



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN POR ESTROGENOS DE LA FUNCIÓN
DEL RECEPTOR LPA1 PARA ÁCIDO
LISOFOSFATÍDICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

DIANA ELVIRA TAPIA CARRILLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR JESÚS ADOLFO GARCIA SAINZ
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno

Tapia
Carrillo
Diana Elvira
62 78 99 88
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099306010

2.- Datos del tutor

Dr
Jesús Adolfo
García
Sainz

3.- Datos del sinodal 1

Dra
Ana María
López
Colomé

4.- Datos del sinodal 2

Dra
Claudia
González
Espinosa

5.- Datos del sinodal 3

Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

6.- Datos del sinodal 4

Dra
Rocío
Alcántara
Hernández

7.- Datos del trabajo escrito

Regulación por estrógenos de la función del receptor LPA1 para ácido lisofosfatídico
49 p
2012

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular dentro del laboratorio del Dr. J. Adolfo García Sáinz de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo de donativos de DGAPA-PAPIIT y CONACYT. La **Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez** asesoro directamente a Diana Elvira Tapia Carrillo en la elaboración de este trabajo.

DEDICTORIA

A mi mamá la **Lic. Ma. Antonia Carrillo Flores** y a mi tío el **Arq. Ignacio Alfonso Carrillo Flores**. Estoy profundamente agradecida de recorrer el camino junto a ustedes, soy afortunada por tenerlos a mi lado son la fuerza, el motor y el amor en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la **Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez** por apoyarme siempre y no dejarme vencer en este difícil proceso, por todas sus palabras de apoyo y aliento en los momentos más difíciles, por haberme ayudado en la elaboración de este escrito, por ser más que una tutora, por ser mi amiga.

Al **Dr. Garcia-Sainz** por haberme aceptado en su laboratorio, por todo su apoyo y paciencia.

A la **Dra. López-Colome** la **Dra. Claudia González** y la **Dra. Laura Kawasaki** por revisar mi trabajo y darle mayor peso y forma, muchas gracias por todos sus consejos

A mi esposo **Tadeo Velázquez Caldelas** por toda su paciencia amor y complicidad. Gracias por permanecer junto a mí para disfrutar los momentos felices y también para superar las tristezas y las pruebas a veces demasiado duras que hemos vivido.

A mi hijo **Julian** por estar y ser Julian.

A mis amigas: **Yedith García Galván, Melisa Camacho González y Yadira de los Santos García** Sin ustedes mi vida seria infinitamente aburrida. Gracias por todas esas tardes de pláticas y aventuras que hemos compartido.

A mi amigo **Aaron Rodríguez** por corregir siempre mis signos de puntuación aunque creo que ha servido de poco porque aun los omito bastante.

A mi hermanita **Erika Tapia Carrillo**. Sí no hubiera sido por ti habría reprobado muchas materias gracias por desvelarte conmigo para ayudarme con mis tareas, con todo y lo consentida que estas eres la mejor hermana.

A mi hermana **Mariana Tapia Carrillo** por ponerme a prueba tantas veces y sacar lo mejor en mí

A mi Universidad.

ABREVIATURAS

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

Ca²⁺: Ión Calcio.

[Ca]_i: Concentración de calcio intracelular.

ER-α: Receptor para estrógenos alfa.

ER-β: Receptor para estrógenos beta.

E2: 17-β estradiol.

GDP: Guanosin difosfato.

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G.

GTP: Guanosin trifosfato.

IP3: Inositoltrifosfato.

LPA: Acido lisofosfatídico.

LPA1: Receptor para ácido lisofosfatídico 1.

LPA1-EGFP: Receptor para acido lisofosfatídico unido a la proteína verde fluorescente.

PI3K: Fosfatidilinositol-3-fosfato.

PKA: Proteína cinasa A.

PKC: Proteína cinasa C.

INDICE

1. Introducción	1
2.1. Comunicación Celular	1
2.1.2Tipos de comunicación entre las células.....	4
2.2 . Los receptores.....	6
2.2.1. Tipos de receptores.....	7
2.3. Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR's).....	9
2.3.1. Vías de señalización de los GPCR's.....	15
2.3.2. Mecanismos de desensibilización de los GPCR's.....	18
2.4. Receptor para ácido lisofosfatídico	22
2.5. Receptor para estrógenos.....	26
2. Antecedentes	30
3. Planteamiento del problema	32
4. Hipótesis	32
5. Objetivos	32
5.1. Objetivos particulares.....	32
6. Materiales y métodos	33
7. Resultados	34
8. Discusión	40
9. Conclusiones	47
10. Bibliografía	48

1.- INTRODUCCION

2.1- Comunicación celular.

Para todos los seres vivos, desde los unicelulares hasta los pluricelulares, la comunicación celular tiene un papel muy importante en la sobrevivencia del organismo y esta comunicación puede entenderse como los mecanismos por los cuales las células intercambian información entre ellas y con el medio externo para lograr un efecto o cambio metabólico. En el caso de los organismos pluricelulares este intercambio de información puede ocurrir entre células de un mismo tipo, por ejemplo células epiteliales que responden a los cambios de temperatura, pero también puede ocurrir entre células de distintos tipos, involucrando células de varios sistemas u órganos, por ejemplo las células que secretan hormonas sexuales como los estrógenos tienen la capacidad de llevar su mensaje a diferentes órganos provocando diversos efectos (8, 12, 14, 20).

De manera similar a como nosotros utilizamos en el lenguaje a las palabras como método de comunicación para organizarnos y entendernos, la herramienta que utilizan las células para comunicarse se encuentra en forma de moléculas que actúan como mensajes químicos que son interpretados por otras células para provocar respuestas específicas. Existen muchos tipos de moléculas señal o mensajeros químicos, entre ellos proteínas, pequeños péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos e incluso gases disueltos en el medio como el óxido nítrico y el monóxido de carbono (1, 6, 7, 12, 14). Por otra parte, para que el mensaje pueda

ser captado por las células éste debe ser recibido por proteínas especializadas llamadas receptores, a los cuales se unen las moléculas señal.

Dependiendo de la naturaleza química de los mensajeros estos pueden atravesar la membrana plasmática o quedarse en el exterior de ella. Las moléculas señal que atraviesan la membrana plasmática se unen a receptores intracelulares.

Debido a las características de la membrana las moléculas señalizadoras que atraviesan la membrana deben ser pequeñas o hidrofóbicas tales como las hormonas esteroideas, los retinoides y las hormonas tiroideas entre otros; sin embargo, algunos esteroides no difunden libremente a través de la membrana si no que necesitan unirse a otras proteínas para poder transportarse dentro de la célula. Un ejemplo, es la proteína transportadora de solutos orgánicos y esteroides OST α -OST β la cual funciona como un heterodímero al cual se unen moléculas tales como la prostaglandina E2, el sulfato de estrona y la digoxina para su transporte al interior de la célula (4). Por otro lado, debido a que la membrana representa una barrera difícil de pasar para moléculas de gran tamaño o de carácter hidrofílico, este tipo de moléculas señal se unen a receptores que se encuentran insertados en la membrana plasmática (figura 1). Estos receptores, al recibir la señal, sufren rearrreglos estructurales que llevan a la producción de moléculas llamadas segundos mensajeros. Los segundos mensajeros van propagando y ampliando la señal a través de una serie de eventos denominado cascada de transducción de señales (1, 7, 12, 20).

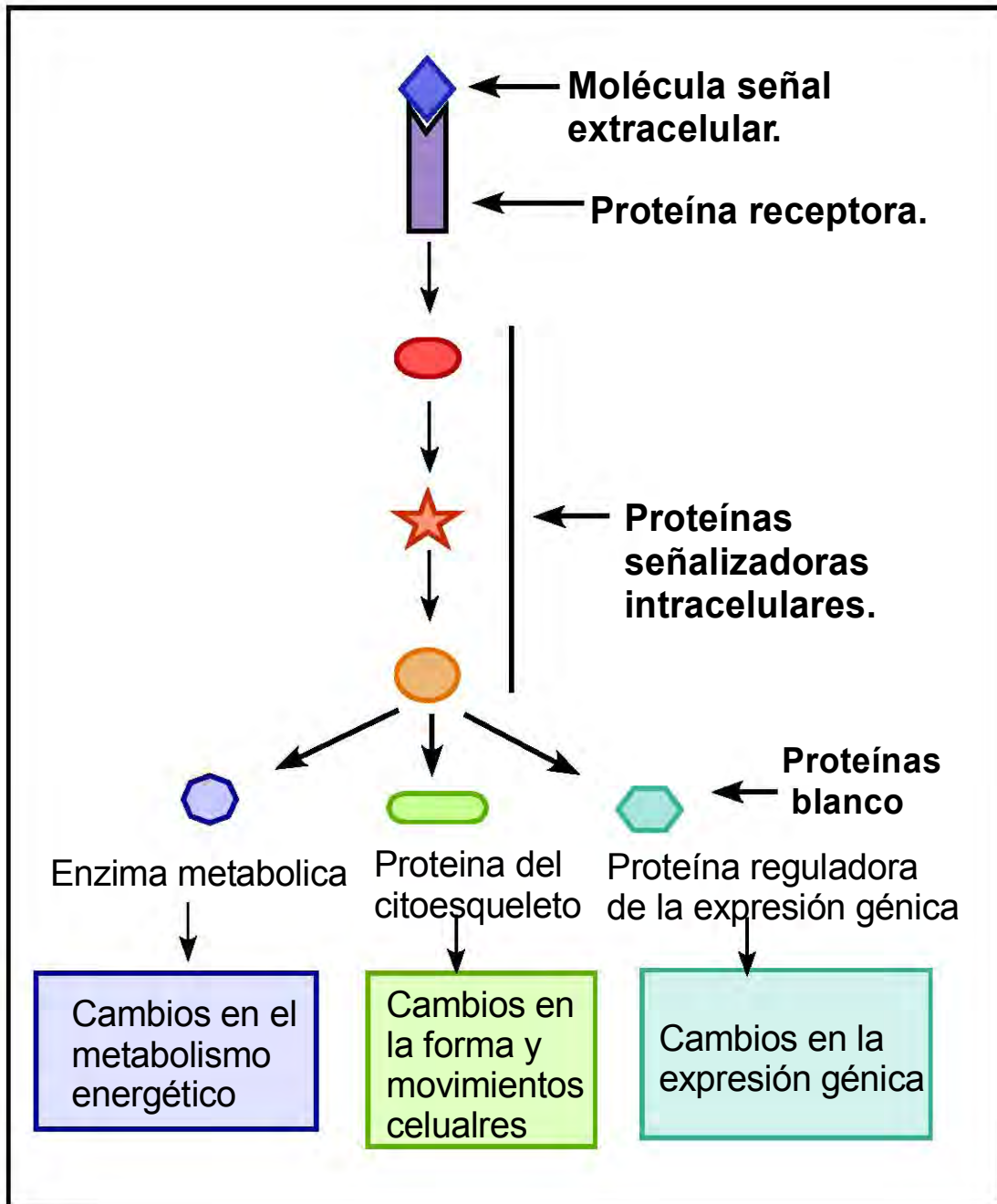


Figura 1. Mecanismo básico de transducción de señales mediada por segundos mensajeros. Una molécula desde el exterior de la célula se une a un receptor de superficie celular lo cual provoca un cambio en el receptor que induce la activación de moléculas señalizadoras intracelulares que finalmente inducen un cambio en la expresión génica, fisiología o metabolismo celular. (Modificado de Alberts et al 2002)

2.1.1. Tipos de comunicación entre células.

Tomando en cuenta la distancia que viaja el primer mensajero y otras características

Las formas de clasificación entre las células se clasifican en:

1) La comunicación yuxtacrina o dependiente de contacto, es aquella en la que moléculas ancladas a la cara externa de la membrana de una célula interactúan con receptores de una célula adyacente (figura 2A). Este tipo de comunicación es especialmente importante durante el desarrollo embrionario y en las respuestas del sistema inmune (6, 20).

2) La comunicación autocrina, es aquella en la que una célula responde a mensajes liberados por sí misma. Ejemplos de este tipo de comunicación celular son las neuronas presinápticas las cuales pueden captar por medio de sus receptores los neurotransmisores que ella misma ha liberado para dejar de secretarlos o reutilizarlos.

3) La comunicación paracrina es aquella en la cual las células secretan mensajeros al espacio extracelular donde actúan de manera local sobre células cercanas (figura 2B). los factores de crecimiento, prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos.

4) La comunicación endocrina es aquella en donde las señales son secretadas por glándulas de secreción interna como la hipófisis y que una vez liberadas viajan a través del flujo sanguíneo hasta llegar a la célula receptora (figura 2D) por ejemplo el

hipotálamo envía hormonas al torrente sanguíneo para unirse a diferentes tipos celulares para regular funciones como el sueño la saciedad el hambre y las emociones (1,12).

5) La comunicación neurotransmisora, es la que ocurre entre células neuronales y en la que la señal llamada neurotransmisor es liberada a lo que se denomina el espacio sináptico (figura. 2C).

