



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Tráfico vesicular del receptor del ácido lisofosfatídico tipo  
1 (LPA1), durante desensibilizaciones homóloga y  
heteróloga**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**KARLA DANIELA GONZÁLEZ RUIZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ**

**Ciudad Universitaria, Cd. México  
2021**



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.

Datos del alumno  
González  
Ruiz  
Karla Daniela  
55 8140 6085  
Universidad Nacional Autónoma  
de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312042493

Datos del tutor  
Dr.  
Jesús Adolfo  
García  
Sáinz

Datos del sinodal 1  
Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García

Datos del sinodal 2  
Dr.  
Carlos Leonardo  
Peraza  
Reyes

Datos del sinodal 3  
Dr.  
Genaro  
Vázquez  
Victorio

Datos del sinodal 4  
Dr.  
Yair  
Romero  
López

Datos del trabajo escrito  
Tráfico vesicular del receptor del ácido  
lisofosfatídico tipo 1 (LPA1), durante  
desensibilizaciones homóloga y  
heteróloga  
51p  
2021

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Hortensia Ruiz Morales y Marcos González Martínez por todo su amor y apoyo en cada paso de mi vida.

A mi hermano, Jesús Eduardo González Ruiz por ser parte fundamental de mi vida. Su compañía ha sido un gran regalo para mí.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz y el apoyo experimental directo y también escrito del M. en C. Juan Carlos Martínez Morales, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN200915 y IN201221) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (253156 y Fronteras 6676).

Karla Daniela González Ruiz fue beneficiaria de un apoyo como “Ayudante de Investigador Nacional Nivel III o Emérito” con número de CVU: 929217 por parte del CONACyT.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme tanto durante toda mi trayectoria académica.

A mi tutor, el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por permitirme participar en su laboratorio y a su confianza que depositó en mí para el desarrollo de este proyecto. Gracias por su apoyo en todo momento.

A la Dra. Rocío Alcántara Hernández por su gran disposición en ayudarme en todo momento y sus consejos en el laboratorio y a la Dra. María Teresa Romero Ávila por sus apoyos técnicos y enseñanzas durante los procesos experimentales. Igualmente a la Dra. Guadalupe Reyes-Cruz (CINVESTAV-IPN), por el apoyo con las proteínas Rab marcadas con la proteína verde fluorescente, así como en el planteamiento y discusión del trabajo.

Agradezco al *personal de las Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular* por todos los servicios brindados:

A la Unidad de Cómputo: M. en C. Gerardo Coello, Ing. Juan Barbosa Castillo, Ing. Ivette Rosas Arciniegas

A la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios

A la Unidad de Imagenología: Dra. Ruth Rincón Heredia, M. en C. Rodolfo Paredes Díaz y Dr. Abraham Rosas Arellano

Al Bioterio: Dra. Claudia Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón Rivero

Al Taller de mantenimiento: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortíz Benavides

A Guadalupe Jiménez por ser una integrante fundamental en el funcionamiento del laboratorio.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio 303-Sur: Juan Carlos, Alejandro, David, Helivier, Raúl, Gustavo y Emmanuel por transmitirme sus conocimientos y experiencias, además de todos los momentos agradables compartidos.

Agradezco a cada uno de mis sinodales por la revisión y retroalimentación de este trabajo, así como su excelente disposición en todo momento.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	2
<b>1. Introducción</b>	
1.1. Transducción de señales.....	3
1.2. Receptores acoplados de proteínas.....	4
1.3. Clasificación de los GPCRs.....	6
1.4. Mecanismo de señalización de GPCRs a través de proteínas G.....	7
1.5. Regulación de la actividad de los GPCRs: desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga.....	9
1.6. Internalización de los receptores.....	10
1.7. Proteínas Rab.....	12
1.8. Receptores del ácido lisofosfatídico.....	14
1.9. Generalidades del receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1 (LPA <sub>1</sub> ) y su señalización.....	15
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	16
<b>3. Hipótesis</b> .....	17
<b>4. Objetivos</b>	
4.1. General.....	17
4.2. Particulares.....	18
<b>5. Material y métodos</b>	
5.1. Reactivos.....	18
5.2. Cultivo celular y transfecciones para expresiones transitorias.....	18
5.3. Microscopía confocal.....	19
5.4. Förster Resonance Energy Transfer (FRET): asociación del receptor LPA <sub>1</sub> y proteínas Rab.....	20
5.5. Internalización del receptor LPA <sub>1</sub> .....	21
5.6. Análisis de imágenes.....	22
5.7. Análisis de datos.....	22
<b>6. Resultados</b>	
6.1. Localización subcelular del receptor LPA <sub>1</sub> .....	23
6.2. Interacción del receptor LPA <sub>1</sub> con las proteínas Rab.....	25
<b>7. Discusión</b> .....	32
<b>8. Conclusiones</b> .....	39
<b>9. Perspectivas</b> .....	39
<b>10. Referencias</b> .....	40

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Eventos generales en transducción de señales.....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura y modelo general de los receptores acoplados a proteínas G.....	5
<b>Figura 3.</b> Vía canónica de señalización mediada por los receptores acoplados a proteínas G.....	9
<b>Figura 4.</b> Modelo general de los mecanismos de desensibilización homóloga, desensibilización heteróloga e internalización.....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema de localización de algunas proteínas Rab y sus papeles en el transporte vesicular.....	14
<b>Figura 6.</b> Modelo estructural del receptor LPA <sub>1</sub> humano.....	16
<b>Figura 7.</b> FRET, técnica utilizada para estudiar interacción entre proteínas.....	21
<b>Figura 8.</b> Cinética de internalización del receptor LPA <sub>1</sub> , bajo desensibilización homóloga y heteróloga.....	24
<b>Figura 9.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab5 por desensibilización homóloga.....	26
<b>Figura 10.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab5 por desensibilización heteróloga.....	27
<b>Figura 11.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab7 por desensibilización homóloga.....	28
<b>Figura 12.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab7 por desensibilización heteróloga.....	29
<b>Figura 13.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab9 por desensibilización homóloga.....	30
<b>Figura 14.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con la proteína Rab9 por desensibilización heteróloga.....	31
<b>Figura 15.</b> Modelo propuesto del tráfico vesicular del receptor LPA <sub>1</sub> mediante desensibilización homóloga.....	37
<b>Figura 16.</b> Modelo propuesto del tráfico vesicular del receptor LPA <sub>1</sub> mediante desensibilización heteróloga.....	38

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Familias de proteínas G.....	8
<b>Tabla 2.</b> Asociación del receptor LPA <sub>1</sub> con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 por ambos mecanismos de desensibilización.....	32



## Resumen

Entre los receptores de membrana, se encuentran los receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores son la familia más abundante de proteínas de membrana y de sensores moleculares. Participan en la percepción de la luz, olores y sabores, del medio externo y de muchos neurotransmisores, hormonas generales y locales, presentes en el medio interno. Cuando estos receptores son activados por sus ligandos y otros eventos, ocurre un proceso llamado desensibilización. Este proceso controla la señalización y regulación de los receptores y previene una respuesta exacerbada, que pudiera alterar la homeostasis celular. Resulta importante señalar que los receptores no siempre permanecen en la membrana plasmática y que se internalizan en las células en vesículas por diferentes mecanismos y caminos. Muy frecuentemente la desensibilización y la internalización están asociadas con la fosforilación del receptor y la unión a proteínas adaptadoras.

Dentro de la célula, éstos pueden tomar diferentes vías endocíticas. Para ello, las diferentes proteínas Rab juegan un papel muy importante en la señalización y tráfico vesicular de los receptores, ya que con su ayuda, los receptores pueden ser degradados o ser reciclados de nuevo a la membrana plasmática.

Con el objetivo de estudiar la asociación y señalización del receptor de ácido lisofosfatídico tipo 1 (lysophosphatidic acid receptor type 1, LPA<sub>1</sub>) con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 tanto por desensibilización homóloga como heteróloga, se utilizó microscopía confocal, con la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET), usando como modelo experimental la línea celular HEK 293. Se encontró y se sugiere que, tanto por desensibilización homóloga como heteróloga, el receptor LPA<sub>1</sub>, se asocia con la proteína Rab5. Sin embargo, el tráfico vesicular del receptor promovido por estos mecanismos de desensibilización difiere, ya que por desensibilización homóloga, el receptor puede tomar tanto la ruta de reciclamiento a través del aparato de Golgi por la asociación con Rab9, así como la ruta de degradación, por Rab7. En cambio, por desensibilización heteróloga, el receptor toma preferentemente la ruta de degradación, igualmente por la asociación con Rab7.

## **Lista de abreviaturas**

**EGFP:** Proteína Verde Fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein)

**FRET:** Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (Förster Resonance Energy Transfer)

**GPCRs:** Receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptors)

**GRK:** Cinasa de GPCR (G protein-coupled receptor kinase)

**LPA:** Ácido lisofosfatídico (lysophosphatidic acid)

**LPA<sub>1</sub>:** Receptor de ácido lisofosfatídico tipo 1 (lysophosphatidic acid receptor type 1)

**PKA:** Proteína cinasa A (Protein kinase A)

**PKC:** Proteína cinasa C (Protein kinase C)

**PMA:** Forbol miristato acetato (phorbol myristate acetate)

# 1.INTRODUCCIÓN

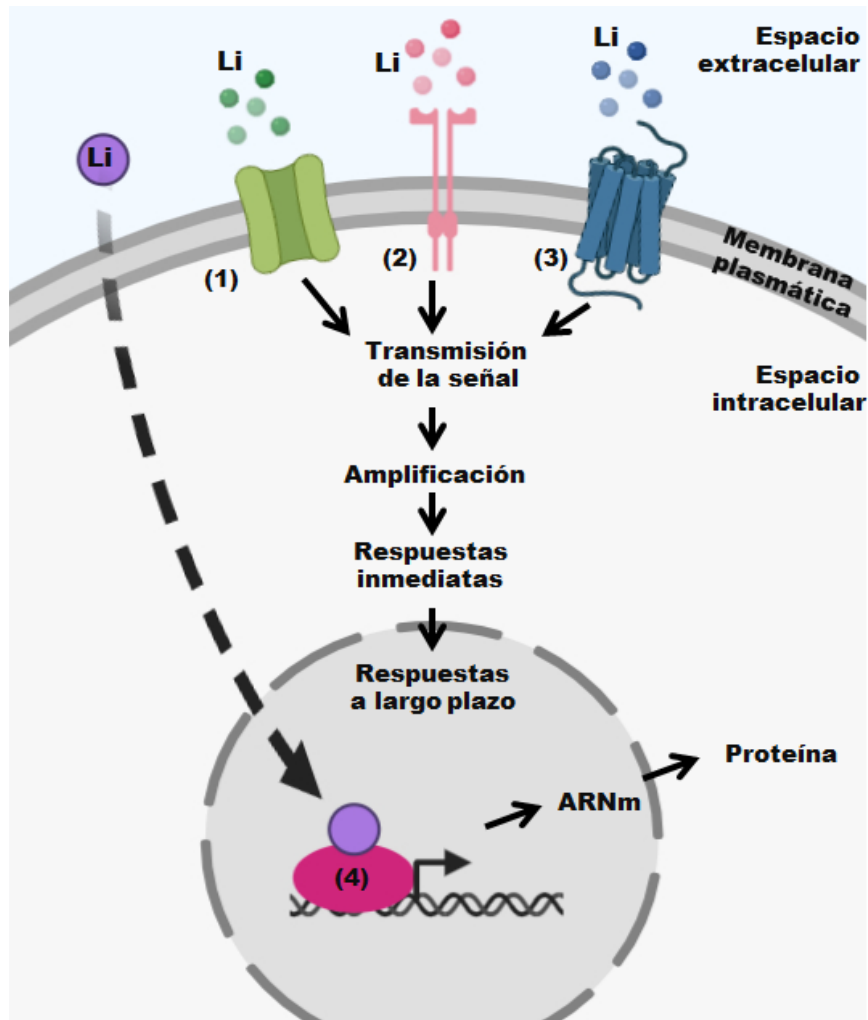
## 1.1 Transducción de señales

Las células reciben señales, ya sea por estímulos físicos o químicos del ambiente extracelular (llamados ligandos, o primeros mensajeros), que son detectados por entidades en la superficie de su membrana plasmática o en su interior, las cuales son procesadas y amplificadas y consecuentemente desencadenan respuestas específicas necesarias para regular la actividad celular, ya sean respuestas inmediatas (secreción, contracción, motilidad, cambios en el metabolismo) o a largo plazo (como supervivencia, crecimiento, diferenciación celular, apoptosis y expresión génica); a esta serie de eventos que regula la homeostasis celular, se les denomina como *transducción de señales* (Alberts, et al., 2015; Kramer, 2015).

Para que esto ocurra, de manera general, las células cuentan con proteínas, llamadas *receptores*, que interactúan con sus estímulos específicos. Los receptores pueden estar anclados a la membrana plasmática o dentro de la célula, ya sea en el citoplasma o en el núcleo. Es decir, el cómo la señal es procesada, depende del tipo de receptor y también de la naturaleza del ligando, además de la interacción con otros componentes celulares corriente abajo (*downstream*), así como cambios en la concentración de moléculas pequeñas, llamadas segundos mensajeros, como el AMP cíclico y el  $Ca^{2+}$  (los cuales pueden difundir a componentes celulares específicos como el núcleo o activar proteínas cinasas dependientes de dichos segundos mensajeros) y modificaciones postraduccionales, así como activación en proteínas efectoras, como reguladores transcripcionales, componentes de vías metabólicas y del citoesqueleto. Cabe resaltar que no se ha detectado la producción de segundos mensajeros en todas las vías de transducción, ya que la señal puede ser transferida directamente a las proteínas efectoras, por ejemplo, a factores transcripcionales. Además, dependiendo de las interacciones corriente abajo, las señales se pueden ramificar y tener más diversidad en las respuestas celulares (Alberts, et al., 2015; Kramer, 2015) (Figura 1).

Como se mencionó anteriormente, los receptores tienen diferente localización celular. Existen cuatro grupos de receptores: los receptores canal, los receptores

con actividad enzimática, los receptores nucleares y los receptores que se abordan en este trabajo, los receptores acoplados a proteínas G.

