decidió saber si las fosfatasas pueden estar participando en el proceso de transinhibición que ejerce CRF sobre las acciones de IGF-1. Nuestros resultados muestran un estado de fosforilación mayor de las ERK 1/2 cuando se inhibe a las fosfatasas (figura 13). Esto indica que las fosfatasas de tirosina pueden estar

regulando de manera negativa el sistema de IGF-1, ya que estas enzimas están asociadas a la homeostasis y que la pérdida de su actividad se asocia con desórdenes neoplásicos, a la inmunodeficiencia y a defectos en el desarrollo.

La PKA es el principal mediador de los efectos del AMPc de señales extracelulares. Diversos estudios indican su relación con procesos como el metabolismo, la replicación génica, el crecimiento, la organización del citoesqueleto, y la división y diferenciación celular. Esta proteína toma gran importancia en el trabajo, debido a que las investigaciones han llevado a un consenso acerca de que CRF<sub>1</sub> activa la vía de la AC/PKA en líneas celulares endógenas y recombinantes. Nuestros resultados muestran que una vez inhibida la PKA la fosforilación de las ERK1/2 aumenta (figura 14), esto sugiere que la PKA no es una de las piezas clave en la transinhibición. Pero esto sugiere que hay otra cinasa regulada por segundos mensajeros, que puede iniciar la cascada de señalización de las MAP cinasas y que está involucrada en el proceso de comunicación cruzada. El encendido de PKC es el resultado del acople de Gq. Existen estudios que sugieren que un GPCR se acopla preferentemente a Gs; sin embargo, también puede activar a Gq (Olivares-Reyes y Hauger, 2012; Trümbachetal., 2010), no obstante hay evidencia en donde se expone que ambas proteínas G pueden ser activadas en el mismo sistema permitiendo, así, la señalización de las MAP cinasas. En este sentido de la investigación se ha reportado que la PKC y los sistemas de señalización de PKA se encuentran asociados en procesos de comunicación cruzada (Yao et al., 2008; Olivares-Reyes y Hauger, 2012).

En resumen el trabajo muestra que el CRF se une a su receptor y desencadena la vía de las MAP cinasas 1/2. Por otro lado, el IGF-1 unido a su receptor también puede activar a las ERK 1/2. El proceso de transinhibición que ejerce el CRF sobre el IGF-1 se da a nivel del IGF-1R y de la proteína adaptadora Shc.  $\beta$ -arrestina 2 es una de las proteínas que participa en la transinhibición que ejerce el CRF sobre las acciones del IGF-1. La PKA no recupera la señal de las ERK 1/2 y las fosfatasa de tirosina participan en el sistema, regulando de manera negativa las acciones del IGF-1.

## **CONCLUSIONES**

La unión del CRF a su receptor activa la vía de las MAP cinasas y esta fosforilación es dependiente del tiempo.

La unión del IGF-1 a su receptor desencadena la vía de las MAP cinasas y esta fosforilación es dependiente del tiempo.

El CRF reduce la fosforilación de las ERK 1/2 que desencadena el IGF-1.

La transinhibición del sistema de IGF-1 por las acciones del CRF se da a nivel de la proteína Shc y del IGF-1R.

La  $\beta$ -arrestina 2 es una de las proteínas que participa en el proceso de transinhibición ejercido por CRF al sistema de IGF-1.

La PKA no recupera la fosforilación de las ERK 1/2 mediada por el IGF-1 una vez que el CRF ha inhibido dicha fosforilación.

Las fosfatasa de tirosina están regulando de manera negativa al IGF-1.

## BIBLIOGRAFÍA

Abuirmeileh, A., Harkavyi, A., Lever, R., Biggs, C.S. Y Whitton, P.S. 2007. Urocortin, a CRF-like peptide, restores key indicators of damage in the substantianigra in a neuroinflammatory model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation* 4 (19) pp.1-5.

Alistair, M. 2007. Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *The Journal Physiol* 578.2 pp. 377-385.

Barr, C. S., Dvoskin, R. L., Yuan, Q., Lipisky, R. H., Gupte, M., Hu X., Zhoy, Z., Schwandt, M.L., Lindell, S.G., McKee, M., Becker, M.L., Kling, M.A., Gpñd, P.W., Higley, D., Heilig, M., Suomi, S.J., Goldman, D. 2008. CRH haplotype predicts CSF CRH, HPA axis activity, temperament, and alcohol consumption in rhesus macaques. *Arch Gen Psychiatry*. 65(8) pp. 934-944.

Bayes-Genis, A., Conover, C.A. y Schwartz, R.S. 2000. The Insuline-Like Growth Factor Axis. *Circulation Research*. 86 125-130.