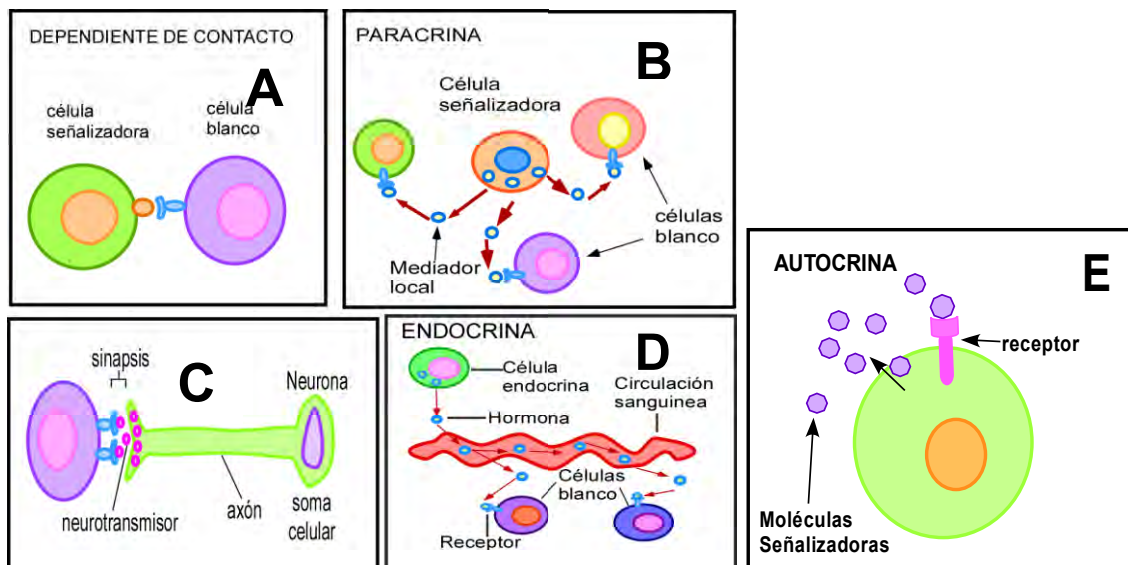


Figura 2. Tipos de comunicación celular. (Modificado de Alberts et al 2002)

2.2. Los receptores.

Los receptores son proteínas capaces de reconocer una molécula señal y transmitir su mensaje para que se produzca una respuesta en el interior de la célula y por lo tanto tienen dos funciones esenciales: el reconocimiento de la molécula señal y producir la secuencia de eventos que inducen a la respuesta celular.

Aunque existe cierta flexibilidad en los receptores, estos se caracterizan por ser selectivos, de esta forma no cualquier molécula puede interaccionar con cualquier receptor y esta asociación depende de que la estructura del receptor se acople con la estructura de la molécula señal. Dos factores juegan un papel importante en la respuesta que producen los receptores estos son:

1) El grado de afinidad: que es la capacidad de una molécula señal para unirse a un receptor.

2) El grado de actividad: se refiere a la intensidad de la respuesta que esta unión produce.

Estos factores son independientes entre sí lo que significa que podemos tener moléculas que se unan muy fácilmente a un receptor pero que produzcan una respuesta baja y viceversa(6, 12, 14).

2.2.1 Tipos de receptores.

Los receptores celulares se pueden clasificar en dos grandes grupos dependiendo de su localización en la célula: los intracelulares o nucleares y los receptores de membrana que se encuentran anclados en la membrana plasmática (figura 3). (20, 12, 14).

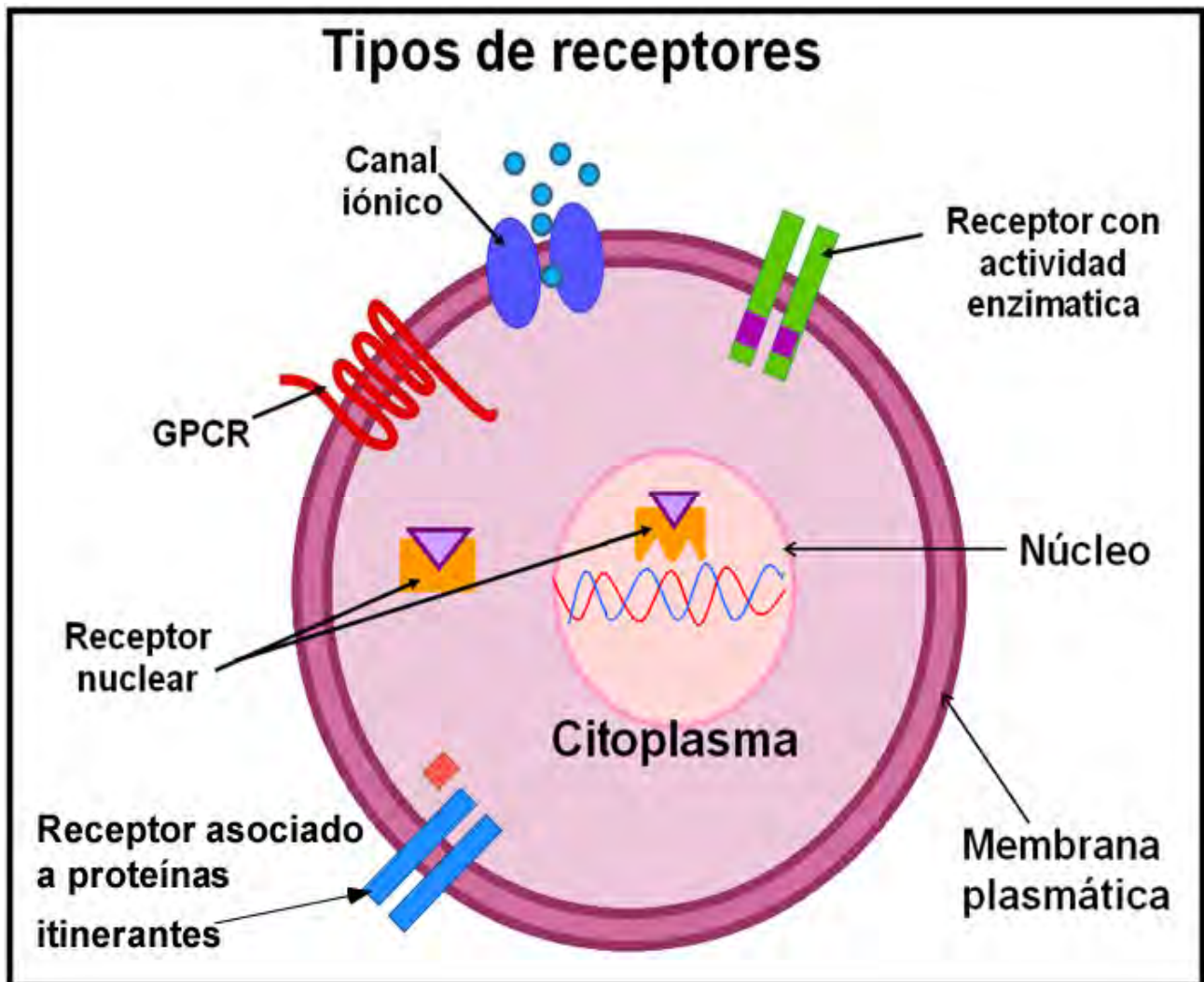


Figura 3. Principales tipos de receptores presentes en la célula. Se esquematizan tanto los receptores de superficie celular como los receptores nucleares. GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (Modificado de Krauss G 2003).

Receptores nucleares.

Estos receptores se encuentran en el interior de la célula y cuando reciben la señal se unen al ácido desoxirribonucleico (DNA) regulando directamente la transcripción de genes específicos (20). Los ligandos para estos receptores incluyen moléculas hidrofóbicas que pueden difundirse rápidamente a través de las membranas como son el cortisol, hormonas esteroides, hormonas tiroideas y la vitamina A (20, 17).

Receptores de membrana.

De manera general se pueden encontrar en la célula tres tipos de receptores en la membrana (figura 3):

1.- Los canales iónicos. Estos receptores actúan como compuertas moleculares que abren y cierran en respuesta a señales químicas o cambios en el potencial de membrana (1, 20, 17).

2.- Los receptores asociados a proteínas G. Estos receptores tienen como característica morfológica que atraviesan siete veces la membrana. Su acción está mediada por proteínas triméricas de unión a guanosina trifosfato (o proteínas G) las cuales a través de una cascada de transducción de señales provocan la producción y aumento de la concentración de segundos mensajeros como el diacilglicerol, el inositoltrifosfato, calcio entre otros (16, 20).

3.- Los receptores con actividad enzimática. Entre este tipo de receptores se encuentran aquellos con actividad de cinasa de tirosina y los receptores con actividad de cinasa de serina/treonina. La mayoría de ellos funcionan fosforilando grupos específicos de proteínas en la célula y atraviesan la membrana (16, 20).

4.- Receptores asociados a proteínas itinerantes. Algunos receptores pertenecientes a la superfamilia 1 de citocinas (como el receptor para prolactina o el receptor para la hormona de crecimiento) no presentan una actividad de enzimática de tirosina cinasa en si mismos si no que una vez activados se unen física y funcionalmente a proteínas que se encuentran en el citoplasma de la célula tales como Jak1 y Jak2 entre otras provocando una cascada de señalización (5, 12).

2.3. Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G.

Estructura.

Los receptores acoplados a proteínas G forman una gran superfamilia de receptores de membrana que regulan muchas de las respuestas celulares hacia hormonas y neurotransmisores además de ser responsables de la visión el gusto y el tacto. En el nivel más básico todos los gpcrs están caracterizados por la presencia de siete hélices transmembranales que están separadas por asas intracelulares y extracelulares de manera alternada todas ellas formadas por una única cadena polipeptídica dejando el extremo amino afuera y el extremo carboxilo en el interior celular (figura 4). Los GPCR's en vertebrados están divididos en base a su secuencia y estructura dentro de

5 familias: rodopsina (familia A), secretina (familia B), glutamato (familia C), adhesión y la familia frizzled/taste 2. La familia rodopsina es por mucho la más grande y más diversa de estas familias. Los estímulos externos que son captados por los GPCR's son muy diversos porque incluyen neurotransmisores, hormonas, lípidos, fotones, odorantes, nucleótidos e iones calcio. Todos los GPCRs funcionan a través de una molécula intracelular denominada proteína G la cual activa a un efector que provoca a su vez la producción y acumulación de segundos mensajeros (11, 20).

RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNAS G

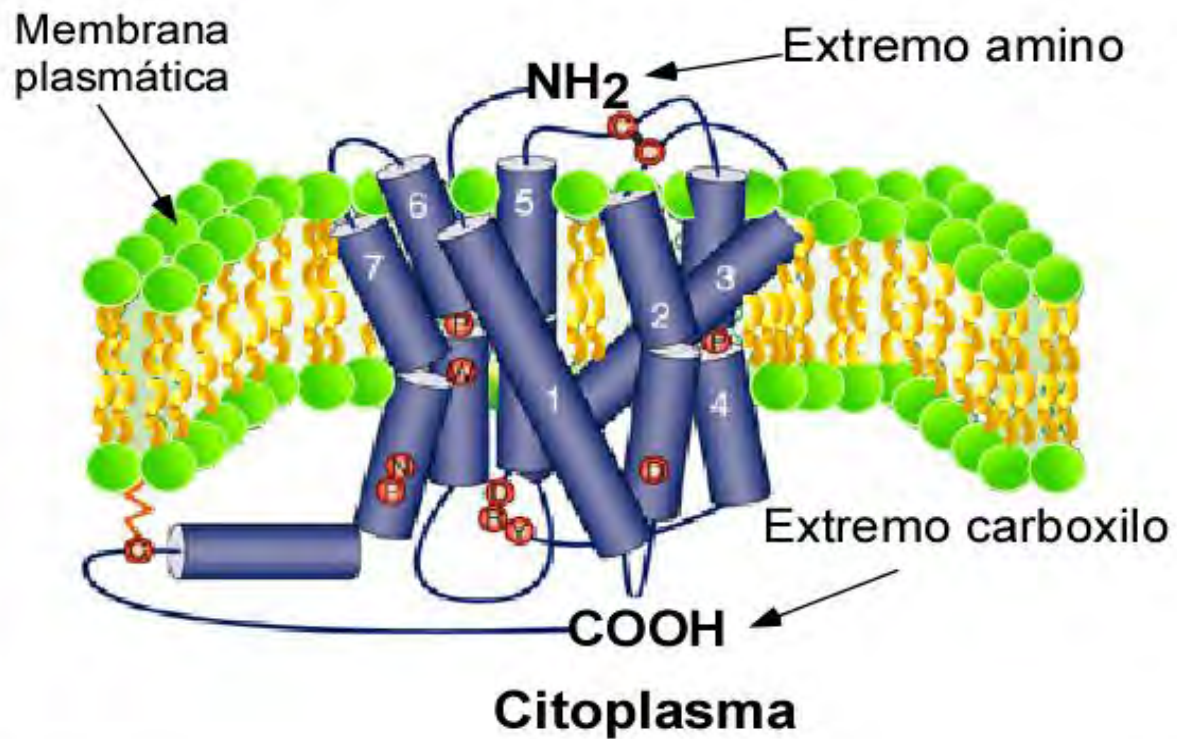


Figura 4. Estructura típica de un receptor de siete dominios transmembranales. Los receptores acoplados a proteínas G son receptores transmembranales con siete dominios que atraviesan la membrana siete veces el extremo amino NH_2 se localiza en la parte externa de la célula mientras que el extremo carboxilo COOH se encuentra en el espacio citoplasmático (Modificado de Eun-Mi y .Kyong-Tai 2002).