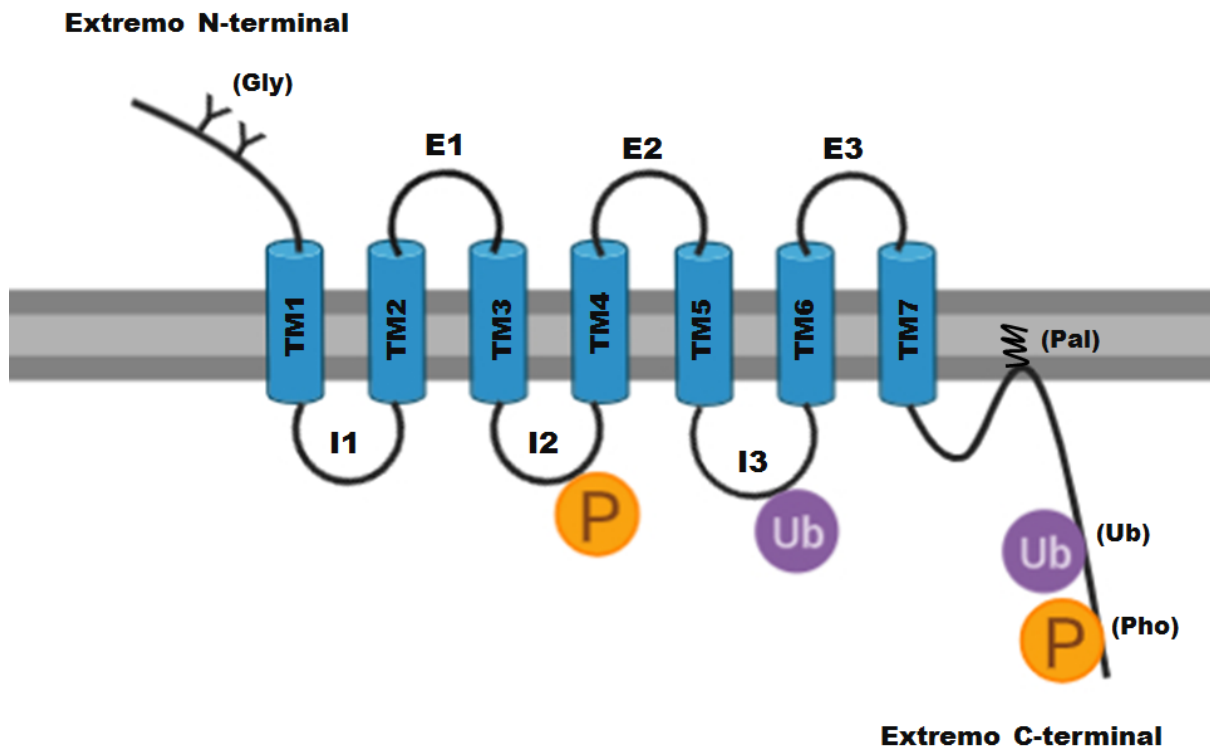


**Figura 1. Eventos generales en transducción de señales.** Representación de los cuatro grupos de receptores y la transmisión y amplificación de la señal extracelular en el ambiente intracelular. (1) receptor canal, (2) receptor con actividad enzimática, (3) receptor acoplado a proteínas G, (4) receptor nuclear; (Li) ligando. Figura realizada con BioRender.com (tomado y modificado de García-Sáinz, 2016).

## 1.2. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCRs) son receptores que están en la superficie celular, éstos constan de una sola cadena polipeptídica de siete hélices  $\alpha$  transmembranales, conectados por asas alternadas intracelulares y extracelulares. Presentan un extremo amino terminal, el cual se

encuentra en la región extracelular de la membrana plasmática y también un extremo carboxilo terminal, en la región intracelular. Los GPCRs pueden presentar modificaciones postraduccionales en su estructura y modular su actividad, ya que las asas extracelulares pueden ser glicosiladas, al igual que su extremo N-terminal, influyendo en la afinidad del ligando por el receptor y, con ello, en su activación; también su extremo C-terminal, así como todas sus asas intracelulares, pueden sufrir de fosforilación y ubiquitinación; además también los receptores están sujetos a palmitoilación (Figura 2). Todas las modificaciones mencionadas pueden participar en la desensibilización, internalización y degradación de los receptores (Dores y Trejo, 2018; Goddard y Watts, 2012; Tobin, 2008; Tuteja, 2009; Zhang y Kim, 2017).



**Figura 2. Estructura y modelo general de los receptores acoplados a proteínas G.** Los GPCRs tienen siete dominios transmembranales (TM1-TM7) con un extremo amino terminal (N-terminal) en el espacio extracelular y un extremo carboxilo terminal (C-terminal) en la región citoplasmática; dichos dominios transmembranales están conectados por asas, tanto extra como intracelulares (E1, E2, E3 e I1, I2, I3, respectivamente). Se muestran algunas modificaciones postraduccionales importantes en la regulación de estos receptores: (Gly) glicosilación, (Pal) palmitoilación, (Pho) fosforilación y (Ub) ubiquitinación. Líneas grises representan la región de la membrana plasmática. Figura realizada con BioRender.com

### 1.3. Clasificación de los GPCRs

Es interesante mencionar que los GPCRs pertenecen a una súper familia muy amplia y diversa. Estos receptores se han encontrado en muchos otros organismos a pesar de tener distanciamiento evolutivo. Se dividen en seis clases, denominadas con las letras A, B, C, D, E y F, de las cuales, sólo las clases A, B, C y F, se presentan en el genoma humano. Todas las clases comparten entre ellas, cierta homología en su secuencia de aminoácidos y funcionalidad. Es importante destacar que las diferencias más relevantes entre las clases, están en el extremo N-terminal, la diversidad de los ligandos y cómo se unen a los receptores, ya que ésto puede ocurrir en el N-terminal, las asas extracelulares y dentro de la región transmembranal. Es importante señalar que las regiones transmembranales estructuralmente están muy conservadas y que las asas y los extremos amino y carboxilo terminal están menos conservados (Cvicek, et al., 2016; Hollmann, et al., 2005; Tuteja, 2009; Venkatakrisnan, et al., 2014).

La **clase A** (o también llamada familia de rodopsina), es la más grande y representan más del 80% de todos los miembros de los GPCRs, por lo que son los GPCRs más investigados como blancos farmacológicos. Esta clase tiene un N-terminal variable en su dimensión y gran variedad de ligandos (fotones, péptidos, aminas biogénicas, lípidos). Éstos se unen a la región transmembranal del receptor. La **clase B** (familia de secretina) tienen su N-terminal relativamente largo, caracterizado por tener un par de estructuras secundarias tipo  $\beta$ -plegadas y tres puentes disulfuro y la unión de sus ligandos (hormonas peptídicas y neuropéptidos) al receptor, ocurre en el N-terminal y en las asas extracelulares. La **clase C** (familia de receptores metabotrópicos de glutamato) tiene un N-terminal muy largo y en éste contienen un dominio de reconocimiento para los ligandos, que se asemeja a un “atrapa-moscas” (*Venus flytrap*, VFT). Frecuentemente para su señalización forman dímeros (Basith, et al., 2018; Culhane et al., 2015; Schiöth y Fredriksson, 2005; Venkatakrisnan, et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la **clase D** (familia de receptores hongo-feromona) y la **clase E** (receptores de AMPc), no se encuentran en los

humanos, ni en ningún otro vertebrado, ya que la clase D, como su nombre lo indica, está involucrada en señalización y comunicación con feromonas en hongos, y la clase E, está involucrada en la señalización para el mohó *Dictyostelium discoideum*. Y por último, la **clase F** (receptores Frizzled/smoothened), que incluye a los receptores Frizzled y smoothened (Smo), los cuales están involucrados en las vías Wnt (tanto la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina como Wnt/calció) y Hedgehog, respectivamente y participan en procesos relacionados con el desarrollo embrionario, particularmente en polaridad celular y segmentación. Tienen un largo N-terminal rico en cisteínas (Davis, et al., 2007; Krishnan, et al., 2012; Tuteja, 2009).

#### **1.4. Mecanismo de señalización de GPCRs a través de proteínas G**

Los GPCRs tienen una gran cantidad y diversidad de ligandos (como fotones, iones, hormonas, neurotransmisores, lípidos, péptidos, aminas bioactivas, nucleótidos, odorantes), dando así, una infinidad de respuestas celulares. Para que su señalización corriente abajo ocurra, estos receptores se asocian a las proteínas G heterotriméricas (de ahí el nombre de estos receptores), que constan de tres subunidades  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) y  $\gamma$  (gamma). Estas proteínas se clasifican en cuatro grandes familias dependiendo de la subunidad  $\alpha$ :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  o  $G\alpha_{12/13}$ , y dependiendo a qué subunidad o subunidades  $G\alpha$  se asocie el receptor, es la vía de señalización corriente abajo que se desencadene (Tabla 1). Algunos GPCRs se asocian a más de un tipo de proteína G, lo que conduce a una señalización más compleja y esto varía dependiendo el tipo celular. En estado inactivo, las subunidades  $G\alpha$  están unidas a GDP y en estado activo, unidas a GTP (Hilger, et al., 2018; Hollmann, et al., 2005; Sirovatkina, et al., 2016).

Tabla 1

*Familias de proteínas G.*

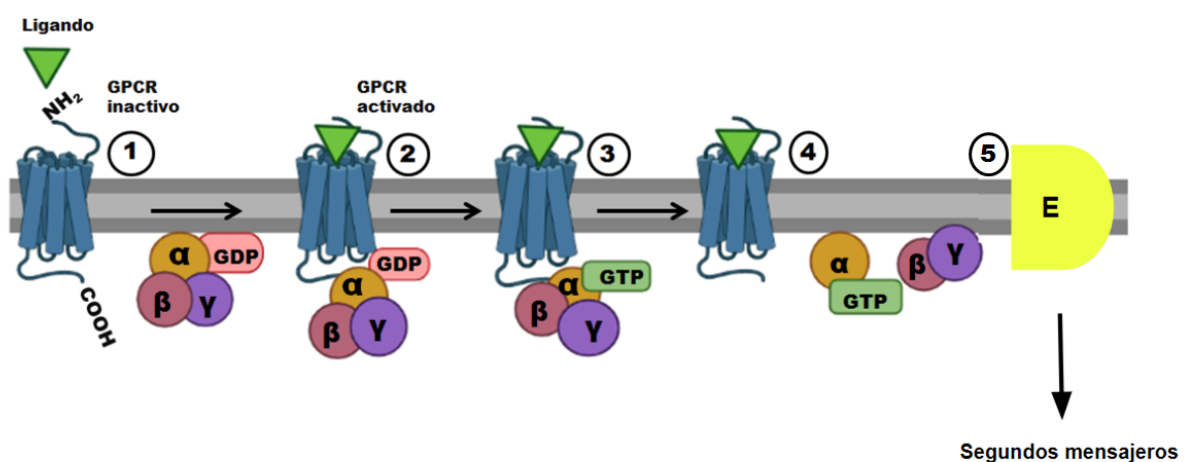
<b>Familia</b>	<b>Proteína Efectora</b>	<b>Vía de señalización</b>	<b>Referencias</b>
<b>G<math>\alpha_s</math></b>	Activación de AC	Aumento en la concentración de AMPc, un segundo mensajero; se activa PKA, cinasa dependiente de segundos mensajeros.	Malerba, 2019
<b>G<math>\alpha_{i/o}</math></b>	Inhibición de AC	Disminución de concentración de AMPc.	Malerba, 2019
<b>G<math>\alpha_{q/11}</math></b>	Activación PLC- $\beta$	Producción intracelular de segundos mensajeros: IP <sub>3</sub> y DAG; hay liberación de iones de calcio (del RE al citoplasma) y activación de PKC, cinasa dependiente de segundos mensajeros.	Kamoto, et al., 2015; Malerba, et al., 2019;
<b>G<math>\alpha_{12/13}</math></b>	Activación de Rho, por Rho GEF	Activación de cinasa de Rho (ROCK).	Kamoto, et al., 2015; Malerba, et al., 2019

La activación de cada una de ellas da como resultado la activación de diferentes proteínas efectoras y la modificación en la concentración de segundos mensajeros. AC, adenilato ciclasa; PLC- $\beta$ , fosfolipasa C- $\beta$ ; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A; PKC, proteína cinasa C; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol.

Por lo que, de acuerdo al modelo canónico de activación de los GPCRs, después de la unión del ligando (en este caso, un agonista) con la parte extracelular del receptor y posteriormente su activación, éste tiene cambios conformacionales en su región intracelular, lo que permite catalizar el intercambio de GDP por GTP de la subunidad G $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica, activándola y, consecuentemente, conducir a la disociación del complejo G $\beta\gamma$ . Es decir, el receptor activado por su agonista, actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, por sus siglas en inglés). Así, tanto la subunidad G $\alpha$  como el complejo G $\beta\gamma$  interaccionan y regulan diferentes moléculas efectoras y así como la concentración de segundos mensajeros, lo que consecuentemente resulta en la activación de proteínas cinasas, dependientes de dichos segundos mensajeros. Cabe mencionar que el complejo G $\beta\gamma$  también puede regular a las proteínas efectoras de membrana, como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C- $\beta$ , además de otras proteínas, como canales iónicos y diversas cinasas (Magalhaes, et al., 2011; Malerba, et al., 2019; Rajagopal, et al., 2010). Es importante mencionar que el receptor activado también sufre modificaciones postraduccionales independientes a lo ya mencionado (ver apartado 1.5.).



Sin embargo, como en todo proceso biológico, la señal tiene que ser regulada y ser restringida, por lo que las proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (RGS, por sus siglas en inglés) funcionan como proteínas activadoras de GTPasas (GAP, por sus siglas en inglés), las cuales incrementan la velocidad de hidrólisis de GTP en la subunidad  $G\alpha$  y ésta regresa a su estado inactivo, de tal forma que hay reasociación de esta subunidad con el complejo  $G\beta\gamma$  (Figura 3) (de Oliveira, et al., 2019; Hilger, et al., 2018; Sirovatkina, et al., 2016).



**Figura 3. Vía canónica de señalización mediada por los receptores acoplados a proteínas G.** (1) El receptor puede ser activado por señales extracelulares. (2) Ya activado, se une a la proteína G heterotrimérica, la cual está unida a GDP (estado inactivo). (3) El receptor actúa como GEF sobre la proteína G para el intercambio de GDP por GTP (estado activo). (4) La activación de la subunidad  $G\alpha$ , resulta en la disociación del complejo  $G\beta\gamma$ . (5) Tanto  $G\alpha$  como  $G\beta\gamma$ , pueden modular diferentes proteínas efectoras, dando como resultado, diferentes respuestas celulares. Figura realizada con BioRender.com

### 1.5. Regulación de la actividad de los GPCRs: desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga

Cuando los receptores están en la superficie celular, éstos son capaces de percibir o sentir a sus ligandos u otras moléculas extracelulares, produciendo diferentes respuestas celulares a través de las proteínas G heterotriméricas, sin embargo, la actividad de los GPCRs está regulada para evitar la sobre estimulación de los mismos (ya sea por un estímulo prolongado o repetitivo) y así evitar que se vea afectada la homeostasis celular por una respuesta exacerbada, por lo que existe una disminución de la respuesta de estos receptores en comparación a las

respuestas iniciales; a este proceso se le conoce como *desensibilización* e involucra diferentes mecanismos (Rajagopal y Shenoy, 2018).