Belfiore, A.y., Frasca, F. 2008. IGF-1 and Insulin Receptor Signaling in Brest Cancer.J Mammary Gland. *BiolNeoplasia*. 13 pp. 381-406.

Brice, E. Delphine, E. Ryo S. Y Ronald, K. 2007. Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance. *The national academy of Sciences of the USA*. 105 (9) pp. 3545-3550.

Bosch-Barrera, J., Hernández, A. y Abella, L.E. 2009. Insulin and insulin-like growth factor pathway, a new targeted therapy in oncology. Departamento de oncología médica. Clínica Universidad de Navarra. *An. Sist. Sanit. Navar*. 32 (3) pp. 413-420.

Boucher, J., Tseng, Y. y Kahn. 2010. Insulin and Insulin-like Growth Factor-1 Receptors Act as Ligand-specific Amplitude Modulators of a Common Pathway Regulating Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (22) pp. 1735-1745.



Calogero, A. E., Bagdy, G. y D'Agata, R. 1998. Mechanisms of stress on reproduction evidence for a complex hypothalamic circuit. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 pp. 364-370.

Calogero, A.E., Barreca, A., Burrello, N., Palermo, I., Giordano, G., D'Agata R. y Vicari, E. 2002. Corticotrophin-releasing hormone inhibits insulin-like growth factor-I release from primary cultures of rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology*. 174 (3) pp. 493-498.

Cassano, P. y Argibay, P. 2010. Depresión y neuroplasticidad. Interacción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Medicina* 70 (2) pp. 2185-193.

Choi, D.C., Furia, A.R., Evanson, N.K., Ostrander, M.M., Uldrich-Liai, Y.M. y Herman, J.P. 2007. Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity: Implications for the Integration of Limbic Inputs. *Journal of Neuroscience*. 27(8) pp. 2025-2034.

Charmandari, E., Tsigos, C., y George, C. 2005 Endocrinology of the stress response. *Physiol*, 67 pp. 259-284.

Conde de la Rosa, L., Moshage, H. y Nieto, N. 2008. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 100 (3) pp. 156-163.

Joseph-Bravo, P., y Gortari, P. d. 2007. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*, 14 pp. 65-76.

Dautzenberg, F.M. y Hauger, R.L. 2007. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Pharmacological Sciences*. 23 (2) pp. 71-77.

De Gortari, P. 2009. La regulación de la conducta alimentaria en un modelo experimental de anorexia. *Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 4 pp. 158-190.

Dunn, A. J. y Swiergiel, A. H. 2008. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *European Journal of Pharmacology*. 583 pp. 186-193.

Fekete, E.M. y Zorrilla, E. P. 2007. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: Ancient CRF paralogs. *Neuroendocrinology* 28 pp. 1-27.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I. y Frackelton A.R. 2000. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*. 14 (10) pp. 1649-1660.

Galli, U., Gaab, J., Ettlin, D.A., Ruggia, F., Ehlert, U. y Palla, S. 2009. Enhanced negative feedback sensitivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in chronic myogenous facial pain. *European Journal of Pain* 13 pp. 600-605.

Gomes de Souza, V.R., Dias, O.R., Soares, P.C., Pires da Silveira, F.M.Y., Da Silva, N.J., Dornelas, A.A.F. 2009. Correlation between basal serum IGF-1 levels and functional autonomy in elderly women. *International Journal*. 5 (14) pp. 11-18.

Gert, F., Klaren, H.M.P., Van den Burg, H. E., Metz, R.J., Huising, O.M. 2006 CRF and stress in fish. *General and comparative endocrinology*. 146 (10) pp. 36-44.

Hauger, R.L., Olivares-Reyes, J.A., Braun, S., Catt, K.J. y Dautzenberg, F.M. 2003. Mediation of Corticotropin Releasing Factor Type 1 Receptor Phosphorylation and Desensitization by Protein Kinase C: A Possible Role in Stress Adaptation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306 (2) pp. 794-803.

Hauger, R.L., Risbrough, V., Brauns, O. Y Dautzenberg, F.M. 2006. Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. *CNS Neuronal Disord Drug Targets*. 5(4) pp. 453-479.

Hansen, B.F., Danielsen, M.G., Drejer, K., Sorensen, A.R., Wiberg, F.C., Klein, H.H. y Lundemose, A.G. 1996. Sustained signalling from the insulin receptor

after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem. J.* 315 (1) PP. 271-279.

Hillhouse, E.W. y Grammatopoulos, D.K. 2006. The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology. *Endocrine Reviews.* 27 pp.260-286.

Isebaert, S.F., Swinnen, J.V., McBride, W.H. y Haustermans, K.M. 2011 Insulin-like growth factor-type 1 receptor inhibitor NVP-AEW541 enhances radiosensitivity of PTE wild-type but PTEN-deficient human prostate cancer cells. *Oncology.* 81(1) pp. 239-247.