Las proteínas G se pueden dividir en dos grupos:

1. Las proteínas G de bajo peso molecular o monoméricas, como Ras, que participa en vías de señalización que conducen a la proliferación celular; Rho que modifica la estructura celular actuando sobre los elementos del citoesqueleto y Rab que está implicada en la movilización intracelular de vesículas (17)
2. Las proteínas G heterotriméricas, constan de tres subunidades (alfa, beta y gama) las cuales se encuentran asociadas a la cara interna de la membrana plasmática y a los GPCR's. Estos heterotrimeros son comúnmente clasificados en cuatro clases dependiendo de la subunidad $G\alpha$ que las constituya, que pueden ser: G_s , la cual activa a la adenilato ciclasa; G_i , que inhibe a la adenilato ciclasa; G_q , que activa a la fosfolipasa C, $G_{12/13}$ que está implicada en la activación de la vía de Rho participando en procesos celulares tales como la reorganización del citoesqueleto. (20, 26).

Las proteínas G heterotriméricas son moléculas que tienen una actividad intrínseca de GTPasas, esto significa que tienen la capacidad de hidrolizar el guanosin trifosfato (GTP). En su forma inactiva, la subunidad α de la proteína G tiene unido guanosín difosfato (GDP). La unión del ligando con su GPCR provoca un cambio conformacional en el receptor que induce la activación de las proteínas G, provocando que la subunidad α libere el GDP y una GTP; este intercambio provoca la disociación del complejo separándose α de $\beta\gamma$ y permitiendo que estas subunidades activen efectores

moleculares, los cuales a su vez producen segundos mensajeros tales como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y el inositol trifosfato IP3 (11, 20, 26). La subunidad α hidrolizará el GTP convirtiéndolo en GDP provocando con esta acción la terminación de la respuesta debido a el cese de la interacción de la subunidad α con el receptor e induciendo su re-asociación a $\beta\gamma$ quedando el complejo inactivo formado por α -GDP, β y γ (1,11, 20).

Por otro lado una vez que el receptor se ha unido a su ligando las subunidades $\beta\gamma$ se liberan de la subunidad α -GDP, quedando disponibles para interaccionar con diversos grupos de enzimas efectoras y canales iónicos. De esta forma, el dímero formado por $\beta\gamma$ es capaz de unirse a una gran diversidad de moléculas efectoras y regular su actividad.

Algunos de los efectores moleculares que son regulados por β/γ incluyen a la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, canales de calcio sensibles a voltaje, la fosfatidilinositol-3-cinasa y moléculas de la vía de cinasas de proteínas activadas por mitógenos entre otros (11, 17, 20). (Figura 5)

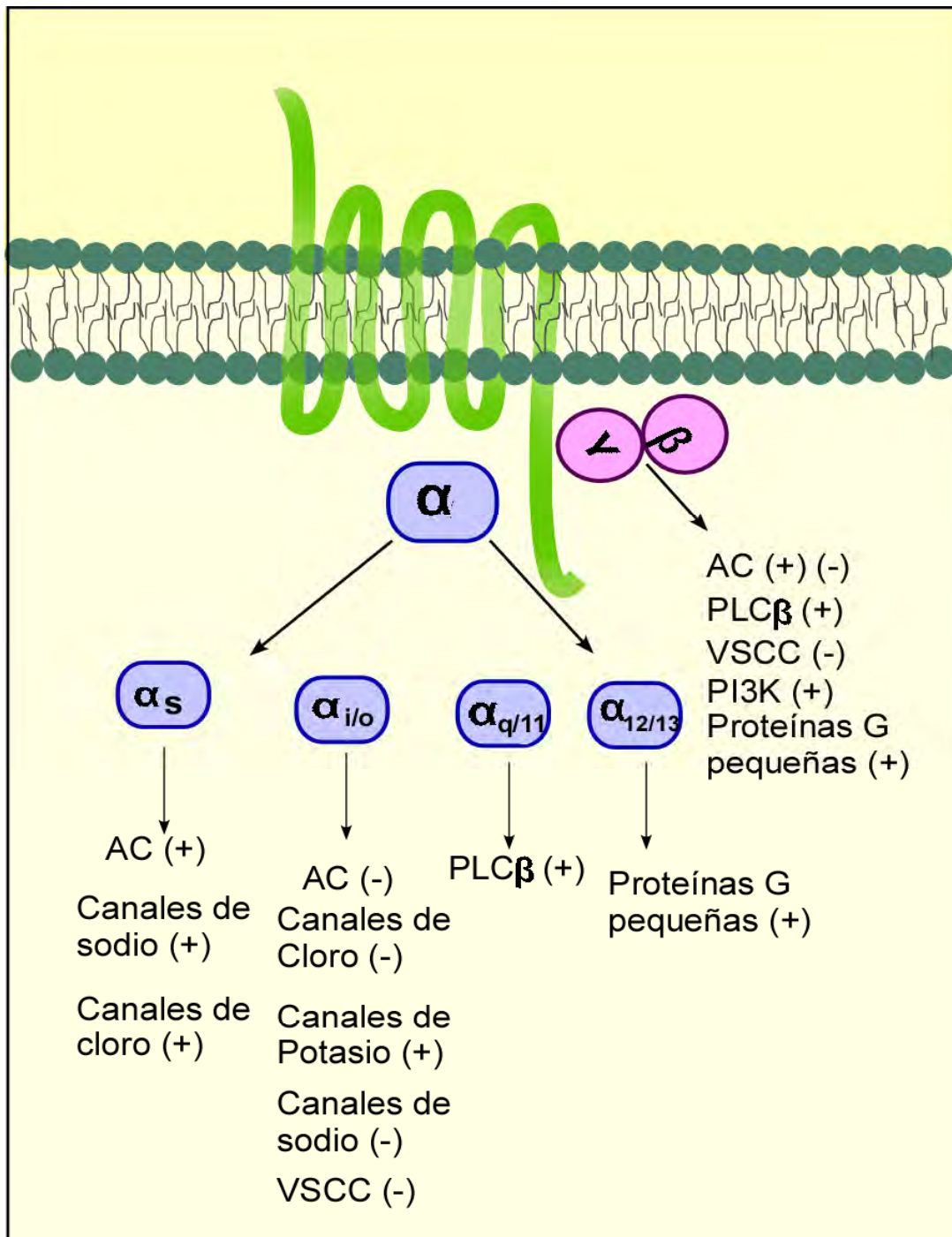


Figura 5: Efectores moleculares activados por las diferentes subunidades de las proteínas G heterotriméricas en mamíferos. AC: Adenilato ciclasa. PLC β : Fosfolipasa-C-beta. PI3K: Fosfatidil-inositol-3-cinasa VSCC: Canales de calcio sensibles a voltaje (+): activación (-): inhibición. (Modificado de Eun-Mi y Kiung-Tai 2002).

2.3.1. Vías de señalización de los GPCR's

Dependiendo de la proteína G asociada, los GPCRs pueden activar diferentes vías (figura 6).

Vía de los fosfoinosítidos.

La activación de la proteína Gq produce a su vez la activación de la fosfolipasa C. Esta molécula hidroliza el fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato (PIP₂), un lípido que se encuentra en la membrana plasmática, para generar dos productos que actúan como segundos mensajeros: el diacilglicerol y el inositoltrifosfato (IP₃). (7).

El IP₃ difunde a través del citosol y actúa sobre el retículo endoplásmico liberando iones de calcio (Ca²⁺), que a su vez puede provocar la entrada de calcio en la célula a través de canales de calcio. Los niveles altos de Ca²⁺ activan procesos tales como la contracción del músculo liso, la hidrólisis de glucógeno y la liberación vesicular de neurotransmisores (11,20).

Para regular la señal, el IP₃ puede ser degradado a inositol bifosfato, inositol fosfato o inositol por medio de fosfatasas o bien puede ser fosforilado por cinasas a inositol-4-fosfato. Por otro lado, el calcio liberado del retículo, puede tener varios destinos:

- 1) Ser recapturado por la mitocondria.
- 2) Unirse a diversas proteínas, provocando diferentes respuestas o
- 3) Por último, puede ser bombeado al exterior de la célula o los depósitos de calcio

del retículo (23).

El diacilglicerol (el segundo producto de la hidrólisis del PIP₂) activa a una cinasa denominada proteína cinasa C, con actividad de cinasa de serina/treonina fosforilando proteínas clave para la respuesta celular (17).

Vía de la adenilato ciclasa.

En esta vía la activación de la proteína G_s induce la subsecuente activación de la enzima adenilil ciclasa, transformando el ATP en AMPc elevando la concentración de esta molécula. Tanto la proteína G como la adenilil ciclasa permanecen en la membrana plasmática mientras que el AMPc puede difundir a través del citoplasma. El AMPc se une a la proteína cinasa A (PKA) para dar lugar a la forma activa de esta cinasa y así fosforilar residuos de serina/treonina de diferentes moléculas blanco, por ejemplo en la estimulación del receptor β -adrenérgico por adrenalina la PKA fosforila a la glucógeno sintetasa y de esta manera se inhibe la síntesis de glucógeno (7).

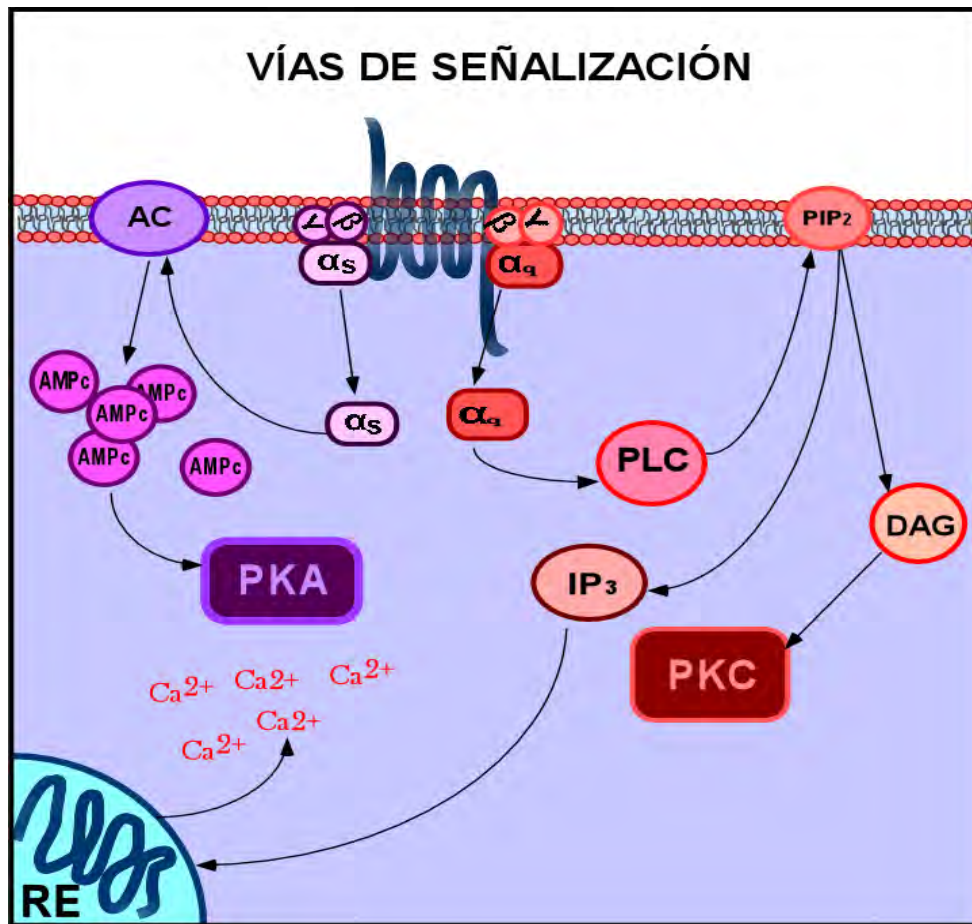


Figura 6. Vías principales de señalización de los receptores acoplados a proteínas G. A la izquierda (en morado) vía de la adenilato ciclasa. A la derecha (en rojo) vía de los fosfoinosítidos. RE: Retículo endoplasmico. IP₃: Inositoltrifosfato. AMPc: Adenocin monofosfato-3',5' cíclico. PKA: Proteína cinasa A. PKC: Proteína cinasa C. AC: Adenilato ciclasa. PLC: fosfolipasa C. DAG: Diacilglicerol. PIP₂: fosfatidil inositol 2 fosfato. Ca²⁺: ion calcio. (Modificado de García-Sainz et al 2000).