Existen dos tipos de desensibilización: la desensibilización homóloga y la desensibilización heteróloga. Estos tipos de desensibilización se diferencian dependiendo qué proteínas fosforilan al receptor y si éste es activado o no por su agonista. En el caso de la desensibilización homóloga (dependiente de la activación por su agonista), participan las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptor kinase, GRK), las cuales, fosforilan al receptor, y permiten la unión con alta afinidad de las  $\beta$ -arrestinas con el mismo (Figura 4A). Es decir, tanto las GRKs como las  $\beta$ -arrestinas son clave para la desensibilización del receptor, ya que éstas últimas unidas al receptor, desacoplan a éste de las proteínas G heterotriméricas, lo cual permite la terminación de esta señalización corriente abajo y en muchas ocasiones se dispara una nueva señalización mediada por las  $\beta$ -arrestinas (Gainetdinov, et al., 2004; Klaasse, et al., 2007).

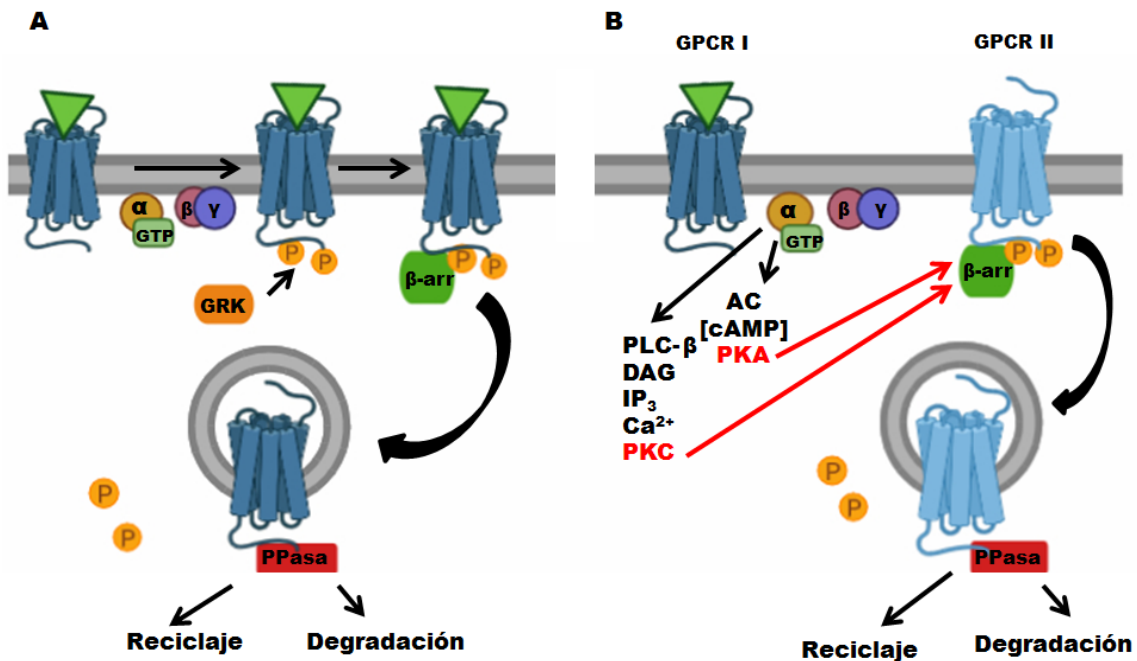
Por otro lado, en la desensibilización heteróloga (ausencia de su agonista), las proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros, como la proteína cinasa C (Protein kinase C, PKC) y la proteína cinasa A (Protein kinase A, PKA) son las responsables de la fosforilación del receptor. Los segundos mensajeros que activan estas cinasas son generados por la activación y señalización de otros receptores, ya sean otros GPCRs o receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs, por sus siglas en inglés) (Figura 4B) (Vázquez-Prado, et al., 2002). Esta señalización también apaga formas de señalización, enciende otras y favorece la internalización de los receptores fosforilados.

## **1.6. Internalización de los receptores**

Los receptores no permanecen estáticos en la membrana plasmática y pueden migrar al interior celular, es decir, se *internalizan* (por el proceso de endocitosis) después de varios minutos de exposición con el ligando. En pocas palabras, la internalización puede ocurrir después de que el receptor haya sido desensibilizado, sin embargo, no todas las ocasiones sucede ésto, ya que si el receptor se desensibiliza, no significa que se internalice (Luttrell y Lefkowitz, 2002). En el caso

específico de los GPCRs, esta inhibición de la señal involucra su fosforilación en la región citoplasmática por las GRKs, la unión de  $\beta$ -arrestina al receptor fosforilado, que impide la activación de la proteína G, dando como resultado la desensibilización e internalización de los GPCRs donde se requiere del reclutamiento de otras proteínas, como AP-2 y clatrina (no mostradas en la figura 4) (Yu, et al., 2018).

Si el receptor se internaliza, éste es destinado a diferentes compartimentos intracelulares, incluyendo diferentes tipos de endosomas e incluso a los lisosomas. Es decir, el receptor una vez internalizado, puede tomar dos vías diferentes que producen efectos opuestos en la célula; estas vías pueden ser el reciclamiento del receptor de nuevo a la membrana plasmática (resensibilización), o bien, ser degradado (Figura 4). Además, el reciclaje puede ser rápido o lento, dependiendo de la vía que se utilice para internalizarse. Por ello, este proceso es importante en la señalización celular, ya que controla la cantidad y disponibilidad de receptores en la superficie celular. Cabe resaltar que dependiendo el tipo de asociación de la  $\beta$ -arrestina con el receptor, puede influir en el destino de éste (Hanlon y Andrew, 2015; Hanyaloglu y von Zastrow, 2008).



**Figura 4. Modelo general de los mecanismos de desensibilización homóloga, desensibilización heteróloga e internalización. (A)** Modelo de desensibilización homóloga: el receptor al ser activado por el ligando se fosforila por GRK; β-arrestina se une a los sitios fosforilados y subsecuentemente el receptor se internaliza. Ya internalizado puede ser reciclado o degradado. **(B)** Modelo de desensibilización heteróloga: el receptor no es activado por el ligando, pero sí es fosforilado por proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, como PKA y PKC, promoviendo su desensibilización e internalización como en la desensibilización homóloga. En ambos casos, el receptor se desfosforila al ser internalizado. Figura realizada con BioRender.com

### 1.7. Proteínas Rab

Debido a la gran compartimentalización en las células eucariontes, se utiliza maquinaria para poder transportar proteínas o cualquier otra molécula a los diferentes organelos membranosos. Por lo que una forma de comunicación entre los organelos, es el tráfico vesicular. Es decir, las moléculas son transportadas por vesículas que pasan de una membrana a otra. Este mecanismo es mediado por una subfamilia de GTPasas pequeñas perteneciente a la súper familia Ras: las proteínas Rab (Zhen y Stenmark, 2015).

Las proteínas Rab se han encontrado en todos los organismos eucariontes investigados, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Entamoeba histolytica*, *Drosophila melanogaster*, también plantas como *Arabidopsis thaliana* y, por supuesto, en *Homo sapiens*, éste con más de 70 proteínas Rab, y su localización en los compartimentos intracelulares depende de su función. Estas

proteínas están involucradas en muchas funciones celulares, destacándose como reguladoras en las etapas del tráfico vesicular (como la formación, movimiento, anclaje y fusión de vesículas), el cual es crítico para la endocitosis, biosíntesis, secreción, diferenciación y crecimiento celular; por consiguiente, estas proteínas regulan la vía endocítica (retrógrada) y la vía exocítica (anterógrada) (Bhuin y Roy, 2014; Park, 2013; Pylypenko, et al., 2017).

Las proteínas Rab desempeñan un papel muy importante en la señalización de los receptores, ya que, como se mencionó anteriormente, al ser éstos activados, su señalización puede ser atenuada con la desensibilización y posterior internalización, por lo que las proteínas Rab estimulan el tráfico de los receptores a través de la vía endocítica y pueden tener diferentes destinos ya internalizados, dependiendo a qué proteínas Rab se asocien. Hay varias proteínas Rab clave involucradas en la vía endocítica y exocítica, controlando la regulación y el transporte de los receptores, ya que están conectadas entre sí; por ejemplo, Rab5 puede ser detectada en la membrana plasmática y estar relacionada con la formación de vesículas cubiertas de clatrina (y con ello, la internalización del receptor), además de fusión de éstas con endosomas tempranos; Rab4 regula el reciclamiento rápido del receptor a la membrana plasmática y por el contrario, Rab11, está involucrada en el reciclaje lento; Rab7 regula el transporte de endosomas tempranos a endosomas tardíos y a lisosomas; y Rab9 regula el reciclamiento de endosomas tardíos al aparato de Golgi, específicamente a la cisterna *trans*-Golgi (Figura 5) (Rossenfeld y Knoll, 2002; Stenmark, 2009; Wandinger-Ness y Zerial, 2014).

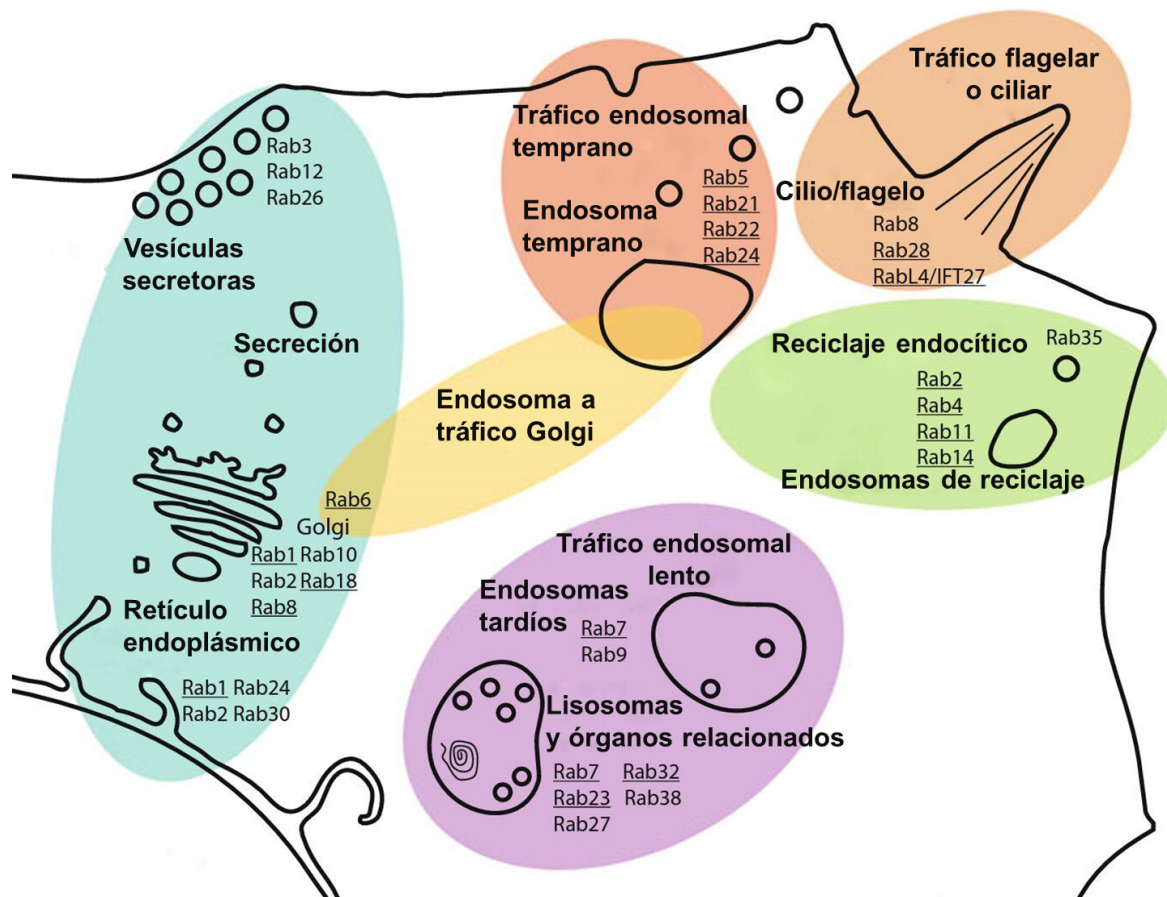


Figura 5. Esquema de localización de algunas proteínas Rab. (tomado y modificado de Wittinghofer, 2014).