Joseph-Bravo, P., y Gortari, P. 2007. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Bioteconología,* 14 (3)pp. 65-76.

Kawasaki, L., Ongay-Larios, L. y Coria, R. 2009 Cascada de MAP cinasas en apareamiento y estrés en levaduras. *Instituto Nacional de Fisiología Universidad Nacional Autónoma de México.* ISSN-0188-197X.

Kiely, P.A., O’Gorman, D.M., Lyons, A.Y O’Connor. 2004. The IGF-1 Receptor in Cell Survival: Signalling and Regulation. *Cell Engineering.* 4, pp. 49-92.

Li, C., Vaughan, J., Sawchenko, P.E. y Vale, W.W. 2002. urocortin III-Immunoreactive Projections in Rat Brain: Partial Overlap with Sites of Type 2 Corticotrophin-releasing Factor Receptor Expresión. *The Journal of Neurosciences.* 22(3) pp. 991-1001.

Lima, M.M., Velásquez, E., Unshelm, G., Torres, C., Rosa, F. y Lanza, P. 2009. Asociación de la insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) en el cáncer de mama. *Gaceta Médica de Caracas.* 117 (3) pp.226-231.

Liu, J., Yu, B., Neugebauer, V., Grigoriadis, D.E., Rivier, J., Vale, W.W., Shinnick-Gallagher, P. Y Gallagher, J.P. 2004. Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin I Modulate Excitatory Glutamatergic Synaptic Transmission. *J. Neurosci* 24(16) pp. 4020-4029.

- Martínez, V., Wang, L., Rivier, J.E., Vale, W. y Taché, Y. 2002. Differential Actions of Peripheral Corticotropin-Releasing Factor (CRF), Urocortin II and Urocortin III on Gastric Emptying and Colonic Transit in Mice: Role of CRF Receptor Subtypes 1 and 2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301 (2) pp. 611-617.
- Matsuda, D., Kang, K. S., Sakashita, A. Yahashi, S. y Vaudry, H. 2011. Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish. *Neuroendocrinology* 1220 pp. 117-126.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J. y Leftkowitz, R.J. 2000.  $\beta$ -arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science*. 290 pp. 1515-1518.
- Mejía, W., Castro, C., Umaña, A., y De Castro, C. 2009. Señalización asociada al receptor del factor de crecimiento similar ala insulina de tipo I en una línea celular colombiana de carcinoma mamario. *Biomédica* Vol. 30 (4) pp. 51-60.
- Moya-Albiol, L., Serrano, MA., González-Bono, E., Rodríguez-Alarcón, y Salvador, A. 2005. Respuesta psicofisiológica de estrés en una jornada laboral. *Psicothema*. 17 (2) pp. 205-211.
- Naranjo P. M.L. 2009 Una revisión teórica sobre el estrés y algunos aspectos relevantes de éste en el ámbito educativo. *Educación*. 33 (2) pp. 171-190.
- Oakley, R.H., Olivares-Reyes, J.A., Hudson, C.C., Flores-Vega, F., Dautzenberg, F.M. y Hauger, R. L. 2007. Carboxyl-terminal and intracellular loop sites for CRF<sub>1</sub> receptor phosphorylation and  $\beta$ -arrestin-2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. *American Journal of Physiology*. 293 pp. 209-222.
- Okamoto, I., Munakata, M., Miyazaki, M., Satoh, T., Takahata, T., Takamatsu, Y., Muto, O., Koike, K., Ishitani, K., Mukaiyama, T., Sakata, Y., Nakagawa, K. Y Tamura, K. 2009. Disturbance of the growth Hormone-Insulin-like Growth Factor-1 Axis Associated with Poor Performance Status in Patients with Solid tumours. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 40 (3) pp. 222-226.

Hauger, L.R. Risbrough, V., Oakley, R.H., Olivares-Reyes, J.A. y Dautzenberg, F.M. 2009. Role of CRF receptor signalling in stress vulnerability, anxiety, and depression. *Ann N Y Acad Sci.* 1179 pp. 120-143.

Pandey, A., Singh, N., Gupta, S.C., Rana, J. S. y Gupta.2009. Relative expresión of cell growth regulatory genes insulin-like growth factors (IGF-1 IGF-2) and their receptors (IGF-1R and IGF-2R) in somatic cell nuclear transferred (SCNT) and in Vitro fertilizad (IVF) pre-implantation buffalo embryos. *Cell Biology International* 33 pp. 555-564.