2.3.2. Mecanismos de desensibilización.

La desensibilización de un receptor se refiere a la ausencia o disminución de la respuesta como consecuencia de una estimulación prolongada o consecutiva por un agonista. Existen dos tipos de desensibilización: la homóloga y la heteróloga y aunque cada una se produce de manera diferente y poseen formas distintas de acción, tienen en común que el principal mecanismo para la desensibilización es la fosforilación de los receptores (18).

La desensibilización homóloga.

Ocurre cuando hay una pérdida de la respuesta como consecuencia de la unión que activa al receptor, por ejemplo la aplicación sostenida de estímulos de adrenalina sobre el receptor adrenérgico provoca la desensibilización de este receptor (Figura 8).

El receptor acoplado a su agonista se convierte en sustrato para ser fosforilado por miembros de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK's) las cuales son cinasas que fosforilan residuos de serina o treonina en sitios específicos de los GPCR's. Estas cinasas unidas al receptor tienen una alta afinidad por las β -arrestinas las cuales actúan como proteínas adaptadoras. Las β -arrestinas al unirse al GPCR fosforilado provocan el desacoplamiento del receptor de su proteína G evitando cualquier respuesta (15, 18, 30). Al complejo GPCR fosforilado/arrestinas se le unen moléculas de clatrina iniciando la internalización de los GPCR's y una vez internalizado

el receptor puede ser desfosforilado y reciclado hacia la membrana plasmática o bien pueden ser enviados hacia los lisosomas para su degradación (13,18, 30) (Figura 7).

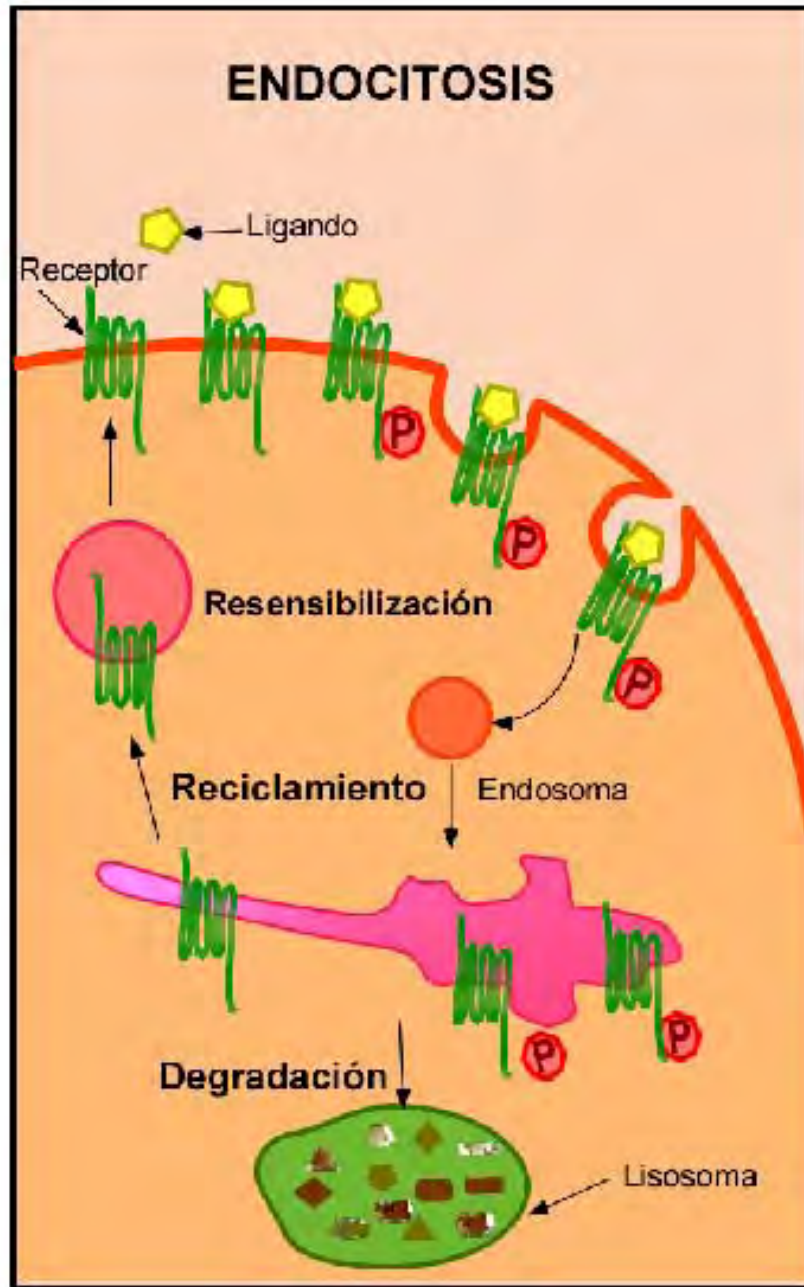


Figura 7. Vías endocíticas de los receptores. Una vez fosforilados los receptores son internalizados en la célula donde pueden seguir dos caminos ser resensibilizados y enviados de vuelta a la superficie celular o ser degradados dentro de los lisosomas. P: Fosfato. (Modificado de Sorkin and Zastrow 2002)

Existen otros mecanismos de endocitosis los cuales son independientes de clatrina, estos están mediados por caveolas, un tipo de balsas lipídicas las cuales son porciones de la membrana plasmática con mayor contenido de lípidos tales como colesterol o esfingolípidos lo que les confiere la propiedad de ser partes menos fluidas que el resto de la membrana, además de formar invaginaciones. La formación y mantenimiento de las caveolas se lleva a cabo en gran parte por la caveolina una proteína integral de la membrana. Una vez endocitado el receptor la caveola con su contenido puede ser transportado al endosoma temprano para reciclar su contenido o bien puede ser enviado a los endosomas tardíos y posteriormente a los lisosomas para su degradación (13,18, 30).

La desensibilización heteróloga.

La desensibilización heteróloga se lleva a cabo cuando la activación de un receptor induce la desensibilización de otros tipos de receptores (15,13). (Figura 8). En este caso la activación de un receptor por su agonista desencadena una cascada de transducción de señales en la cual son activadas cinasas dependientes de segundos mensajeros como PKA o PKC; se sabe que éstas pueden fosforilar a otros tipos de GPCR's los cuales no están unidos a su agonista, los fosforilan e inducen su desensibilización en un evento de desensibilización cruzada. Por otro lado este tipo de regulación no es un evento raro entre las vías de regulación de los GPCR's ya que el número de efectores es pequeño en comparación con el gran número de GPCR's que existen.(11,18).

Desensibilización homóloga y heteróloga

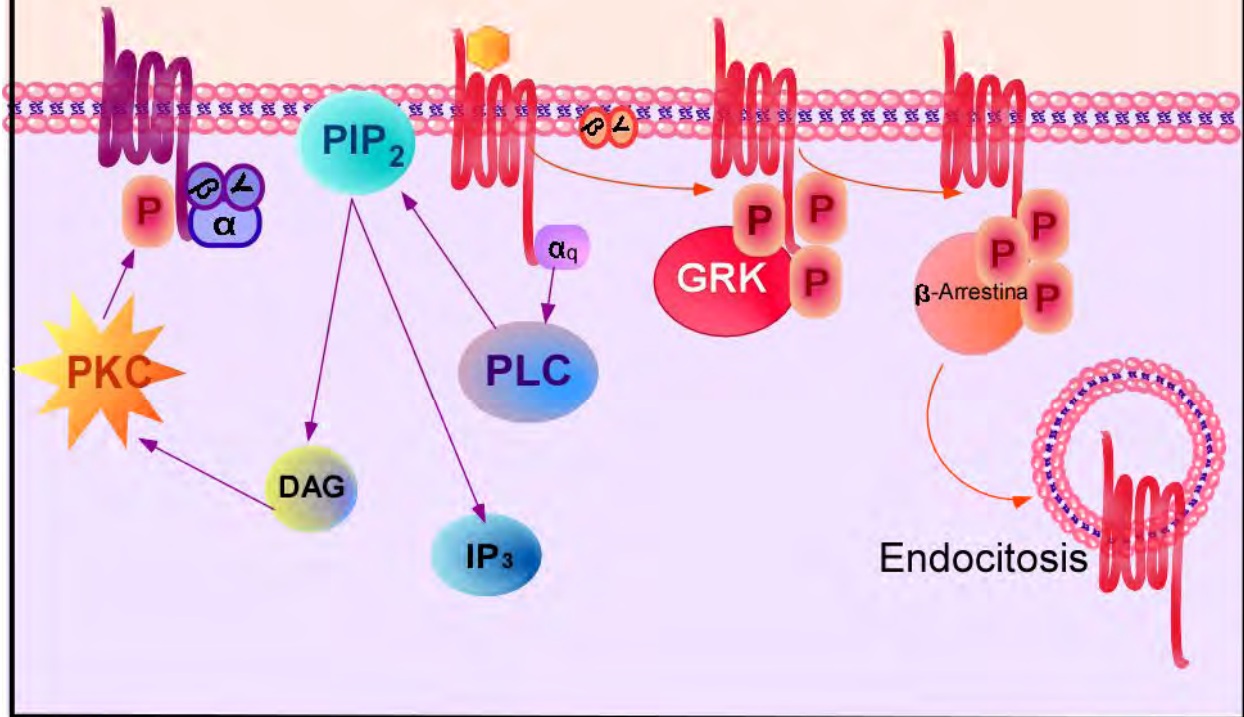


Figura 8. Desensibilización homóloga y heteróloga de los GPCR's. La desensibilización homóloga (flechas rojas) se lleva a cabo a través de la activación del receptor por su propio ligando y es fosforilado por medio de las GRK's mientras que la desensibilización heteróloga (en flechas moradas) es mediada por la PKC la cual es activada como consecuencia de la activación de otro receptor. DAG: Diacilglicerol, IP₃: Inositol trifosfato, PKC: Proteína cinasa, PLC: Fosfolipasa C, GRK: Proteína cinasa de receptores acoplados a proteínas G, PIP₂: Fosfatidilinositol bifosfato, P: fosfato. (Modificado de Garcia-Sainz et al 2000).

2.4 Receptor para ácido lisofosfatídico (LPA).

El ácido lisofosfatídico LPA.

Los lisofosfolípidos son un grupo de lípidos importantes en la señalización celular debido a que de los lípidos de membrana éstos son los más hidrofílicos (29). La fórmula general para el glicerofosfolípido LPA es 1-acyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-phosphate el cual es producido principalmente en la membrana plasmática a partir de especies de fosfolípidos presentes en ella. Es producido por plaquetas activadas, leucocitos, células epiteliales, neuronales y tumorales (2,3). La síntesis de LPA comienza con la ruptura de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina o la fosfatidilserina y se lleva a cabo a través de dos vías principales:

1. La fosfolipasa D hidroliza la cabeza polar unida al fosforilo para formar ácido fosfatídico y este es cortado subsecuentemente por la fosfolipasa A2 para formar el LPA.
2. El corte de los fosfolípidos es llevado a cabo primero por la fosfolipasa A2 formando lisofosfolípidos los cuales sufren un segundo corte catalizado por la enzima ATX (que tiene actividad de liso-fosolipasa D) formando finalmente LPA.

El LPA ha sido uno de los lípidos más estudiados en parte por su influencia en procesos celulares tales como la comunicación célula-célula, proliferación, sobrevivencia, apoptosis y reorganización de fibras del citoesqueleto (3, 29).

Receptores.

El LPA lleva a cabo su acción señalizadora a través de cinco subtipos de receptores denominados LPA1, LPA2, LPA3, LPA4 y LPA5 los cuales pertenecen a la familia de los GPCR's. Estos receptores pueden activar diferentes tipos de proteínas G y vías de señalización dependiendo del contexto celular y subtipo de receptor, el LPA unido a su receptor puede activar a G_i , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ ó G_s activando diferentes vías de señalización. Los receptores para LPA son ubicuos, lo que significa que receptores para LPA se encuentran en muchos de los tipos de tejidos de mamíferos como por ejemplo cerebro, riñón, corazón, bazo, pulmón, hígado, piel, páncreas entre otros y puede existir más de un subtipo de receptor en un tejido. En el caso particular del LPA₁ este puede activar a las proteínas G_i , $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$ activando las vías de Ras, Fosfolipasa C, Fosfatidilinositol 3 cinasa y Rho (Figura 9) (2, 3, 8, 9).

Al igual que con otros receptores acoplados a proteínas G el receptor LPA1 al ser activado por su agonista produce un intercambio de GTP por GDP con la consiguiente disociación de la proteína G, formando las moléculas α -GDP y $\beta\gamma$. La desensibilización y subsecuente regulación de la función de estos receptores se lleva a cabo mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina en la tercera asa citoplasmática del receptor. Esta desensibilización puede llevarse a cabo de dos formas; a través de las GRK's cuando es homóloga y en el caso del receptor LPA1 por PKC cuando la desensibilización ocurre por un evento de regulación cruzada. (3, 13)

El calcio intracelular Ca^{2+} .