## 1.8. Receptores del ácido lisofosfatídico

Entre los estímulos que las células pueden percibir, que son capaces de modular su función, se encuentran algunos fosfolípidos. El ácido lisofosfatídico (lysophosphatidic acid, LPA) es un pequeño lisofosfolípido (430-480 Da), el cual participa en varios procesos celulares, como son la proliferación y el crecimiento celular, la supervivencia, cambios la organización del citoesqueleto, migración, quimiotaxis, forma celular, apoptosis, entre muchos procesos. Este lípido se encuentra en altas concentraciones en el suero sanguíneo ( $>10 \mu\text{M}$ ) y en otros fluidos como plasma, saliva, semen, lágrimas, fluido cerebroespinal y folicular. Las funciones biológicas del LPA son mediadas, al menos, a través de los receptores para ácido lisofosfatídico conocidos, denominados como LPA<sub>1</sub> (Lysophosphatidic Acid Receptor type 1) al LPA<sub>6</sub>. Se ha demostrado que el receptor huérfano GPR87, se activa también por este lípido, por lo que se ha propuesto que es un nuevo receptor para LPA, denominado LPA<sub>7</sub>. Sin embargo, no sólo se ha considerado a

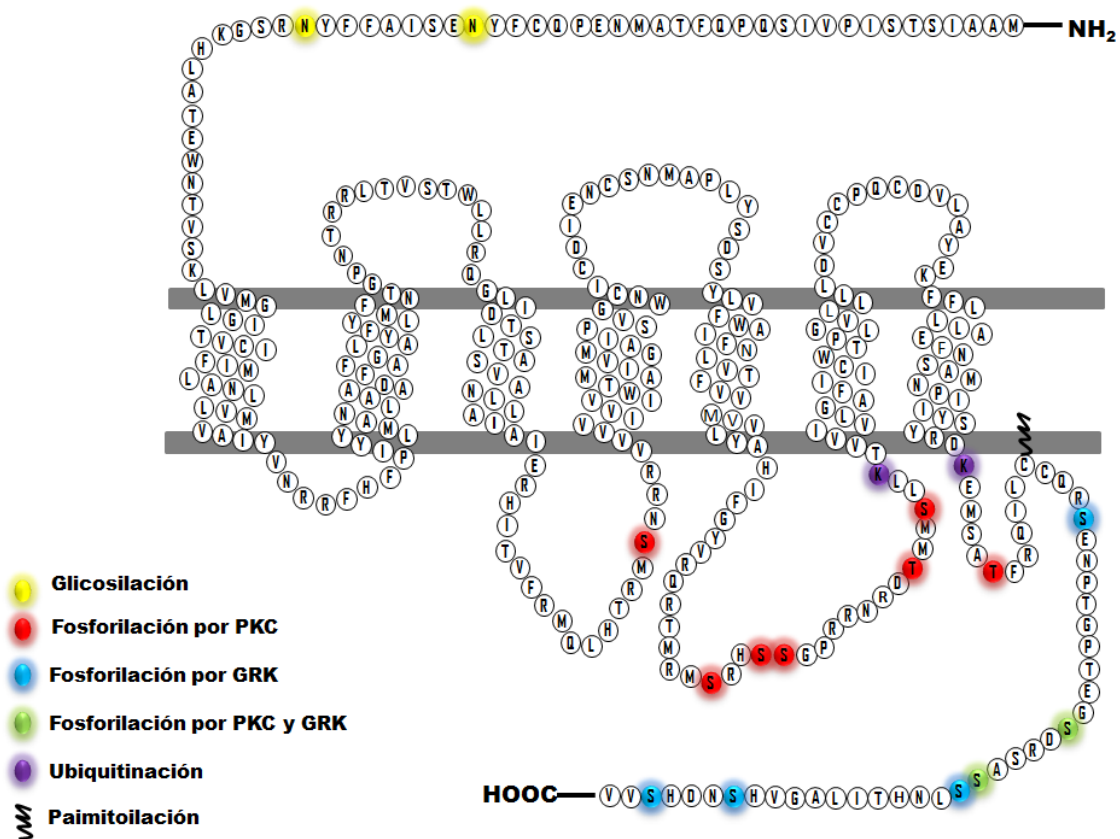
éste último como receptor de LPA, sino también a GPR35 y P2Y10, ya que al ser estimulados con LPA, inducen un incremento en la concentración citoplasmática de  $Ca^{2+}$  como respuesta (Alcántara, et al., 2015; Lee et al., 2019; Riaz, et al., 2015).

Todos los receptores de LPA pertenecen, dentro de la clasificación de los GPCRs, a la clase A, o de la familia de rodopsina. Estos receptores oscilan entre 36 a 42 kDa y tienen la característica de poder interactuar con al menos dos tipos de subunidades  $G\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  o  $G\alpha_{12/13}$ ) y la preferencia de cada una de ellas, se relaciona con el ambiente y tipo celular dado y dependiendo a qué se acople, será la señal corriente abajo que se lleve a cabo (Tabla 1), desempeñando funciones celulares diferentes y relacionados a su vez, con diversas patologías: LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub> se acoplan a  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$ ; LPA<sub>3</sub> se acopla a  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_{q/11}$ ; LPA<sub>4</sub> se acopla a las cuatro subunidades  $G\alpha$ ; LPA<sub>5</sub> se acopla a  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$  y finalmente, LPA<sub>6</sub> se acopla a  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_{12/13}$  (Lee et al., 2019; Noguchi, et al., 2009; Valdés-Rives y González-Arenas, 2017).

### **1.9. Generalidades del receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1 (LPA<sub>1</sub>) y su señalización**

En 1996, el receptor LPA<sub>1</sub> fue el primero en ser identificado y es el más estudiado dentro de los receptores de esta familia a la fecha. Es codificado por el gen *LPAR1* humano (*lpar1* en ratón), localizado en el cromosoma 9 (Chr9q31.3). Está formado por una cadena polipeptídica de 364 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 41 kDa (Figura 6). Cuando este receptor se activa, puede seguir diferentes vías de señalización a través de su acoplamiento con las tres subunidades  $G\alpha$  ya mencionadas, aunque principalmente se acopla a  $G\alpha_i$  bajando los niveles de cAMP por la inhibición de la adenilato ciclasa y con ello, afectando indirectamente en los procesos relacionados con este segundo mensajero. Su activación y desensibilización de señales intracelulares está asociada a la segunda asa intracelular y la tercera asa intracelular es la más larga de todas, siendo clave en la transducción de la señal y su atenuación (González-Gil, et al., 2015; Meizoso-Huesca, et al., 2018; Xiang, et al., 2020; Yung, et al., 2014).

Este receptor tiene una amplia distribución, puesto que abarca muchos órganos, sin embargo, en los sitios donde mayormente se expresa en humanos son el cerebro, corazón, útero, testículos, pulmones, intestino, riñones, bazo y placenta; encontrando una distribución semejante en ratón, aunque en éste último se restringe durante la embriogénesis. Aunque su distribución es muy amplia, los receptores de LPA se encuentran mayoritariamente en el sistema nervioso, y el receptor LPA<sub>1</sub> es el más abundante en el cerebro, por lo que no es sorprendente observar una relación de este receptor y su señalización con ciertos desórdenes neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, ansiedad, discapacidades relacionadas con la memoria o Alzheimer, además de alteraciones en el desarrollo, como hipoxia fetal e hidrocefalia fetal (González-Gil, et al., 2015; Riaz, et al., 2019; Yung, et al., 2014).



**Figura 6. Modelo estructural del receptor LPA<sub>1</sub> humano.** El esquema muestra la secuencia de aminoácidos y los sitios potenciales de glicosilación, fosforilación, ubiquitinación y palmitoilación (tomado y modificado de Hernández-Méndez, et al., 2014).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El receptor LPA<sub>1</sub> está relacionado con muchos procesos celulares, como proliferación, supervivencia, migración y cambios en el citoesqueleto, además de



estar involucrado en diversas patologías (cáncer y fibrosis, en diversos órganos, por ejemplo), por lo que su estudio es de gran importancia. Además, este receptor, así como otros GPCRs, está sometido a varios procesos de regulación en su señalización, como son la desensibilización e internalización, en donde participan varias proteínas, como las GRKs y las proteínas Rab para el tráfico endocítico y destino celular de los receptores.

En nuestro laboratorio, se han realizado proyectos relacionados con la desensibilización homóloga y heteróloga de éste y otros GPCRs. Datos del laboratorio, indican que, para el caso del receptor S1P, existe la misma asociación entre este receptor y las proteínas Rab para ambos casos de desensibilización (Martínez-Morales, et al., 2018), pero no ocurre lo mismo con el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Castillo-Badillo, et al., 2015) ya que se involucran diferentes proteínas Rab dependiendo su mecanismo de activación. Por lo que es de interés, conocer el comportamiento del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab bajo los dos mecanismos de desensibilización ya mencionados.

### **3. Hipótesis**

Los procesos de desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub> tanto por desensibilización homóloga como heteróloga, darán como resultado su internalización y posteriormente su asociación con las proteínas Rab.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. General**

Estudiar la asociación del receptor LPA<sub>1</sub>, marcado con la proteína roja fluorescente mCherry (LPA<sub>1</sub>-mCherry), y las proteínas Rab, marcadas con la proteína verde fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) (Rab5-EGFP, Rab7-EGFP y Rab9-EGFP), durante la desensibilización homóloga y la desensibilización heteróloga, mediadas por LPA, su agonista natural y bajo la acción de la proteína PKC, activada con forbol miristato acetato (phorbol myristate acetate, PMA) respectivamente, en la línea celular HEK 293 (human embryonic kidney cells).

## 4.2. Particulares

- I. Sobreexpresar de manera transitoria el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 marcadas con la proteína verde fluorescente (Rab5-EGFP, Rab7-EGFP y Rab9-EGFP) en células HEK 293.
- II. Utilizando microscopía confocal, estudiar la internalización del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry, determinando la fluorescencia en la membrana plasmática y en vesículas en el interior celular, bajo la acción de LPA y PMA.
- III. Determinar por microscopía confocal y mediante la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) la asociación del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry con las proteínas Rab en respuesta a LPA y PMA.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Reactivos

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suero fetal bovino, tripsina, antibióticos (estreptomina, anfotericina, penicilina) se obtuvieron de Life Technologies. Ácido lisofosfatídico (LPA), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. Paroxetina fue un obsequio de PsicoPharma SA de CV (México). Polietilenimina (PEI) se obtuvo de Polysciences. Plásmidos para la expresión del receptor LPA<sub>1</sub> humano unido a la proteína mCherry y plásmidos para las proteínas Rab unidas a la EGFP.

### 5.2. Cultivo celular y transfecciones para expresiones transitorias

Se utilizó la línea celular HEK 293 derivada de embrión de riñón humano (American Type Culture Collection). Para el mantenimiento de las mismas, se sembraron dichas células en cajas Petri de 10 cm de diámetro tratadas previamente con poli-D-lisina y se mantuvieron con medio DMEM suplementado, con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 µg/ml de estreptomina, 100 U/ml de penicilina y 0.25 µg/ml de anfotericina B; manteniendo el cultivo a 37°C, con 95% de humedad y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para el estudio de las interacciones del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab, se sobreexpusieron de manera transitoria en células HEK 293 el

receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry con las diferentes proteínas Rab de interés; es decir, LPA<sub>1</sub>-mCherry/Rab5-EGFP, LPA<sub>1</sub>-mCherry/Rab7-EGFP y LPA<sub>1</sub>-mCherry/Rab9-EGFP. Se sembraron células HEK 293 WT en cajas Petri de 6 cm de diámetro, trabajándolas a una confluencia aproximadamente del 80% y posteriormente se realizaron cotransfecciones transitorias. Para realizarlas, se retiró el medio DMEM suplementado y se lavaron las células dos veces con DMEM no suplementado (este medio no contiene 10% de suero fetal bovino ni antibióticos). Posteriormente, se les adicionaron 500 µL de medio de transfección Opti-MEM<sup>®</sup>. Para cada cotransfección, se realizaron dos stocks, A y B. Al stock A se le agregaron 242 µL de medio Opti-MEM<sup>®</sup> y 8 µL de polietilenimina (PEI) y al stock B, se le agregaron 7 µg del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y 1 µg del plásmido que codifica para la proteína Rab específica con medio Opti-MEM<sup>®</sup> con volumen final de 250 µL. Ambos stocks se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de dicha incubación, el stock A y el B se mezclaron y se incubaron nuevamente, ahora por 20 minutos, igualmente a temperatura ambiente. Finalmente, el stock A-B se adicionó en las cajas de 6 cm con células HEK 293 y se incubaron por 4 horas a 37°C, humedad saturante y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se le retiró el medio (medio de transfección Opti-MEM<sup>®</sup> + el stock A-B) y se le adicionó medio DMEM suplementado, dejando incubar bajo las mismas condiciones mencionadas toda la noche.

### **5.3. Microscopía confocal**

Se realizaron ensayos de microscopía confocal. Para ello, las células HEK 293 ya transfectadas transitoriamente, se sembraron en cajas de fondo de vidrio FluoroDish<sup>™</sup> tratadas con poli-D-lisina con una confluencia aproximadamente del 60%, ésto último con la finalidad de tener células aisladas y hacer más fácil su posterior análisis. Estas muestras se incubaron durante 48 horas. Después de este tiempo de incubación y asegurando que la cotransfección fuera exitosa y la morfología celular también la adecuada, es decir, adheridas a la caja de Petri y elongadas, ya fueran células bipolares o multipolares (invitrogen, Handbook), se les retiró el medio DMEM suplementado y se les adicionó a cada caja de fondo de vidrio 1 ml de medio DMEM no suplementado (para evitar la presencia de suero que contienen LPA). En este momento, las células se incubaron durante 5 horas más.

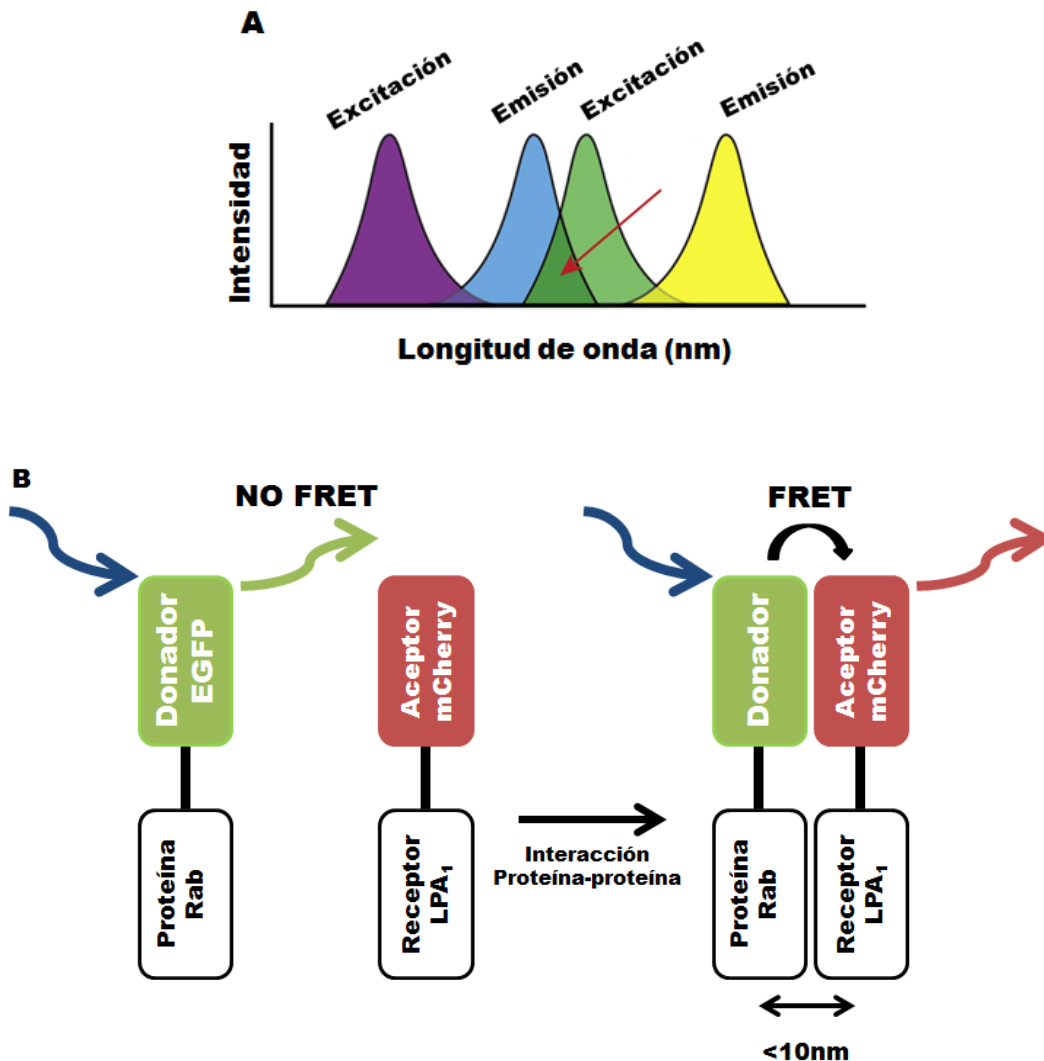
Después de la incubación, las células se estimularon con el respectivo ligando de interés, ya sea por su agonista, LPA (1  $\mu$ M) (desensibilización homóloga) o con PMA (1  $\mu$ M) (desensibilización heteróloga) siguiendo un curso temporal: basal (sin estímulo), 2, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Después del estímulo correspondiente, se lavaron las muestras dos veces con PBS (solución salina isotónica amortiguada con fosfatos) y a cada muestra se le adicionaron 600  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% incubándolas por 20 minutos a 37°C, humedad saturante y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dicha incubación, cada muestra se lavó con PBS cuatro veces para retirar el exceso de paraformaldehído y se finalizó añadiendo 1 ml de PBS. Para conservar las muestras, se sellaron con papel Parafilm y se conservaron en refrigeración a 4°C en oscuridad hasta su visualización.