Ronan, P.J. y Summers, C.H. 2011. Molecular Signaling and Translational Significance of the Corticotropin Releasing Factor System. *Molecular Biology and Translational Science.* 98 pp. 235-292.

Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J. y Kisfalvi, K. 2010. Crosstalk between Insulin/insulin-like Growth Factor-1 Receptors and G Protein-coupled Receptro Signaling Systems: A Novel Target for the Antidiabetic Drug Metformin in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research.* 16(9) pp. 2505–2511.

Ruginsk, S.G., Lopes da Silva, A., Ventura, R.R., Elias, L.L.K. y Antunes-Rodrigues, J. 2009. Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: Review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42 (1) pp. 61-67.

Sánchez-Lemus, E. y Arias-Montaña, J.M. 2004. Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G. *Rev Biomed* 15 (1) 33-48.

Sharpe A. L. y Phillips T.J. 2009 Central Urocortin 3 Administration Decreases Limited Access Ethanol Intake in Non-Dependent Mice. *Behav Pharmacol.* 20(4): 346-351. doi:10.1097/FBP.0b013e32832f01ba.

Sierra, R., Sánchez, T.P. y Campos, C. 2006. Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Psicooncología*. 3 (1) pp. 35-48.

Song, R.S., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R. y Santen, R.J. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor  $\alpha$  to the plasma membrane. *Science medicine*. 101 (7) pp. 2076-2081.

Stengel, A.Y Taché, Y. 2009. Neuroendocrine Control of the Gut During Stress: Corticotropin-Releasing Factor Signaling Pathways in the Spotlight. *Annual Review of Physiology* 71 (1) pp. 219-239.

Sweet, D. T. y Tzima, E. 2009. Spatial signaling networks converge at the adaptor protein Shc. *National Institute Health*. 8 (2) pp. 231-235.

Taché, Y. y Bonaz, B. 2007. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *The Journal of Clinical Investigation*. 117 (1) pp. 33-40.

Taboubi, S., Garrouste, F., Parat, F., Pommier, G., Faure, E., Monferran, S., Kovacic, H. Y Lehmann, M. 2010. Gq-coupled Purinergic Receptors Inhibit Insulin-like Growth Factor-1/Phosphoinositide 3-kinase Pathway –dependent Keratinocyte Migration. *Molecular Biology of the Cell*. 21 pp. 946-955.

Trümbach, D., Graf, C., Pütz, B., Kühne, C., Panhuysen, M., Weber, P., Holsboer, F., Wurst, W., Welzl, G. y Deussing, J.M. 2010. Deducing corticotropin-releasing hormone receptor type 1 signalling networks from gene expression data by usage of genetic algorithms and graphical Gaussian models. *BMC Systems Biology*. 159 (4) pp. 1-16.

Ugolini A., Sokal D., Arban R., y Large C. 2008 CRF1 receptor activation increases the response of neurons in the basolateral nucleus of the amígdala to afferent stimulation **2**: 2. doi: 10.3389/neuro.08.002.2008

Uhlik M., Temple B., Bencharit S., Kimple A., Siderovski D. y Johnson G. 2004 Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *Journal of Molecular Biology* 345 (1): 1-20.

Van, K.K., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E. y Peeters, P.J. 2009. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* 58 pp. 135-144.

Valenzuela-Harrington, M., Negrete-Díaz, V. y Rodríguez-Moreno, A. 2007. Núcleo Coeruleus. Neurotransmisores, Funciones y Patología. *Anestesia en México*. 19(3) pp. 155-166.

Wang, J. y Li, S. 2007. Corticotropin-releasing factor family and its receptors: Tumor therapeutic targets? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 pp. 785-788.

Xu, D. y Cheng-Kui, Q. 2008. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *NIH Public Access*. 13 pp. 4925-4932.

Yang, Li-Z., Tovote, P., Rayner, M., Kockskamper, J., Pieske, B. y Spiess, J. 2010. Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *European Journal of Pharmacology*. 632 pp. 1-6.

Yun-Sik, C., Hee-Yeon, C., Kari, R.H., Janice, R. N. y Karl, O. 2008. IGF-1 Receptor-mediated ERK/MAPK signalling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *InterScience* 56 pp. 791-800.

Zmijewski, M.A., Sharma, R.K. y Slominski, A. 2007. Expression of molecular equivalent of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult retinal pigment epithelium. *Journal of Endocrinology*. 193 pp. 157-169.

Zorrilla, E.P., Taché, Y. y Koob, G. F. 2003. Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. *Pharmacological Sciences*. 24 (8) pp. 421-427.

Zopf, Y., Baenkler, H. W., Silbermann, A., Hahn, E. G. y Raithel, M. 2009. The Differential Diagnosis of Food Intolerance. *Deutsches Ärzteblatt International* 106 (21) pp. 359-370.