Muchos procesos celulares están regulados por el segundo mensajero Ca^{2+} incluyendo procesos de contracción del músculo, secreción, metabolismo, excitabilidad neuronal y proliferación. El mecanismo de acción básica del Ca^{2+} es simple, cuando la concentración de Ca^{2+} es baja, la célula se mantiene en reposo pero cuando esta concentración se eleva las células se activan llevando a cabo diferentes acciones dependiendo del contexto celular, debido a que el receptor LPA1 activa la proteína $\text{G}_{q/11}$ que conlleva a la liberación de Ca^{2+} uno de los parámetros para medir su actividad es la medición intracelular de calcio (1, 14).

Vías de señalización

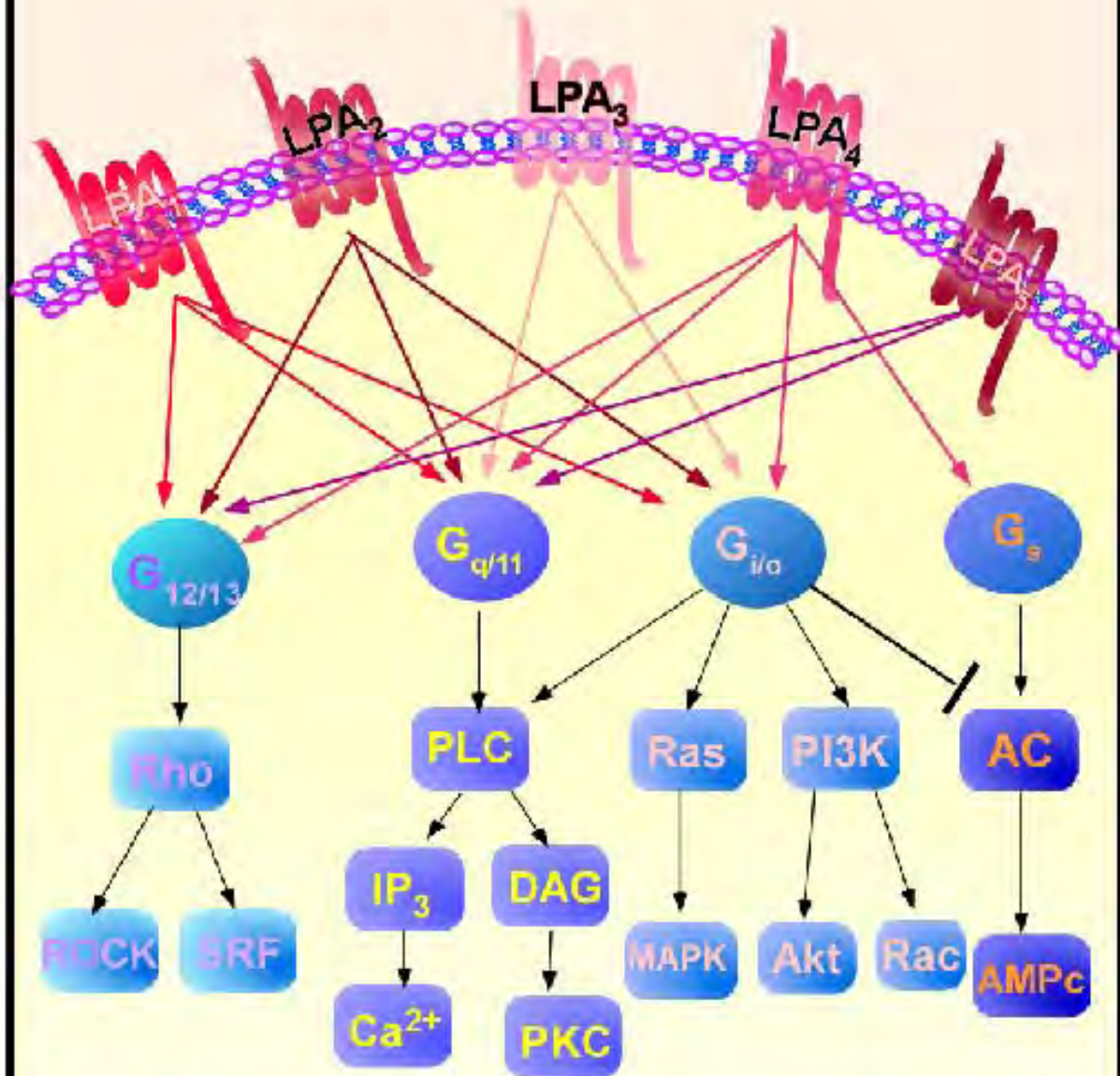


Figura 9: Vías de señalización de los receptores para LPA. ROCK: Proteína cinasa asociada a rho, SRF: Factor de respuesta al suero, PLC: Fosfolipasa C, IP₃: Inositol trifosfato, Ca²⁺: ion calcio, DAG: Diacilglicerol, PKC: Proteína cinasa C, MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos, PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa, AC: Adenilato ciclasa y AMPc: Adenosin monofosfato cíclico. Activación → Inhibición —| (Modificado de Anliker y Chun 2004)

5. Receptor para estrógenos.

Estructura.

El receptor para estrógenos clásico (ER) tiene una localización nuclear o citosólica que típicamente modula la actividad transcripcional de genes específicos en condiciones de metabolismo energético y desarrollo en órganos como cerebro, pituitaria, glándulas mamarias, útero, huesos, hígado y corazón. Existen 2 tipos o formas diferentes de este receptor; el ER α y el ER β , los cuales están codificados por diferentes genes ESR1 y ESR2 respectivamente, se encuentran en diferentes cromosomas y también existen numerosas variantes de splicing para ambos genes tanto en tejidos sanos como en tejidos enfermos. Ambos tienen funciones redundantes así como acciones únicas en las células y pueden existir ambas formas o solo una de ellas dependiendo del tipo celular (24).

Los receptores para estrógenos tienen una estructura que para su estudio se divide en seis dominios que están diferenciados por letras A B C D E y F. Los dominios AB del receptor están poco conservados entre las especies y representan la porción amino la cual contiene un sitio regulador de la transcripción el cual es blanco de diferentes cinasas. El dominio C es rico en cisteínas, está altamente conservado mientras los dominios E y F están moderadamente conservados y contienen el sitio de unión al ligando (16) (Figura 10).

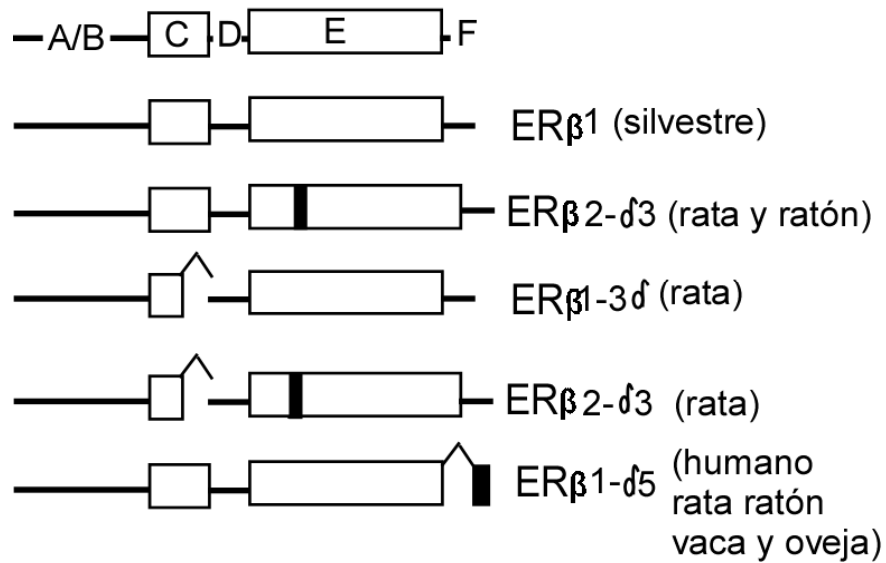


Figura 10. Variantes del receptor para estrógenos ERβ identificados en diferentes especies de mamíferos. El recuadro negro representa un aporcion de 18 aminoácidos extras en esos subtipos de receptores (Modificado de Deroo y Korach 2006).

Mecanismo de acción.

Los estrógenos inducen cambios celulares a través de diversos mecanismos. En el modelo clásico, el estrógeno difunde dentro de la célula y se une al receptor el cual está localizado en el núcleo. Este complejo receptor/agonista experimenta un cambio conformacional que produce la forma activa del receptor para prepararlo para su unión dentro de secciones del DNA de la célula en sitios específicos denominados “secuencias de elementos de respuesta a estrógeno”: Esta unión ocurre de forma directa o indirectamente a través de interacciones proteína-proteína con la proteína adaptadora 1 dando como resultado el reclutamiento de proteínas co-reguladoras (que pueden ser activadoras o represoras) hacia el promotor aumentando o disminuyendo la actividad de la transcripción por la RNA polimerasa II en genes cercanos. (19,24).

Estos mecanismos requieren por lo menos 45 minutos para la síntesis de nuevas proteínas y de más tiempo para alterar la fisiología celular (19). Estas respuestas se denominan genómicas ya que involucran la modulación de la expresión génica.

Se ha visto que los estrógenos pueden mediar acciones que debido a la rapidez con que se llevan a cabo, son consideradas como no genómicas. Estas acciones no genómicas involucran vías de señalización que son típicas de receptores transmembranales como los GPCR's (15) y debido a una amplia evidencia a favor de receptores para estrógenos asociados a la membrana (los cuales son enviados hasta ahí a través de proteínas tales como la caveolina-1 o Shc) se piensa que gran parte de estas acciones rápidas son mediadas por estos receptores (22,27).

Receptores para estrógenos y enfermedades asociadas.

Las vías que son activadas por los estrógenos juegan un papel importante en la fisiología normal de diferentes organismos como en la regulación del crecimiento, proliferación y funcionamiento de muchos tejidos reproductivos incluyendo: útero, vagina, ovario, oviducto y glándulas mamarias. Los estrógenos también tienen importantes sitios de acción en el hipotálamo, pituitaria y en regiones específicas del cerebro así como en el hígado, hueso y el sistema cardiovascular. Sin embargo existe mucha evidencia que sugiere una relación entre alteraciones en la señalización producida por los estrógenos y la iniciación, progresión y respuesta al tratamiento del cáncer (10, 24).

En el cáncer de seno el estrógeno está implicado posiblemente a través de la activación del receptor, que a su vez estimula la proliferación de células mamarias incrementando de esta manera la cantidad de células blanco sobre las que el estrógeno puede actuar. En el caso del cáncer de ovario del ochenta al noventa por ciento de los tumores surgen de la superficie del epitelio del ovario y este receptor se encuentra presente en dos de cada tres tumores de ovario humano. (10,24)

En el cáncer de colon el ER β es la isoforma predominante observada tanto en tejido de colon sano como cancerígeno. Los niveles de este receptor son más bajos en tejidos de colon canceroso que el reportado en tejido sano y estos niveles bajos están asociados a estados avanzados del cáncer de colon lo que sugiere que el ER β tiene un papel protector en la tumorigénesis del colon (10, 24, 27).

Por otro lado estrógeno está implicado en algunas otras enfermedades no relacionadas con el cáncer como la osteoporosis, la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer (10,24).

2.- ANTECEDENTES

Diversos trabajos muestran que la respuesta de muchos receptores acoplados a proteínas G (GPCR's), puede ser mediada a través de un proceso denominado regulación cruzada, en el cual la activación de un tipo de receptor por su agonista puede conllevar a la desensibilización o activación de otro tipo de receptores (13, 15,18).

En nuestro laboratorio se ha llevado a cabo una exhaustiva caracterización de los mecanismos de desensibilización heteróloga de los receptores α_1 -adrenérgicos y receptores para LPA, un ejemplo estudiado en nuestro laboratorio dentro de los receptores adrenérgicos es la regulación cruzada entre el receptor alfa uno b (α_{1b} -AR) que es un GPCR y el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 que es un receptor con actividad intrínseca de tirosina cinasa (25).

Investigaciones recientes mostraron que esta desensibilización cruzada también puede llevarse a cabo entre receptores intracelulares y GPCR's. Nuestro laboratorio demostró que la activación del receptor a estrógenos α (ER- α) por el 17 β -estradiol (E2) regula la respuesta a la noradrenalina del α_{1b} -AR induciendo su desensibilización a través de la proteína cinasa C (PKC) por otro lado dentro de los estudios realizados sobre la función del los receptores para ácido lisofosfatídico se demostró que el receptor LPA1 puede ser fosforilado y desensibilizado a través de la cinasa PKC (3,15).

Debido a que tanto el receptor para LPA1 como el receptor para estrógenos se encuentran involucrados en enfermedades como cáncer de seno y ovario y que el LPA1 puede ser fosforilado y desensibilizado por la proteína cinasa C en este trabajo decidimos estudiar si existe una regulación heteróloga del LPA1 provocada por la activación el ER- α .

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que existe regulación heteróloga entre el receptor para estrógenos ER- α y el receptor α -1b AR. Sin embargo se desconoce si este tipo de regulación cruzada puede ocurrir en otros tipos de GPCR's como lo es el receptor LPA₁.