#### **5.4. Förster Resonance Energy Transfer (FRET): asociación del receptor LPA<sub>1</sub> y proteínas Rab**

*Förster resonance energy transfer* (FRET) puede utilizarse para analizar la interacción de dos proteínas de interés, cada una marcada con una proteína fluorescente diferente, las cuales tienen que ser compatibles en sus espectros: la proteína fluorescente que participe como donadora, su espectro de emisión se tiene que traslapar con el espectro de absorción de la proteína fluorescente donadora. Por lo tanto, si ambas proteínas están a una distancia muy cercana, es decir, a menos de 10 nanómetros, cuando la proteína donadora es excitada, le transfiere su energía a la otra proteína y ésta emite en su espectro de emisión (Figura 7A). En este caso, las proteínas fluorescentes donadoras son las proteínas Rab, y las aceptoras son los receptores LPA<sub>1</sub> (Figura 7B).

Para ello, las muestras fijas que se obtuvieron, se analizaron en un microscopio confocal Fluoview modelo FV10i de Olympus. Las imágenes obtenidas se tomaron con los siguientes parámetros: con un objetivo 60X de inmersión de aceite, con una apertura focal de 1, sensibilidad de 45.0% e intensidad del láser de 40.0%. La proteína EGFP se excitó a 489 nanómetros y la emisión se detectó 510 nanómetros, mientras que la proteína mCherry se excitó a 580 y la fluorescencia emitida se detectó a 610 nanómetros. Para el análisis del Canal de FRET, la proteína EGFP (pero no la proteína mCherry) se excitó y su fluorescencia se detectó

a 610 nanómetros. Se tomaron al menos 8 imágenes de cada condición y éstas se analizaron con el software ImageJ. Dicho software fue obtenido del sitio web del Instituto Nacional de Salud (ImageJ, Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <https://imagej.nih.gov/ij/>).



**Figura 7. FRET, técnica utilizada para estudiar la interacción entre proteínas. (A)** Espectros de excitación y emisión de fluoróforos (representación ilustrativa) **(B)** En este caso, la interacción de interés es entre las proteínas Rab y el receptor LPA<sub>1</sub>, cada una de ellas marcada con proteínas fluorescentes diferentes. Para que haya señal de FRET, la asociación entre estas proteínas tiene que ser a menos de 10 nanómetros de distancia (tomado y modificado de Broussard y Green, 2017).

### 5.5. Internalización del receptor LPA<sub>1</sub>

Se utilizaron las mismas imágenes obtenidas y utilizadas para los análisis de FRET para estudiar la internalización del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry con respecto a su activación con LPA y bajo la acción de la PKC, activada farmacológicamente por

PMA. Para ello, también se trabajó con el software *ImageJ*, midiendo la internalización con respecto a la determinación de la fluorescencia intracelular, de acuerdo al protocolo *Measuring Cell Fluorescence using Image J*. Como se mencionó en los objetivos particulares, también se estudió la internalización del receptor bajo la acción de paroxetina, un antidepresivo, el cual es un agente que tiene la capacidad de inhibir a la cinasa GRK2, que es clave en la desensibilización e internalización de los receptores acoplados a proteínas G. En este caso, se realizaron transfecciones transitorias en células HEK 293 con el receptor (LPA<sub>1</sub>-mCherry) y también se pasaron dichas células transfectadas a cajas de fondo de vidrio para su visualización en el microscopio confocal Fluoview modelo FV10i de Olympus.

## **5.6. Análisis de imágenes**

La selección de campos para la obtención de imágenes, se realizó de manera arbitraria, sin embargo, se procuró tomar la imagen en un campo con baja confluencia para facilitar el análisis, principalmente para el análisis de internalización del receptor. El índice de FRET (FRET INDEX, el cual elimina el fondo y FRET falso, es decir, los falsos positivos) se cuantificó con el plug-in “FRET and Colocalization Analyzer” del Software ImageJ. El plug-in funciona con imágenes de 8 bit y permite el cálculo del índice de FRET mediante el método de pixel por pixel basándose en la fluorescencia por emisión sensibilizada.

## **5.7. Análisis estadístico**

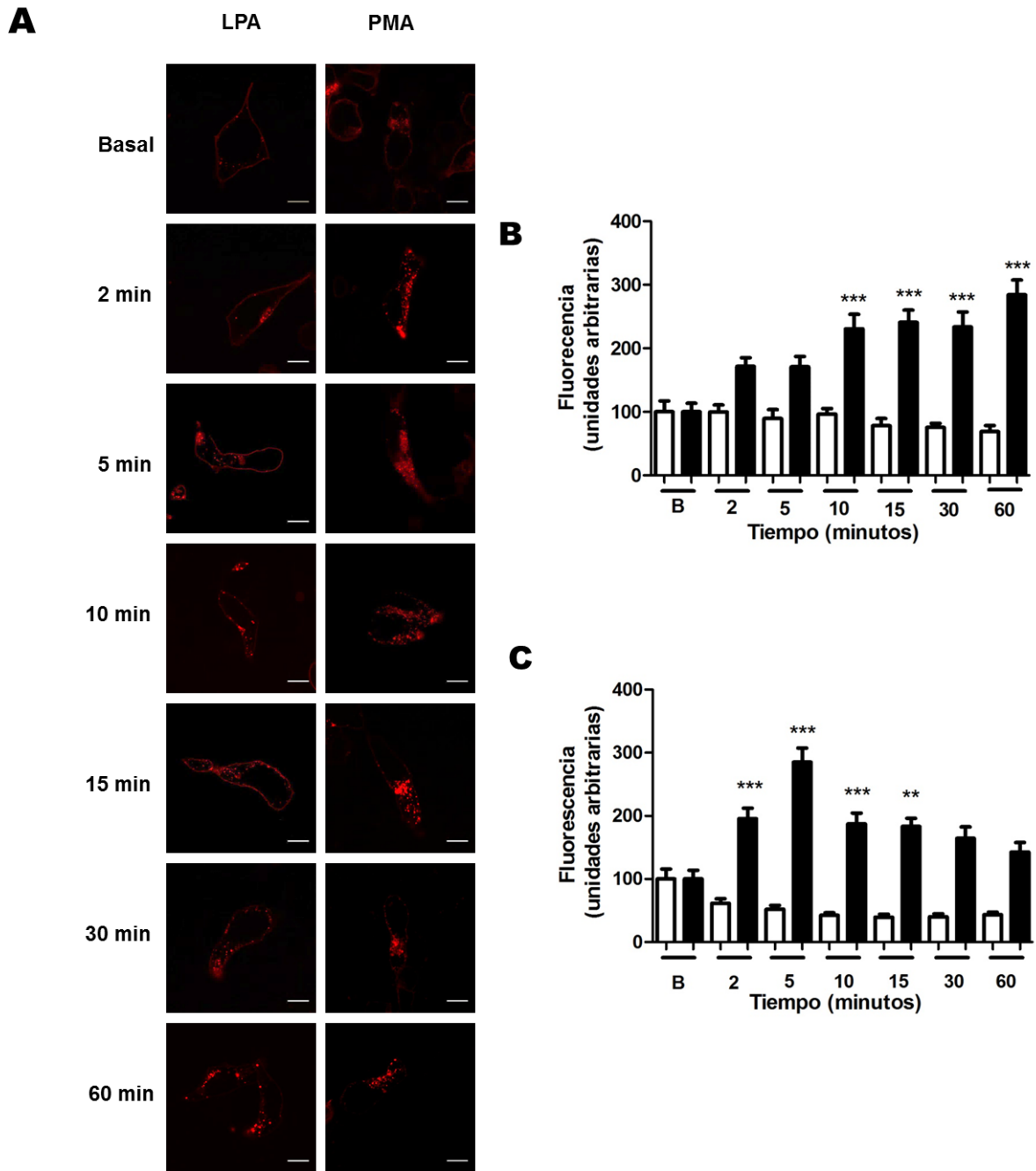
El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Los datos se analizaron con pruebas de ANOVA con corrección de Bonferroni. Para todas las pruebas estadísticas, un valor de  $p < 0.05$ , se consideró estadísticamente significativo. Los datos fueron normalizados, el promedio de los valores de los basales en todos los experimentos, fueron considerados como el 100%.

## 6. Resultados

### 6.1. Localización subcelular del receptor LPA<sub>1</sub>

Bajo condiciones basales, es decir, sin ningún estímulo, el receptor se encuentra principalmente delimitado en la membrana plasmática, ya que también existe fluorescencia en el citoplasma en esta misma condición, percibiéndose vesículas intracelulares en muy baja cantidad. Al observar la cinética de la internalización del receptor LPA<sub>1</sub> en la línea celular HEK 293, se observó una diferencia muy notoria entre la estimulación con LPA y con PMA (Figura 8).

Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado la internalización del receptor LPA<sub>1</sub> con la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata y HEK 293 (Avendaño-Vázquez, et al., 2005; Meizoso-Huesca, et al., 2018) y la cinética de internalización con esta última línea celular, es muy similar a la cinética observada en este trabajo cuando se estimula al receptor con LPA, ya que si el receptor es activado con su agonista, se observó que la cantidad y localización de vesículas en el interior celular fueron aumentando durante el curso temporal, teniendo un máximo entre los 30 y 60 minutos, pero no tan rápido como cuando se estimuló con PMA, puesto que con el éster de forbol, hay una rápida y notable acumulación de vesículas intracelulares especialmente a los cinco minutos (Figura 8). Sin embargo, bajo la acción de PMA, en los minutos posteriores después de la acumulación máxima de vesículas, durante el curso temporal, se observó una disminución en la internalización de éstas. Es decir, aunque la internalización del receptor con el agonista, LPA, ocurre más lentamente, la cantidad de vesículas se mantiene constante durante los últimos tiempos del curso temporal, lo que no ocurre cuando se estimula con PMA ya que la internalización se produce muy rápido, pero no se mantiene y decae posteriormente la cantidad de vesículas intracelulares. Así, en ambos casos, la acumulación de la fluorescencia vista como vesículas intracelulares es un buen indicador de la internalización del receptor tanto por la vía homóloga como por la vía heteróloga, y su cuantificación se presenta en la figura 8.



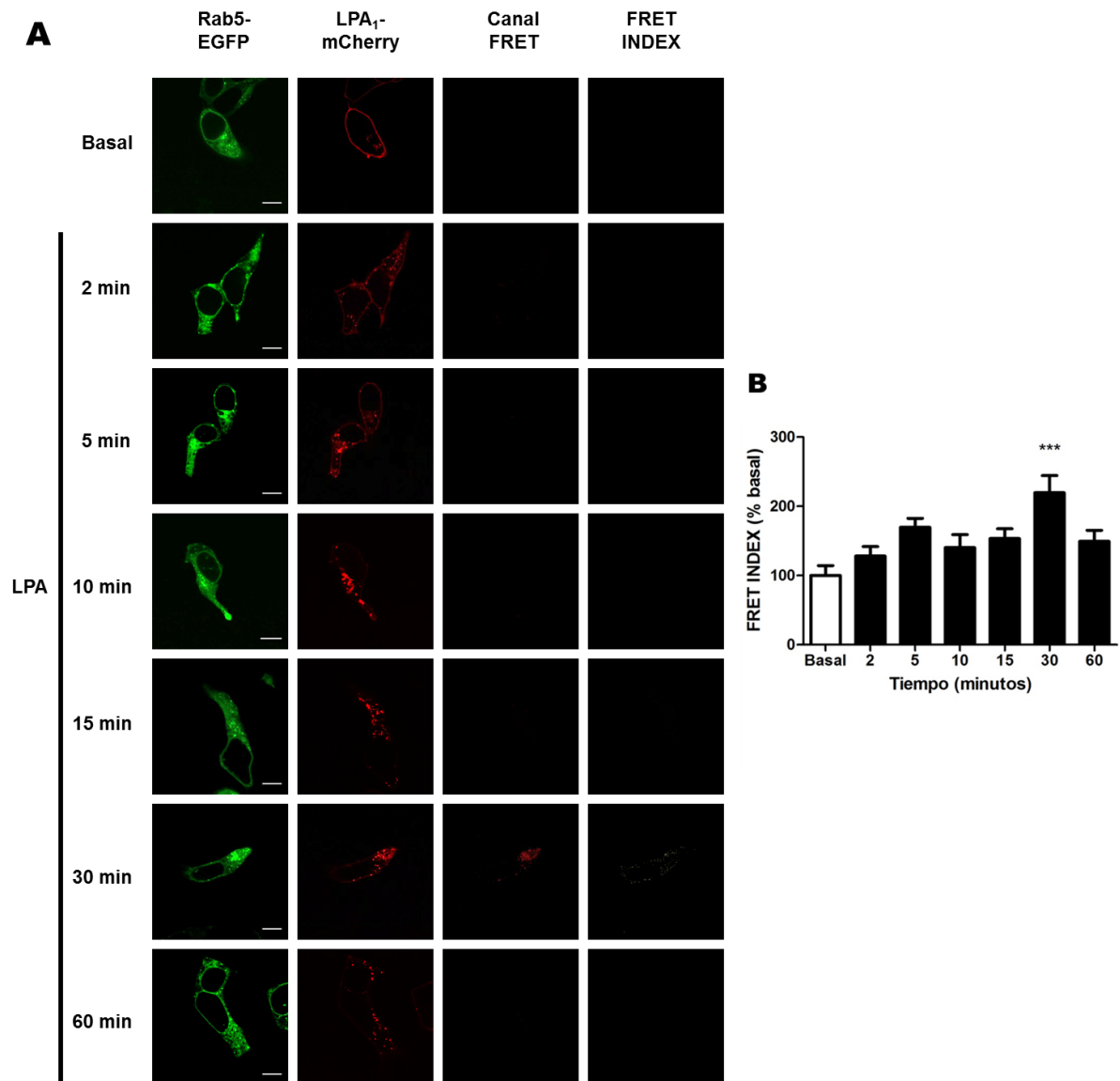
**Figura 8. Cinética de internalización del receptor LPA<sub>1</sub>, bajo desensibilización homóloga y heteróloga.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 transfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub> unido a la proteína mCherry. **(A)** Células en ausencia (basal) o presencia de LPA (1  $\mu$ M) o PMA (1  $\mu$ M) por los tiempos indicados. Barras de escala 10  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia en membrana plasmática y en vesículas intracelulares del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry bajo la acción de LPA. **(C)** Cuantificación de la fluorescencia en membrana plasmática y en vesículas intracelulares del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry bajo la acción de PMA. Barras blancas indican fluorescencia en membrana plasmática; barras negras indican fluorescencia en citoplasma.