4.- HIPOTESIS

Si el estrógeno regula heterológamente al receptor LPA₁ entonces al estimular las células con E2 y posteriormente estimular con LPA se observará una disminución en la liberación de $[Ca]^{2+}$ inducida por el fosfolípido.

5.- OBJETIVO

Determinar si existe regulación sobre el receptor LPA₁ debida a la activación del ER α por E2.

5.1 Objetivos particulares.

- Establecer las concentraciones óptimas de LPA Y E2 que se van a utilizar.
- Previa estimulación con E2 determinar si existe una disminución en la liberación de $[Ca]^{2+}$ como respuesta a la estimulación por LPA.
- Identificar las cinasas involucradas en el efecto del E2 sobre la respuesta de LPA.

6.- MATERIALES Y METODOS

Reactivos y medios de cultivo.

El ácido lisofosfatídico (1- α -Lysophosphatidic acid [oleoil-sn-glycero-3-phosphate]), el E2, el tetradecanoil forbol acetato, la staurosporina, la rottlerina, el Gö 6976, y la wortmanina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. El LY29400 fue comprado a Calbiochem. Las células se cultivaron con los medios Ham's F12 (Kaighn's modification, F12K) y dulbecco's modified eagle's (DMEM) sin rojo fenol, ambos provenientes de In Vitro SA. El suero fetal bovino, la tripsina, los antibióticos usados para el cultivo celular y el Fura-2 AM (acetoxi-metil-éster) fueron comprados a Invitrogen Life Technologies.

Cultivo celular.

Se usó la línea celular epitelial de hígado de rata C9 (proveniente de la ATCC), transfectada establemente con el receptor LPA₁ unido a la proteína verde fluorescente y a su vez transfectada transitoriamente con el ER- α , están referidas a lo largo del trabajo como C9 LPA₁-EGFP. Esta línea celular fue cultivada en F12K suplementado con 10 % de suero fetal bovino 100 μ g/mL de estreptomycin, 100 U/ml penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Este medio de crecimiento fue reemplazado por DMEM sin rojo de fenol y sin suero fetal bovino 24 horas antes del experimento (medio de ayuno).

Determinación de la concentración intracelular de calcio [Ca²⁺]

Las células fueron incubadas en un buffer Krebs-Ringer-HEPES con 0.05 % de albúmina sérica bovina 25 μ M de FURA-2/AM a 37 °C por una hora antes del experimento, posteriormente se realizaron 3 lavados para eliminar el FURA no incorporado. Las mediciones se registraron en un espectrofotómetro AMINCO-Bowman serie-2. Los registros se hicieron a 340 nm y 360 nm de excitación y 510 nm de emisión, calculando la concentración intracelular de calcio según Grynkiewicz (JBC, 260, 3440-50 de 1985) con el software de AMINCO-bowman.

RESULTADOS

En primer lugar probamos diferentes tratamientos en células C9 silvestres. En el primero de ellos se estimularon las células únicamente con LPA 1 μ M observando un incremento en la concentración de calcio intracelular, en el segundo tratamiento se estimuló a las células con E2 1 μ M 5 minutos previos a la estimulación con LPA en este caso se encontró que no hay una disminución de la respuesta al estímulo del LPA debida al E2. En el tercer tratamiento se utilizó el ICI182780 2 μ M, un inhibidor del receptor de estrógenos, 15 minutos antes de el tratamiento de E2 +LPA debido a que el ICI 182780 es un antagonista selectivo que se une al receptor para estrógenos este se uso como un control del posible efecto del E2 sobre la respuesta de la célula al LPA. Y por último se uso TPA que eliminó completamente la respuesta de la célula al LPA como se esperaba (7) (Figura 11).

En estos tratamientos no se observó una participación clara del E2 sobre la respuesta del LPA. Cabe señalar que estas células expresan constitutivamente tanto al receptor LPA1 y como al RE α pero éste último en una proporción muy baja.

Debido a que no existe un efecto inmediato al E2 en las células C9 y que experimentos previos mostraron que estas mismas células pueden sobre expresar establemente al receptor LPA1 fusionado a la proteína verde fluorescente (EGFP), representan un buen modelo para estudiar la regulación entre ambos receptores a través de experimentos tanto de microscopia confocal, como en calcio permitiendo realizar un estudio más completo sobre la posible regulación del E2 sobre el LPA1. Por estas razones se transfectoron las células para que sobreexpresaran tanto, al receptor para estrógenos α (RE α) como al receptor LPA $_1$ unido a la proteína verde fluorescente (LPA $_1$ -EGFP) y estas fueron las células empleadas para la realización de los subsecuentes experimentos.

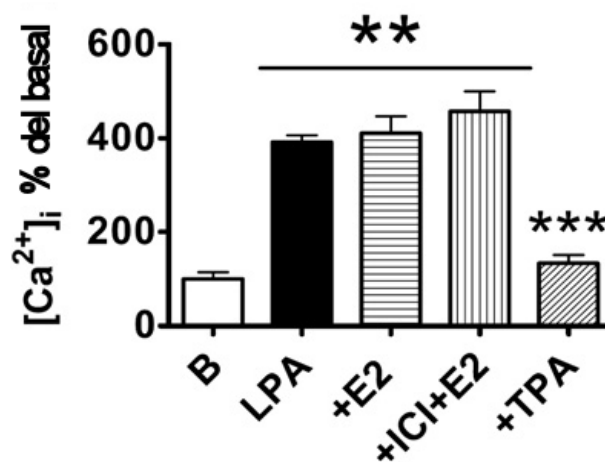


Figura 11. Experimentos control en células C9 silvestres.(B) basal (LPA) 1 μ M de LPA (+E $_2$)1 μ M de E $_2$ (+ICI+E $_2$) pre-incubadas 20 minutos con 2 μ M de ICI 182780 y 5 min con E $_2$. Están graficados los promedios \pm el S.E.M de 5 experimentos * p \leq 0.05 vs todos los grupos

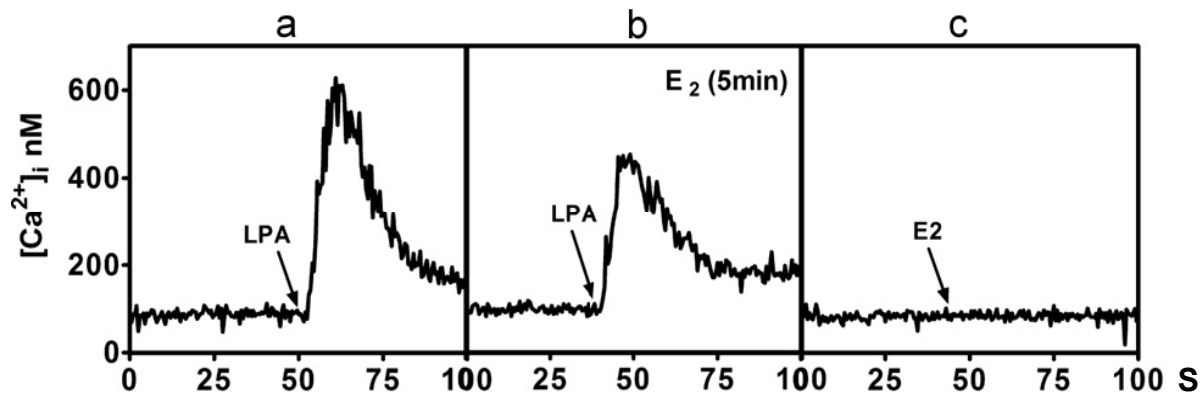


Figura 12: Liberación de calcio intracelular en células C9 LPA₁-EGFP a. Estimuladas con ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA) b. Pre-incubadas 5 minutos con E₂ 1 μ M antes de la estimulación con LPA y c. Estimuladas con 1 μ M E₂ tiempo medido en segundos.

Se probó la respuesta en $[Ca]_i$ de las células C9 LPA₁-EGFP al LPA mostrando que a una concentración de 1 μ M de LPA las células responden rápida, marcada y transitoriamente a este estímulo, validando con esto nuestro sistema (ver figura 12 panel a). A continuación probamos la respuesta en $[Ca]_i$ de las células al LPA, con una incubación previa de las células por 5 minutos con E₂ y se encontró que la respuesta al LPA, se ve disminuida en relación al valor anterior observado de liberación de $[Ca]_i$ obtenido con la sola estimulación con LPA lo que nos sugiere que existe una comunicación entre ambas vías teniendo como resultado una desensibilización del receptor o receptores para LPA mediada por el E₂ (ver figura 12 panel b). Por último se probó como control el efecto del E₂ sobre las células C9LPA₁-EGFP usando una concentración de 1 μ M de E₂ y se observó que las células no responden a través de la liberación de calcio a este estímulo (ver figura 12 panel c).

Posteriormente probamos diferentes concentraciones de LPA en las células, encontrando que la dosis a la que se encuentra la mayor respuesta antes de llegar a la saturación es 1 μM (ver figura 13 panel a), mientras que para la curva de inhibición se observa que la concentración a la que se obtiene el mayor efecto de éste sobre la respuesta producida por el LPA es 1 μM de E2 (ver figura 13 panel b), por lo que para todos los experimentos sucesivos utilizamos tales concentraciones.

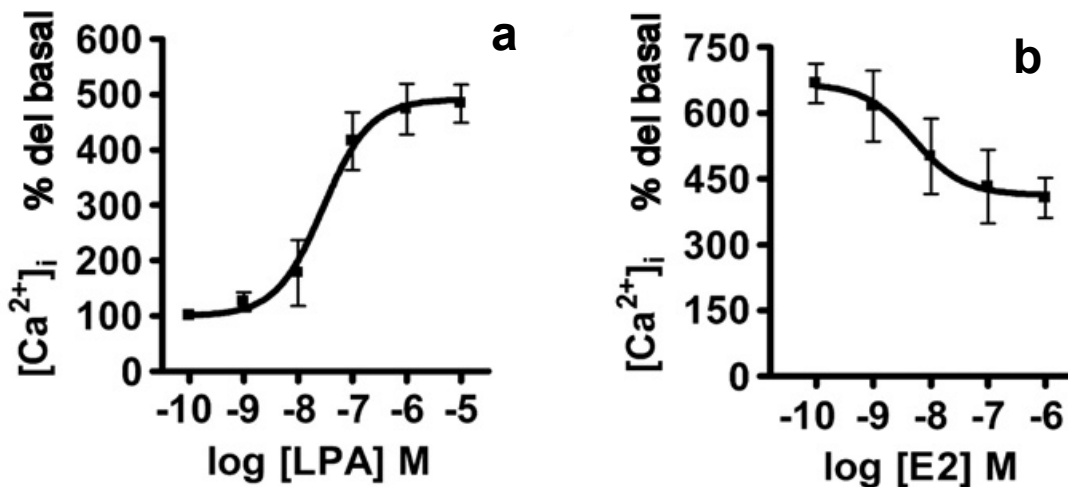


Figura 13: Curva dosis- respuesta y curva de inhibición en células C9 LPA1-EGFP
Liberación de calcio intracelular debida a la estimulación con diferentes concentraciones de LPA (A) y pre-incubadas 5min con diferentes concentraciones de E2 (B) previa estimulación con 1 μM de LPA

Para determinar si el efecto del E2 sobre la respuesta al LPA estaba siendo mediada por la activación del receptor para E2, probamos el antagonista para este receptor a estrógenos, el, ICI 182780. Como control estimulamos primero las células solamente con 2 μM de ICI 182780, no observando ningún efecto de éste sobre la liberación de calcio intracelular. Una vez comprobado esto, inubamos las células por 20 min con ICI

182780 y 5 min con E2 antes de la estimulación con LPA y observamos que la respuesta en $[Ca^{2+}]_i$ es igual a la obtenida con la sólo estimulación de las células con el LPA (Figura 14). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio observado del receptor de LPA esta efectivamente mediado por el receptor para estrógenos α .

Como último control añadimos el ICI 182780 20 min antes de estimular las células con LPA y no se observó ningún cambio significativo con respecto a la respuesta de la célula al ser estimulada con LPA lo que nos indica que no existe ningún efecto del ICI 182780 sobre la liberación de calcio inducida por el LPA (ver figura 14).

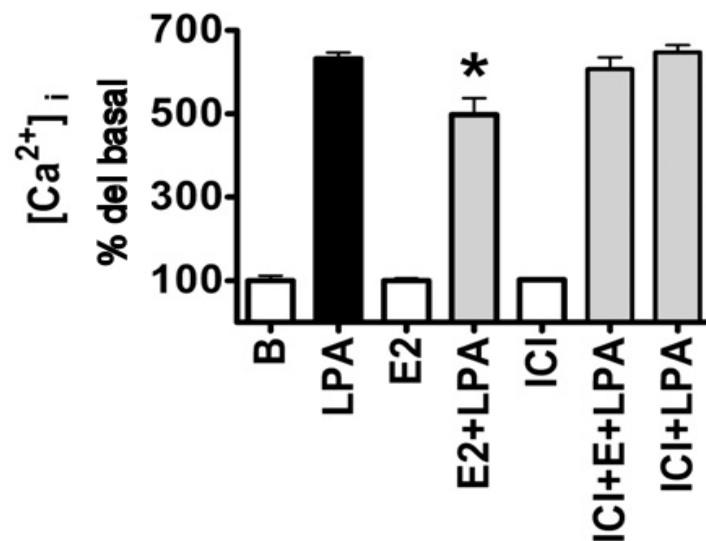


Figura 14. Desensibilización de la respuesta a LPA por la acción del 17β estradiol en células C9 LPA_1 -EGFP (B) basal (LPA) 1 μ M de LPA (E_2)1 μ M de E_2 (E_2 + LPA) células pre-incubadas 5 min con E_2 antes de la estimulación con LPA (ICI) 2 μ M de ICI 182780 (ICI+ E_2 +LPA) pre-incubadas 20 minutos con 2 μ M de ICI 182780 5 min con E_2 y estimuladas con LPA (ICI+LPA) pre-incubadas 20 min con 2 μ M de ICI 182780 antes de la estimulación con LPA Están graficados los promedios \pm el S.E.M de 5 experimentos * $p \leq 0.05$ vs todos los grupos

Una vez que observamos que sí existe una regulación de la respuesta del LPA por E2 buscamos determinar por medio de qué cinasa se estaba llevando a cabo este efecto. Para tal propósito usamos diferentes tratamientos con LY 294002 1 μM y wortmanina 1 μM , que son inhibidores de la PI3K y estaurosporina 1 μM , Gö 6976 1 μM y Rottlerin 100 nM los cuales son inhibidores de PKC.

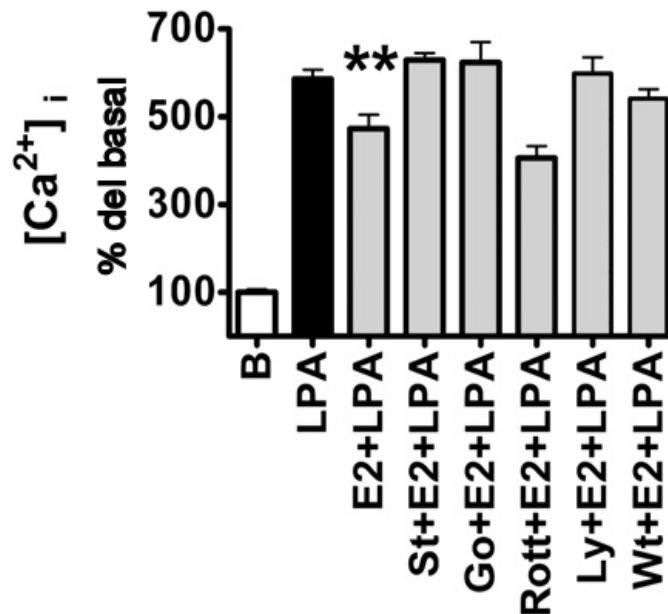


Figura 15. Participación de PI3K y PKC en la inhibición de la señal del receptor para LPA por la acción del 17 β estradiol en células C9 LPA₁-EGFP Las células fueron pre-incubadas con diferentes inhibidores de PKC y PI3K por 20 min y después incubadas durante 5 min con 1 μM de 17 β estradiol (E2) y/o estimuladas con 1 μM de LPA (LPA). Las concentraciones de los inhibidores usadas fueron 1 μM de Estaurosporina (St), 1 μM de Gö 6976 (Go), 100 nM de Rottlerin (Rott), 1 μM LY294002 (Ly) y 1 μM de Wortmanina (Wt). Están graficados los promedios \pm el S.E.M de 5 experimentos * $p \leq 0.05$ vs todos los grupos excepto Rott

Las células fueron pre-incubadas 20 minutos con los diferentes inhibidores seguido de la incubación con E2 5 minutos antes de aplicar el estímulo de LPA y observamos que los inhibidores para PI3K LY 294002 y Wortmanina y para PKC Gö 6976 y Estaurosporina afectan esta interacción minimizando el efecto del E2 sobre la respuesta a LPA. Sin embargo esto no ocurrió con Rottlerin, un inhibidor específico para la isofoma PKC δ (Figura 15).

8.- DISCUSIÓN.

Aunque los efectos más conocidos de los estrógenos son a nivel genómico desde hace ya algunos años se demostró la existencia de respuestas rápidas mediadas por estrógenos que no son consistentes con los tiempos de respuesta esperados para fenómenos de regulación genética (15,19, 22). En este trabajo nosotros demostramos una regulación debida a efectos no genómicos del receptor para estrógenos ER α sobre el receptor LPA1.

De acuerdo con los resultados obtenidos la pre-incubación de las células por 5 min con E2 disminuye la respuesta en calcio de las células C9 al ser estimuladas posteriormente con LPA, este efecto no es observado al utilizar el antagonista específico para el receptor a estrógenos, el ICI 182780, 15 minutos antes de la pre-incubación con E2 (Fig. 14). Lo que indica que el efecto observado se está llevando a cabo a través de un mecanismo distinto de las acciones genómicas producto de la activación del receptor ER α con su ligando E2, ya que los resultados de disminución de la respuesta provocados por el E2 sobre el LPA1 se registran tan solo 5 minutos después de la estimulación con E2 siendo que para observar un efecto del ER que implique la síntesis de proteínas se requieren de al menos 45 minutos (22, 28).

Investigaciones recientes han mostrado que existe un nuevo receptor acoplado a proteínas G cuyo agonista principal es el E2 denominado GPER, al cual se unen compuestos que se consideraban antagonistas específicos para los RE como el ICI 182780 y el tamoxifen (27). A diferencia de lo que ocurre con los RE clásicos, estos antagonistas al unirse a este nuevo receptor pueden activar diferentes vías de señalización lo que en los RE clásicos no ocurre; por ejemplo en el caso del tamoxifen al unirse al GPER puede activar a PI3K; Nuestros resultados no pueden atribuirse a este nuevo receptor debido a que al hacer los experimentos en las células C9 silvestres (Figura 11) no se observó ningún efecto del E2 sobre la respuesta de la célula al LPA y solo al transfectar las células con los receptores ER α y LPA1-EGFP (Figura14) fue que

se pudo determinar este efecto. Más aun suponiendo que el ER α transfectado tuviera la capacidad de inducir de manera basal la síntesis del GPER los datos observados tampoco podrían atribuirse a este ya que los efectos de la disminución de la respuesta en calcio provocados por el E2 en el receptor LPA1 no son observados al administrarse el antagonista selectivo para el RE α el ICI 182780 lo que nos sugiere que este efecto está siendo mediado por el RE α . Y estos controles nos permiten atribuir los efectos observados sobre el receptor LPA1 a un mecanismo diferente de las acciones genómicas producidas o que pudiera producir el ER α transfectado.

Se sabe que el receptor LPA1 muestra varios sitios donde puede ser fosforilado. Estos son Thr 236 Ser 312 y Thr 342 (3). De manera general existen dos mecanismos mediante los cuales los GPCRs pueden ser fosforilados y desensibilizados: una es de forma homóloga cuando el propio ligando del receptor se une a éste activando a las proteínas G y en la cual la desensibilización está mediada por GRKs, una familia de cinasas que fosforilan a los GPCRs y la segunda es a través de una desensibilización heteróloga en la cual la activación de una clase o tipo de receptores al ser activado por su agonista provoca la desensibilización de otro tipo diferente de receptores, esta desensibilización se lleva a cabo mediante la fosforilación de los GPCRs por segundos mensajeros (11, 13,16-18, 30).

Debido a que este trabajo se enfoca en la desensibilización del receptor para ácido lisofosfatídico LPA1 a través de la activación del receptor para estrógenos α , esto implica que estudiamos una regulación de tipo heteróloga, por lo que una vez establecido que sí existe una regulación cruzada entre ambos receptores nos interesaba saber a través de que cinasas se estaba mediando esta desensibilización entre las cuales podrían ser PKA, PKC o PI3K entre otras.

Para determinar por medio de qué cinasas se estaba llevando a cabo esta regulación probamos diferentes inhibidores de PKC: Se eligió esta cinasa en particular debido a que se sabe que el receptor LPA1 puede ser fosforilado y desensibilizado a través de

PKC (3), También se estudió si existía alguna participación de PI3K en este efecto, debido a que se sabe que el ER puede mediar acciones no genómicas sobre GPCRs a través de esta cinasa (19, 22, 28).

La PKC tiene diez isoformas que están agrupadas dentro de tres familias. Utilizamos en primer lugar el inhibidor general para PKC, la estaurosporina, para saber si la respuesta estaba siendo mediada por alguna PKC y observamos que el efecto inducido por el ER activado sobre la respuesta en calcio del receptor LPA1 era bloqueado por este inhibidor, lo que implica la participación de al menos alguna PKC. Por otro lado debido a que un trabajo previo había demostrado que el ER α podía desensibilizar heterológicamente a otro GPCR el α 1b-AR a través de PKC δ (15) se tenía especial interés en esta isoforma de PKC por lo que probamos el inhibidor selectivo para la isoforma PKC δ la rottlerina; sin embargo al utilizar este inhibidor no hubo ningún cambio sobre el efecto inhibitorio del E2 sobre la respuesta en calcio del receptor LPA1. Por lo que se utilizó Gö 6976 un inhibidor para las isoformas clásicas de PKC α , β I, β II y γ observamos que el efecto del E2 sobre el receptor para LPA era bloqueado lo que sugiere que la acción del E2 sobre el receptor para LPA está siendo mediada por alguna isoforma clásica de PKC. Aunque como se mencionó existen más isoformas de PKC éstas no las estudiamos debido a que experimentos de western blot en las células C9 no mostraron la presencia de tales isoformas (datos no mostrados).

Por otro lado la familia de PI3K está conformada por varias enzimas agrupadas en 3 clases las cuales al ser activadas son translocadas hacia la membrana plasmática en donde pueden fosforilar fosfoinosítidos de membrana los cuales a su vez son capaces de fosforilar diversas moléculas. Por ejemplo, se ha visto que la PI3K puede activar a la cinasa PKC a través de la 3-fosfatidilinositol dependiente de cinasa 1 (PDK1), debido a que ya había observado la participación de PKC en la interacción entre el ER α y el receptor LPA1 quisimos saber si PI3K estaba participando en esta respuesta. Para esto se probaron dos inhibidores de PI3K; el Ly 294002 y la Wortmanina. Las células fueron incubadas 15 minutos con estos inhibidores antes de la incubación del E2 y al

medir la respuesta en calcio de las células al estimularlas con LPA observamos que el efecto del E2 sobre el receptor para LPA era bloqueado al usar estos inhibidores (Figura 15) por lo que PI3K sería otra cinasa implicada en el efecto de regulación de la respuesta del LPA1 por activación del ER.

Los datos nos sugieren que el efecto producido por el E2 sobre el receptor para LPA1 está siendo mediado a través de PI3K, la cual estaría siendo activada por un mecanismo producto de la unión del E2 con el receptor ER α . En este contexto la PI3K a su vez estaría activando a alguna PKC clásica, posiblemente a través de la activación de la PDK 1. Finalmente, dado que la PKC puede fosforilar al receptor LPA1 esta cinasa sería la que estaría fosforilando y desensibilizando al receptor LPA1 en células C9. (15, 29).

Sin embargo, de acuerdo a los resultados presentados nosotros, no podemos determinar que está sucediendo con los pasos previos a la activación de PI3K y PKC. Una vez que es administrado el estímulo de E2 y que este activa al ER α desconocemos qué sucede entre ese paso y la activación de PI3K. Hay varios estudios que muestran que los receptores para estrógenos tanto ER- α como ER- β pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, mediante las cuales estos receptores tradicionalmente nucleares, pueden ser enviados a la membrana plasmática. Los estudios al respecto muestran que estos ER α de superficie de membrana, pueden asociarse a proteínas G triméricas y son estos receptores a los que se les atribuyen las acciones no genómicas de los ER; más aun, algunos autores sugieren que la activación de proteínas como la fosfolipasa C, está mediada por proteínas G $_{q\alpha}$ que directamente son activadas por el acoplamiento del receptor a estrógenos con su ligando (E2) activando la vía de los fosfoinosítidos (19, 22, 28); sin embargo, en nuestros experimentos, nosotros no observamos esta asociación ya que nuestros controles no muestran liberación de calcio debida únicamente al estímulo con E2 (Figura 12), pero otros tipos de proteínas G como G $_{i/o}$ podrían estar asociados al ER α las cuales podrían activar otras vías que no conlleven a la liberación de calcio. De acuerdo a esto, los

efectos observados en este trabajo podrían estar llevándose a cabo a través de un ER- α de membrana. Sin embargo, no se hicieron experimentos para determinarlo; tampoco sabemos si está implicada alguna proteína g que se estuviera asociando con este receptor. Por otro lado en otros trabajos se ha visto que el ER α activado puede unirse físicamente a la subunidad p85 de la PI3K activándola (28), por lo que la activación de PI3K podría darse por este mecanismo o por activación de alguna proteína G que a su vez la activara.