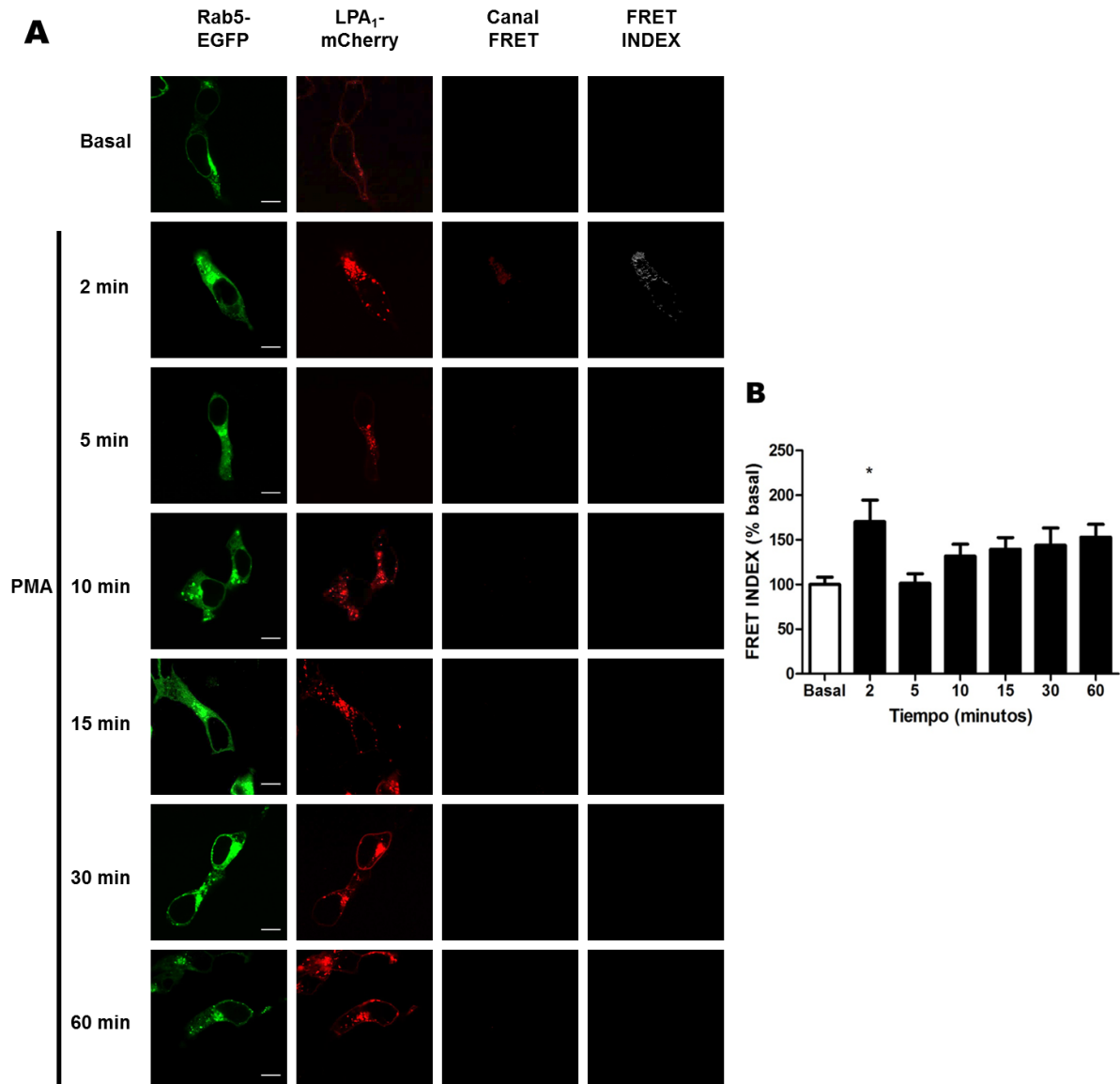
## 6.2. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab

Los receptores, incluyendo al receptor LPA<sub>1</sub>, pueden interaccionar con diferentes vesículas endocíticas dependiendo de si son sometidos a desensibilización homóloga o desensibilización heteróloga, por lo que, mediante la técnica de FRET, se evaluó la asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 a través de un curso temporal (2, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos) con estímulos independientes: LPA (1 μM) o PMA (1 μM), comparando los resultados con la condición sin estímulo (basal, tiempo 0 min). Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 9-14, en ellas se muestran cuatro columnas con siete filas: se muestra la fluorescencia de EGFP de la respectiva proteína Rab (primera columna), la fluorescencia de mCherry del receptor LPA<sub>1</sub>-humano (segunda columna) el canal de FRET (tercera columna) y FRET INDEX (cuarta columna); esta última columna indica la asociación del receptor con la proteína Rab (cuantificada con el plug-in “FRET and Colocalization Analyzer” del Software ImageJ).

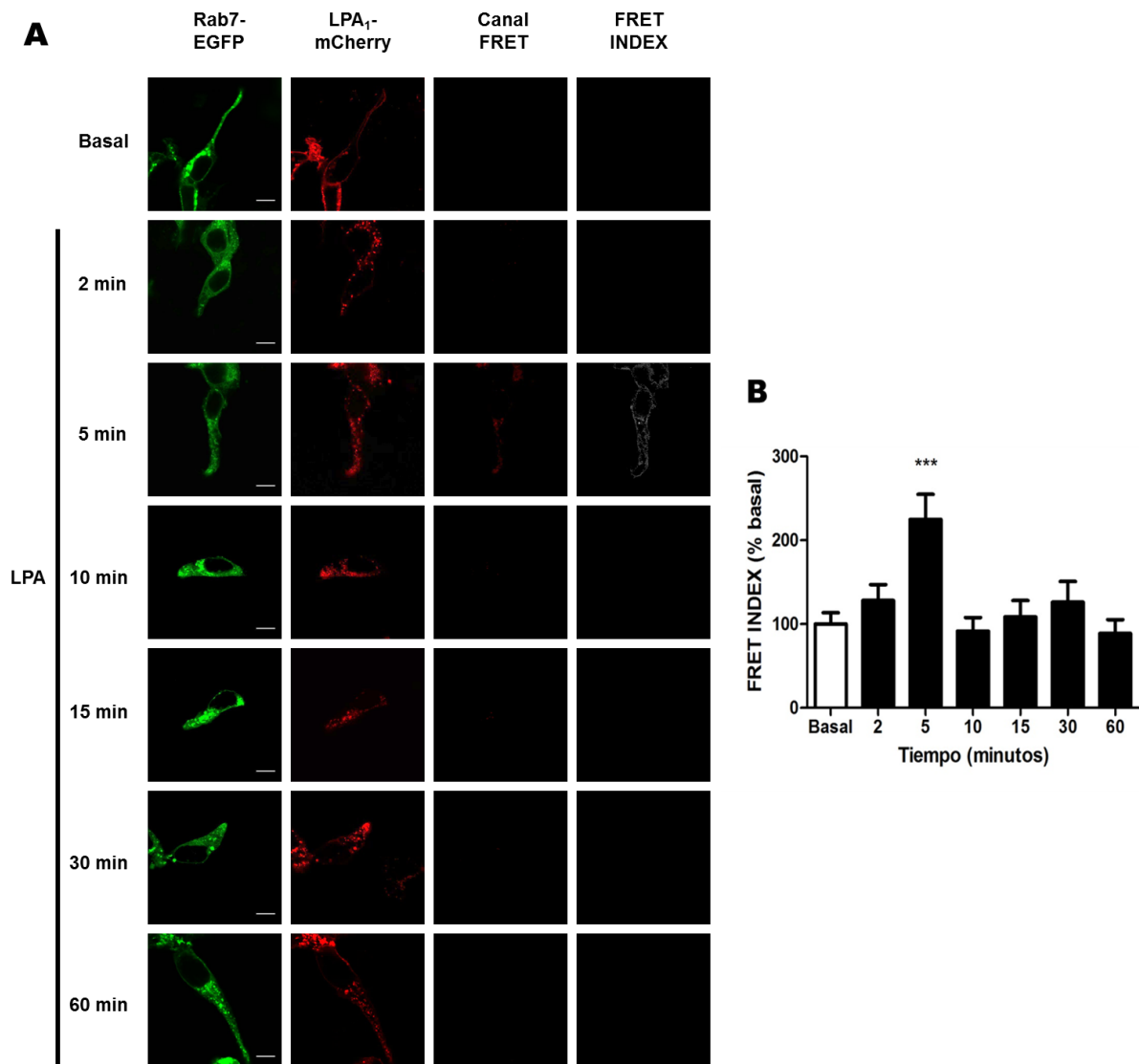
Primeramente se evaluó la interacción del receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry con la proteína Rab5-EGFP, un marcador de los endosomas tempranos, y los resultados mostraron que hay señal de FRET con ambos estímulos (tanto LPA como PMA), pero la señal no es significativa en los mismos tiempos durante el curso temporal; ya que cuando se estimula con LPA, la señal de FRET se detecta significativa hasta los 30 minutos y con PMA es significativa en los primeros 2 minutos (Figuras 9 y 10, respectivamente). Por otro lado, se evaluó la asociación del receptor con la proteína Rab7, y se observó que también hay señal de FRET, igualmente en diferentes tiempos; con LPA, la asociación es rápida, puesto que la señal significativa ocurre a los 5 minutos de estímulo, mientras que con PMA, es hasta los 60 minutos (Figuras 11 y 12, respectivamente). Finalmente, también se evaluó la asociación del receptor con la proteína Rab9; en este caso, no se detectó señal de FRET con el receptor LPA<sub>1</sub> cuando éste se desensibiliza por vía heteróloga, pero sí por vía homóloga a los 60 minutos. Aunque no con un nivel de detección significativo en otros tiempos, pareciera que la asociación entre estas dos proteínas va incrementando durante el curso temporal cuando el receptor es estimulado con LPA (Figura 13 y 14) (Tabla 2).



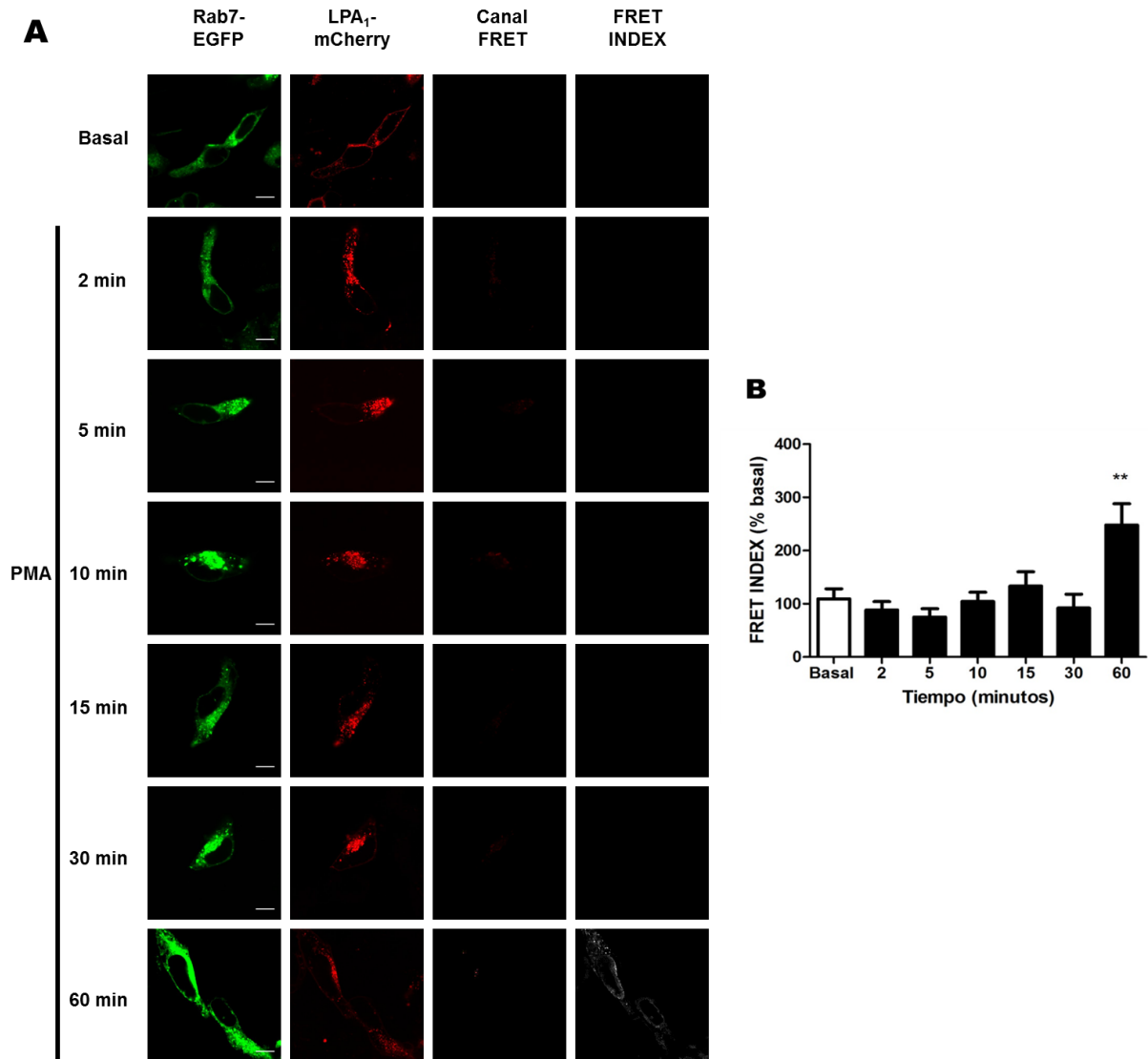
**Figura 9. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab5 por desensibilización homóloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab5-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de LPA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.



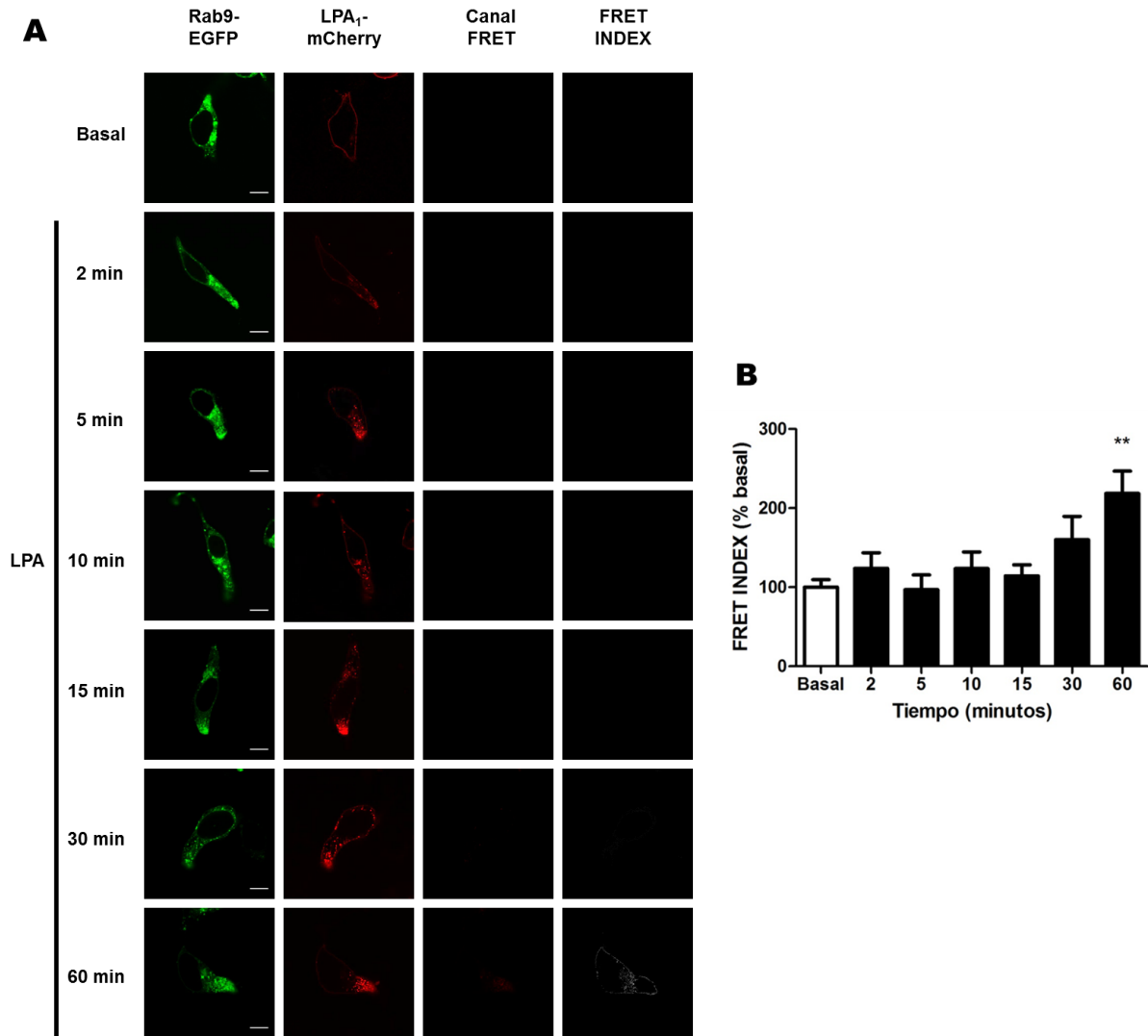
**Figura 10. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab5 por desensibilización heteróloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab5-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de PMA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.



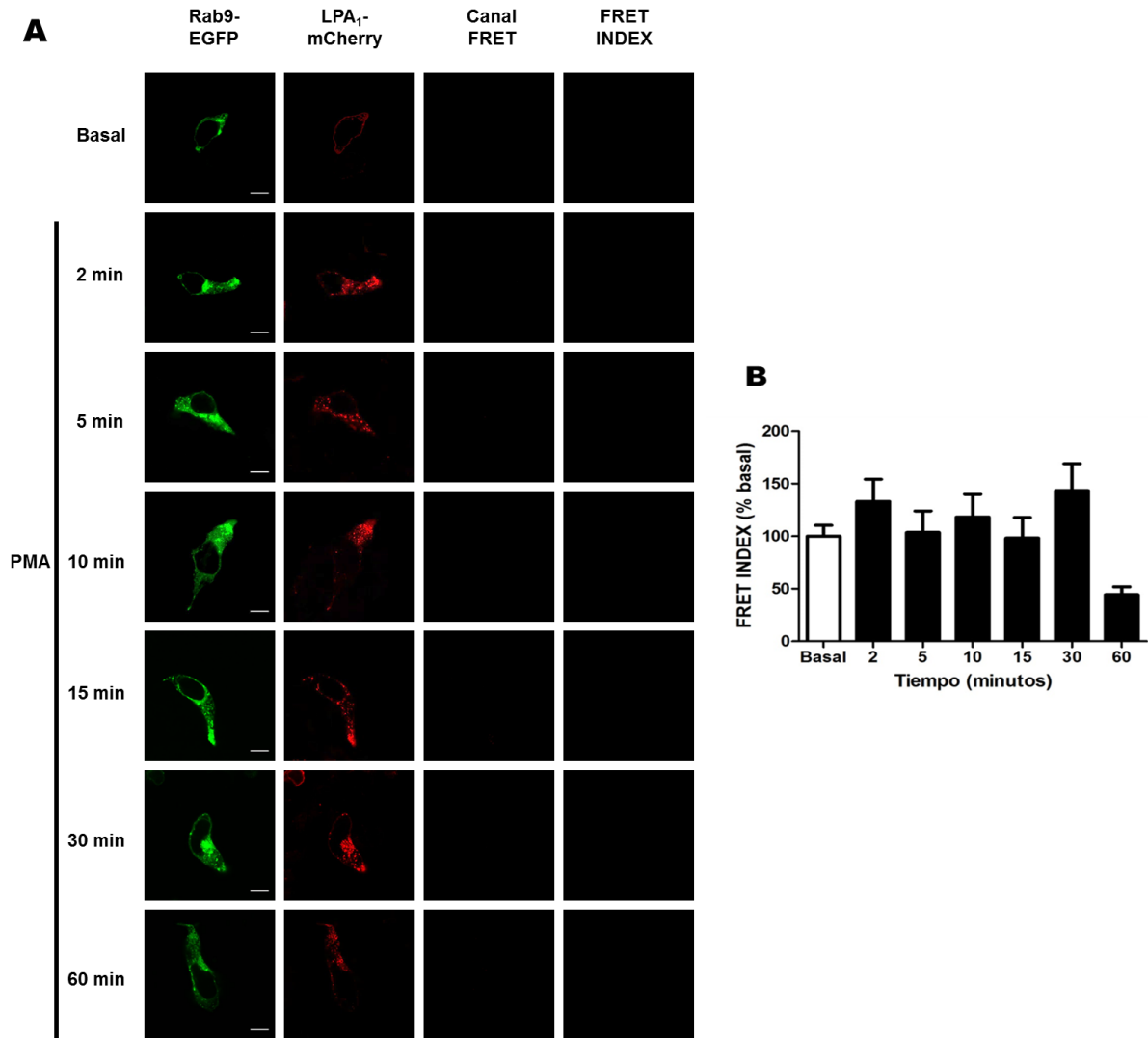
**Figura 11. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab7 por desensibilización homóloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab7-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de LPA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.



**Figura 12. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab7 por desensibilización heteróloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab7-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de PMA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.



**Figura 13. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab9 por desensibilización homóloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab9-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de LPA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.



**Figura 14. Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con la proteína Rab9 por desensibilización heteróloga.** (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK 293 cotransfectadas transitoriamente con el receptor LPA<sub>1</sub>-mCherry y la proteína Rab9-EGFP, estimuladas con 1  $\mu$ M de PMA. Barras de escala 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la señal de FRET durante el curso temporal. Se realizaron tres experimentos independientes usando diferentes preparaciones celulares.

Tabla 2

*Asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 por ambos mecanismos de desensibilización*

### Desensibilización homóloga

	<b>Rab5</b>	<b>Rab7</b>	<b>Rab9</b>
Receptor LPA <sub>1</sub>	SÍ (min 30)	SÍ (min 5)	SÍ (min 60)

### Desensibilización heteróloga

	<b>Rab5</b>	<b>Rab7</b>	<b>Rab9</b>
Receptor LPA <sub>1</sub>	SÍ (min 2)	SÍ (min 60)	NO

Con la desensibilización homóloga, el receptor LPA<sub>1</sub> se asocia con las tres proteínas Rab trabajadas en este trabajo (Rab5, Rab7, Rab9); con la desensibilización heteróloga, el receptor no se asocia con la proteína Rab9.

## 7. DISCUSIÓN

La internalización y el tráfico vesicular de los GPCRs son procesos clave para su señalización y regulación al recibir estímulos; por lo que se estudió la cinética de internalización del receptor LPA<sub>1</sub>-humano y a qué proteínas Rab se asocia, todo bajo desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga en la línea celular HEK 293. Los resultados mostrados en este trabajo indican que la activación del receptor LPA<sub>1</sub> por su agonista y por la activación farmacológica de PKC con PMA, así como su posterior internalización y, con ello, sus vías de señalización corriente abajo son diferentes, puesto que, aunque hay asociación del receptor con las proteínas Rab5 y Rab7 en los dos mecanismos de desensibilización, no ocurre lo mismo con Rab9, ya que sólo existe asociación con ésta última proteína, cuando el receptor es activado con su agonista natural.

Es interesante observar que al estimular el receptor LPA<sub>1</sub> tanto con LPA como con PMA, las cinéticas de internalización son muy diferentes, sin embargo, esta diferencia probablemente sea dependiente del espacio, tiempo, cantidad y naturaleza del estímulo, además, de la cantidad de receptores disponibles, en este



caso, localizados en la membrana plasmática; ya que para el caso del agonista, el LPA, y la internalización inducida por éste, depende de la cantidad de ligandos y de receptores, por lo que se necesita más tiempo para observar más vesículas intracelulares en tiempos más prolongados; en cambio, cuando se trata a PMA como estímulo, la internalización es más rápida, posiblemente como consecuencia de que penetra al interior de las células y en el citoplasma, activa y transloca a la PKC a la membrana plasmática para fosforilar al receptor (Goel, et al., 2007; Klaasse, et al., 2007; Zhang y Kim, 2017). Además la acción de los agonistas es transitoria pero la acción de la PKC por PMA es sostenida. En otras palabras, el mecanismo a través del cual ocurre la fosforilación de los receptores muestra diferencias espacio-temporales y probablemente mecánicas importantes.

Después del análisis de la cinética de internalización del receptor LPA<sub>1</sub>, se analizó qué pasa con este receptor después de ser desensibilizado y posteriormente internalizado, es decir, analizar el papel de las proteínas Rab con este receptor, ya que una vez, internalizado, puede tomar diferentes vías. Primeramente, la internalización de los receptores o cualquier otra proteína y/o molécula que pase de la membrana plasmática al citoplasma es mediada por vías de tráfico endocítico. Así que, el receptor se encuentra principalmente en la membrana plasmática en condiciones basales y es endocitado por la formación de vesículas endocíticas, que a su vez, se fusionan con endosomas tempranos, localizados en la periferia celular; por lo que los endosomas tempranos ya fusionados a la proteína o molécula de interés, sirven como un punto de partida, ya que permiten, que en el caso de los receptores, ya en el citoplasma, tomen diferentes vías dependiendo del tipo de receptor y cómo éste es estimulado. Como se mencionó anteriormente, las proteínas Rab al estar activas, se localizan en membranas intracelulares de organelos membranosos e interaccionan con diferentes proteínas efectoras dependiendo de la función que desempeñen; por lo que los datos obtenidos en este trabajo indican que tanto la activación del receptor LPA<sub>1</sub> por su agonista como por la activación farmacológica de PKC desencadenan una asociación estrecha (entre 1-10 nm de distancia) con la proteína Rab5 en las primeras etapas del tráfico vesicular, ya que están asociadas a la membrana plasmática y median la formación de vesículas cubiertas de clatrina en la superficie celular, además de mediar el transporte y fusión de vesículas endocíticas con endosomas tempranos. Resultados

obtenidos por Murph, et al. (2003), mostraron que utilizando una mutante de Rab5 en células HeLa, el receptor LPA<sub>1</sub> permanece en la membrana plasmática, confirmando la importancia de esta proteína Rab en las primeras etapas del tráfico vesicular. Lo destacable en la asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab bajo los dos mecanismos de activación, es la diferencia temporal en la que esto ocurre, sin embargo, al observar la cinética de internalización es comprensible la asociación tan rápida con PMA, ya que el receptor es internalizado igualmente muy rápido, requiriendo de Rab5 tempranamente y como con LPA la internalización es mucho más lenta, se refleja la asociación máxima más tardíamente.

En segunda instancia, para seguir el transcurso de la vía endocítica, se analizó la proteína Rab que está involucrada en degradación, Rab7. Esta proteína actúa corriente abajo de Rab5 para regular el transporte de endosomas tempranos a endosomas tardíos y de endosomas tardíos a lisosomas. Es decir, esta proteína modula la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos, así como el transporte de endosomas tardíos a lisosomas, fusionándose y generando un compartimento endolisosomal, donde juega un papel muy importante el ambiente ácido para la degradación del receptor (Cullen y Steinberg, 2018; Guerra y Bucci, 2016).