Debido a que las células C9 expresan diversos receptores para LPA (8, 27, 29), para determinar si el efecto del E2 ocurre sobre el receptor LPA1 se hicieron ensayos de microscopía confocal, siguiendo la señal de la proteína EGFP fusionada a este receptor. Estos experimentos mostraron que los receptores se encuentran en la superficie celular y que, en respuesta a la estimulación con E2, se internalizan, no ocurriendo esto al pre-incubar las células con el ICI 182780 15 minutos antes del estímulo con E2. Esto muestra claramente que la internalización de los receptores LPA1 ocurre después de la estimulación de las células con E2 (Figura 16).

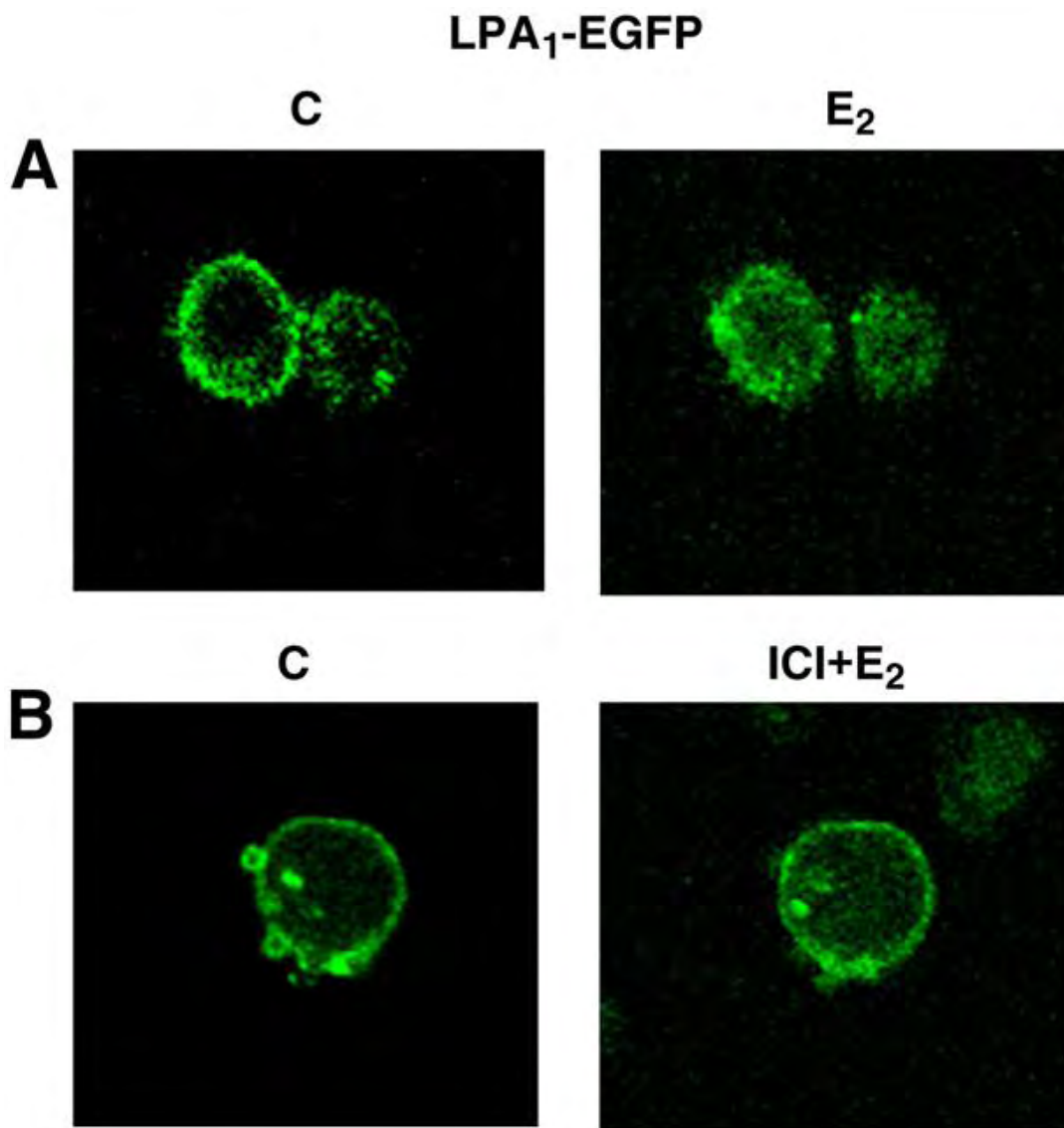


Figura 16. Imágenes de microscopia confocal que muestran a los receptores LPA1 unidos a la proteína verde fluorescente (LPA1-EGFP) bajo diferentes tratamientos. C: Control E2: células estimuladas con E2 5 minutos antes de ser estimulada con LPA. Imagen cortesía de la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez

El por qué no se muestra una disminución de la respuesta más contundente en calcio podría deberse justamente a la presencia de los demás subtipos de receptores para LPA, que estarían siendo diferentes en cuanto a la susceptibilidad a ser regulados por el receptor a estrógenos. En las células C9 se sabe que además del receptor LPA1 se

encuentran el LPA2 y el LPA4 por lo que podría ser que algunos de ellos no sean fosforilados por PKC o PI3K las cuales de acuerdo a nuestros resultados son las cinasas involucradas en el efecto del E2 sobre el receptor LPA1 y que estos continúen sobre la superficie de la célula respondiendo al estímulo de LPA.

El LPA actúa sobre las células a través de cinco receptores cada uno de estos activa diferentes vías y difieren en distribución dependiendo del tipo celular, así por ejemplo encontramos receptores para LPA en órganos tales como cerebro, pulmón, intestino, ovario, colon, cerebro y útero entre otros. El estudio del LPA y sus receptores ha cobrado relevancia debido a que se ha encontrado asociado a enfermedades importantes como obesidad, arteriosclerosis, esquizofrenia, fibrosis y cáncer. Se ha reportado que el LPA1 tiene una participación patológica importante en el cáncer de ovario y otros tipos de cáncer ginecológicos y que este puede actuar como un potente promotor de células cancerígenas ayudando a su proliferación, sobrevivencia, migración e invasión. Más aun, se ha investigado que la inhibición farmacológica o mediante la silenciación de genes que codifican para el LPA1 reducen la proliferación y la metástasis de células cancerígenas de ovario y seno tanto in vivo como in vitro. (3, 9, 29).

Conclusión.

Los resultados indican que existe una regulación heteróloga entre el receptor para estrógenos ER α y el receptor LPA1 para ácido lisofosfatídico y que tal regulación está siendo mediada a través de la activación de las cinasas PKC y PI3K que llevan a la desensibilización e internalización del receptor LPA.

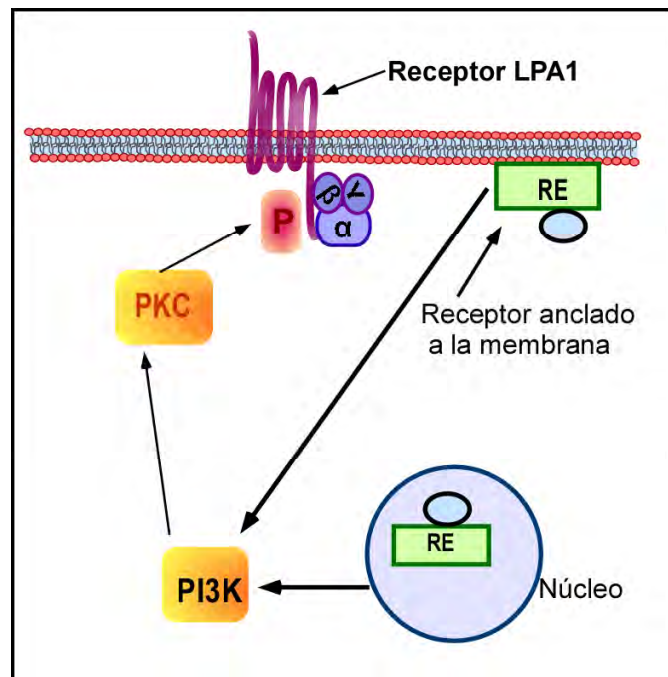


Figura 17: Esquema final. La activación del receptor para estrógenos de membrana o del núcleo provoca a su vez la activación de PI3K la cual activaría a la PKC y esta fosforilaría al receptor LPA1 regulando su actividad.

Perspectivas.

Existen otros receptores para LPA que pueden ser fosforilados y desensibilizados por PKC, entre ellos el LPA2 el LPA3 y el LPA4 de estos el LPA2 y el LPA3 han sido estudiados y reconocidos como potentes promotores del cancer de ovario, por lo que podrían posteriormente estudiarse estos receptores para observar si existe alguna interacción entre estos y el receptor para estrógenos RE.

Bibliografía

1. ALBERTS, B. et al. (2002) *Biología molecular de la célula*. Nueva York: Ed Garland science pub.
2. Anliker B. and Chun J. (2004) Cell surface receptors in Lysophospholipid signaling. *Seminars in cell & developmental biology* **15**:457-465.
3. Avendaño-Vázquez SE, García-Caballero A García-Sáiz JA. (2005), Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA₁, *Biochem J.* **385**:677-684
4. Ballatori, N. (2005) Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OST α -OST β . *Experimental biology and medicine* **230**:689-698.
5. Ballerini M. y Ropelato M. (2008) El receptor de la hormona de crecimiento humano (hGH) y la proteína de alta afinidad dela hGH. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo.* 45(1):28-46.
6. BELL, R. et al. (1966) *Handbook of lipid research Lipid Second Messengers*. New York; Ed Plenum press.
7. BERG, J. et al. (2007) *Biochemistry*. Barcelona España; Ed. Reverte.
8. Chang-Wook L, Rivera R Gardell S Dubin AE and Chun J (2006) GPR92 as a new G_{12/11} –and G_q- coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA₅ *The Journal of biological chemistry* **281**:23589-23597.
9. Choi JW et al (2010) LPA Receptors: Subtypes and biological actions *Annu.Rev. Pharmacol.Toxicol.* 50:157-186.
10. Deroo BJ and Korach KS (2006) Estrogens receptors and human disease. *The journal of clinical investigation.* **16(3)**: 561-568
11. Eu-Mi H, Kyong-Tai K (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross talk Achieving rapidity and specificity. *Cellular signalling.* **14**:397-405.
12. GARCIA-SAINZ, JA. (2011) *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular*. Mexico; Ed Fondo de cultura económica.
13. Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J and Medina LC. (2000) α 1-Adrenoreceptors: function and phosphorylation. *European Journal Pharmacology.* **389**:1-12.
14. GOMPER, B. et al. (2009) *Signal Transduction*. Estados unidos; Ed. Elsevier Inc.
15. González-Arenas A, Aguilar-Maldonado B, Avendaño-Vázquez SE and Garcia-Sainz JA (2006) Estrogens cross-talk to α _{1b}- Adrenergic Receptor. *Molecular pharmacology* **70**:1-9.
16. Heldin CH and Purton M *Modular texts in Molecular cell biology* 1 Signal

Transduction Chapman and Hall 1996 Londres.

17. Jimenez L and Merchant H. (2003) *Biología celular y molecular*, Prentice Hall, Ciudad de México. México.
18. Kelly E, Balley CP and Henderson G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization *British journal of pharmacology*, **153**:5379-5388.
19. Kelly MJ and Wagner EJ. (1999) Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in endocrinology and metabolism*, **10(9)**:369-374.
20. KRAUSS, G. (2003) *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Alemania Ed Wiley-vch.
21. Lefkowitz JR and Shenoy KS, (2005). Transduction of receptor signaling by β -arrestins. *Science* **308**:512-517.
22. Levin ER. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular endocrinology*. **19**:1951-1959.
23. Macías Silva Marina, *Relación entre sistemas de transducción y fosforilación de proteínas* (1993), Tesis Doctorado (Doctorado en Investigación Biomédica Básica)-UNAM.
24. Mathews J and Gustafsson JA. (2003). Estrogen signalling: A subtle balance between ER α and ER β . *Molecular interventions* **3**:281-292. Molina-Muñoz T, Romero-Avila MT, Avendaño-Vázquez SE and García-Sáinz JA. (2008) .Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha1B-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I *Eur J Pharmacol*. **678**:1-10.
25. Oldham WM and Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9(1)**:60-71.
26. Prossnitz ER, Arterburn FB and Sklar LA. (2007) GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen *Mol cell endocrinology* **266**:138-142.
27. Segars J. and Driggers P. (2002) Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane associated signaling complexes. *TRENDS in endocrinology y metabolism* **13(8)**:349-358.
28. Sengupta, S., Wang, Z., Tipps, R., and Xu, Y. (2004) Biology of LPA in health and disease. *Seminars in cell and developmental Biology* **15**:503-512.
29. Sorkin A and Zastrow M. (2002) Signal transduction and endocytosis: Close encounters of many kinds. *Nature reviews molecular cell biology* **3**:600-611.
30. Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M.A., and Chun, J. (2002) Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 108-113.