Para el caso de la desensibilización heteróloga, se observó que el receptor LPA<sub>1</sub> probablemente requiere la proteína Rab5 para internalizarse. Sin embargo, tras la internalización, se observó una disminución en las vesículas intracelulares, así como una interacción del receptor con la proteína Rab7, lo que sugiere que el receptor se destinó a los lisosomas para su degradación. Es hasta cierto punto reconocible e intuitivo que la asociación de LPA<sub>1</sub> con Rab7 ocurra en tiempos largos, puesto que en la cinética de internalización con PMA es apreciable la disminución progresiva de vesículas en el interior celular. Es decir, cuando la desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub>, inducida por vía heteróloga, se sugiere una transición de éste de endosomas tempranos a endosomas tardíos por las proteínas Rab ya mencionadas, y posteriormente a lisosomas para su degradación.

Esto no sucede exactamente cuando el receptor es desensibilizado por vía homóloga, ya que, en este caso, el receptor LPA<sub>1</sub> se asocia tanto a la proteína Rab7

como a la proteína Rab9. Esto sugiere un proceso más dinámico, complejo y no lineal del receptor cuando es estimulado por su agonista natural. Por lo que se sugiere que, el receptor por este tipo de mecanismo de activación, también puede ser degradado (regulación negativa). Dado que la proteína Rab9 modula el tráfico vesicular de endosomas tardíos a la red *trans*-Golgi (*trans*-Golgi Network) (transporte retrógrado) se sugiere a su vez, reciclamiento de este receptor, específicamente un reciclaje lento; ya que los receptores pueden seguir dos vías de reciclamiento, dependiendo de la velocidad con la que regresen a la membrana plasmática, es decir, reciclaje rápido o reciclaje lento; con ello, el receptor internalizado, regresa a la superficie celular y la señalización se regula, volviendo a recibir las células los estímulos externos del ambiente.

Se ha visto que el destino del receptor a cualquiera de las dos vías, ya sea la de reciclaje o degradación, no sólo ocurre en la membrana plasmática, sino en cualquier paso del tráfico endocítico, dependiendo de las necesidades de las células y específicamente, se han identificado a los endosomas tempranos como los sitios donde ocurre con mayor rigurosidad esta divergencia entre las rutas. Además, es importante resaltar que, los receptores para LPA, incluido el receptor estudiado en este trabajo, LPA<sub>1</sub>, se acoplan con más de dos subunidades G diferentes, generalmente desencadenando la respuesta de varias de estas subunidades en un mismo contexto. Por ello, la regulación de su actividad no se tiene que analizar como un proceso lineal sino más conectado entre sí, con diferentes alternativas para promover otras funciones celulares. (Cullen y Steinberg, 2018; Gonzalez-Gaitan, 2008; Hanyaloglu y von Zastrow, 2008; Jean-Alphonse y Hanyaloglu, 2009).

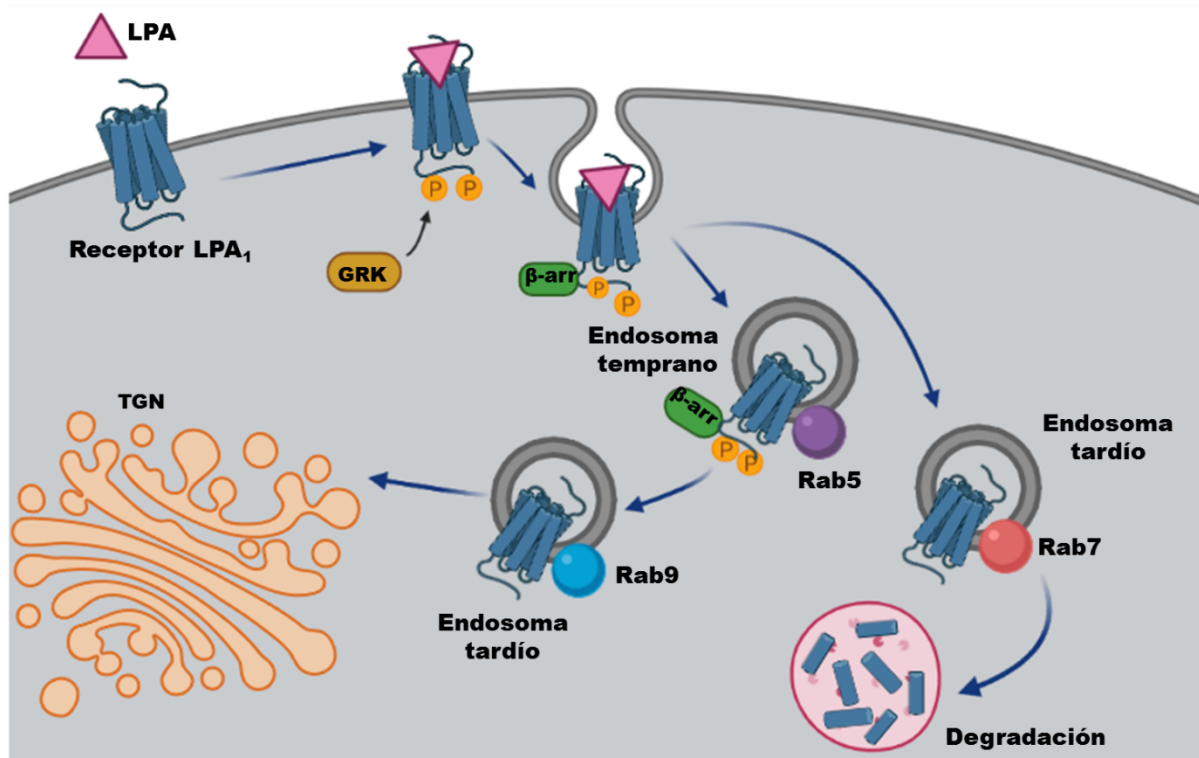
Los receptores pueden retenerse en endosomas y retardar la velocidad de su destino (Jean-Alphonse y Hanyaloglu, 2009). Ésto podría ser el caso del receptor cuando es desensibilizado por la vía homóloga y su reciclamiento lento, ya que se aprecia primero la señal de FRET con la proteína Rab7 y luego con Rab9. De forma consistente con la degradación del receptor LPA<sub>1</sub> por esta vía, Zhao et al. (2016), observaron que este receptor, por la unión de su agonista, LPA, sufre ubiquitinación y degradación en lisosomas. Sin embargo, esta modificación puede ser reversible por la acción de una desubiquitinasa lo que incrementa su estabilidad y previene su degradación, promoviendo ser reciclado a la membrana plasmática

(Gonzalez-Gaitan, 2008). Un ejemplo de este comportamiento, es el receptor Frizzled-4, su ubiquitinización promueve su internalización y degradación vía lisosoma, mientras que, si se revierte, permite su reciclamiento y posterior localización en la superficie celular (Dores y Trejo, 2012). Sin embargo, un punto a considerar importante es que en el caso de la desensibilización homóloga, hay señal de FRET con Rab7 antes que con Rab5, siendo Rab5 estar asociado a endosomas tempranos y Rab7 a endosomas tardíos por lo que sugiere algún otro tipo evento. Es decir, de acuerdo a Skieterska, et al., 2017, la ubiquitinización de GPCRs puede regular su expresión en la membrana plasmática y cuando el receptor se une a su agonista, éste se desubiquitina y se internaliza, por lo que podría regresar a la membrana plasmática. Así que la proteína Rab7 podría estar jugando un papel más allá del de degradación.

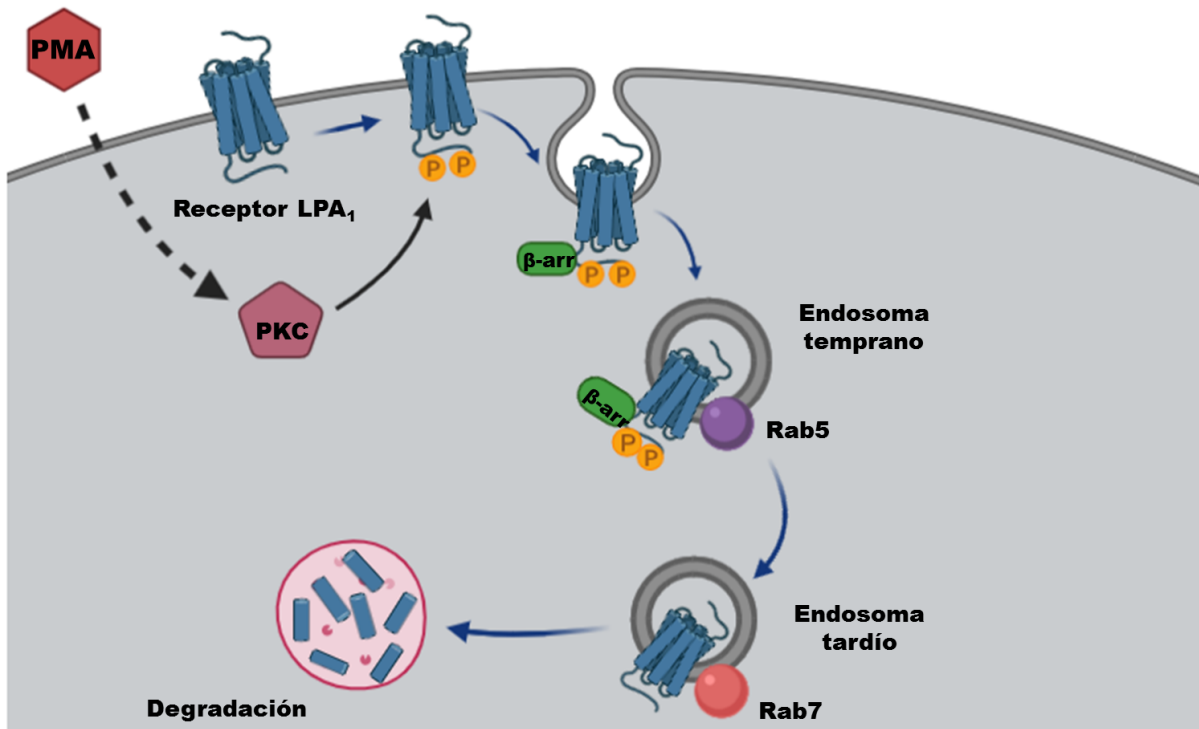
Asimismo, es un punto a considerar importante la asociación de los receptores con las  $\beta$ -arrestinas cuando son internalizados, ya que dependiendo de la estabilidad entre estas proteínas y los receptores, puede ser el destino de éstos, dividiéndose en GPCRs de Clase A o de Clase B. Por ejemplo, la asociación del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico con las  $\beta$ -arrestinas es transitoria (ya que se disocia en o cerca de la membrana plasmática) por lo que el receptor presenta un reciclaje rápido, en cambio, el receptor de vasopresina 2 tiene una asociación más estable con las  $\beta$ -arrestinas y se degrada. Es decir, una asociación transitoria (Clase A) favorece una rápida desfosforilación del receptor y consecuentemente su resensibilización, y por el contrario, una asociación estable (Clase B) (por su interacción iónica), retarda su desfosforilación y resensibilización. Así, la unión estable de  $\beta$ -arrestinas puede estimular la ubiquitinación del receptor y ser blanco de degradación (Hanlon y Andrew, 2015). Ésto se debe a la característica estructural del receptor, ya que la estabilidad de este complejo (GPCR/ $\beta$ -arrestinas), se debe a conjuntos o *clusters* específicos de serina/treonina en el extremo C-terminal. Así que el comportamiento del receptor LPA<sub>1</sub> por desensibilización homóloga, sugiere que existe una asociación relativamente estable con las  $\beta$ -arrestinas, además de que en su extremo C-terminal contiene un *cluster* de serinas (a.a. 341-347), necesario para su endocitosis mediada por LPA; la endocitosis mediada por PMA, requiere un motivo dileucina independiente de

$\beta$ -arrestinas (Carmona-Rosas, et al., 2018; Luttrell y Lefkowitz, 2002; Oakley, et al., 2001; Urs, et al., 2008).

De modo que esto puede ser perceptible en las imágenes de microscopía confocal, ya que la membrana plasmática en las células que fueron estimuladas con LPA, en tiempos largos, es apreciable la fluorescencia delimitando a las células a pesar de la cantidad de vesículas intracelulares, en comparación cuando el receptor es fosforilado y activado por PKC, puesto que, aunque la cantidad de vesículas intracelulares disminuye considerablemente, ya no se aprecia con claridad, la fluorescencia delimitando a las células. En ese sentido, con los datos obtenidos en este trabajo, se presenta un modelo del tráfico vesicular del receptor  $LPA_1$  con las proteínas Rab bajo los dos mecanismos de desensibilización (Figura 16 y 17, respectivamente).



**Figura 16. Modelo propuesto del tráfico vesicular del receptor  $LPA_1$  mediante desensibilización homóloga.** Los receptores por este tipo de desensibilización, se internalizan y se asocian a la proteína Rab5 y a la proteína Rab7 así como posteriormente con la proteína Rab9, sugiriendo que el receptor toma ambas rutas, la de degradación como reciclaje lento. Figura realizada con BioRender.com



**Figura 17. Modelo propuesto del tráfico vesicular del receptor LPA<sub>1</sub> mediante desensibilización heteróloga.** Los receptores por este tipo de desensibilización, se internalizan y se asocian a la proteína Rab5 en endosomas tempranos, y posteriormente se asocian con la proteína Rab7, tomando preferentemente la ruta de degradación. Figura realizada con BioRender.com

## 8. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo ayudan a explicar que, dependiendo el receptor y su tipo de activación, su internalización y señalización corriente abajo pueden ser diferentes, ya que el receptor LPA<sub>1</sub> no presenta la misma dinámica de asociación con las proteínas Rab estudiadas bajo los dos mecanismos de desensibilización. Tanto, durante la desensibilización homóloga como en la heteróloga el receptor se asocia con Rab5 y Rab7, pero no ocurre eso con Rab9, ya que sólo se observa su asociación con el receptor cuando es activado por su agonista.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Mediante microscopía confocal y la realización de ensayos de FRET, esclarecer el tráfico vesicular del receptor LPA<sub>1</sub> con respecto al reciclaje, tanto rápido como lento con las proteínas Rab4 y Rab11, respectivamente.
2. Realizar coimmunoprecipitaciones del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 al activar al receptor con LPA y PMA, para evaluar su posible asociación.
3. Mediante microscopía confocal y la realización de ensayos de FRET, estudiar el papel de GRK2, en la asociación del receptor LPA<sub>1</sub> con las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9, mediante la utilización de paroxetina.
4. Evaluar si realmente el receptor LPA<sub>1</sub> es reclutado a lisosomas.

## 10. REFERENCIAS

- Alberts, B., John, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2015) *Molecular biology of the cell*. Sixth Edition. New York. Garland Science.
- Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Campos-Martínez, G. A., Meizoso-Huesca, A., y García-Sáinz, J.A. (2015). Phosphorylation and Internalization of Lysophosphatidic Acid Receptors LPA1, LPA2, and LPA3. *Plos One*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0140583
- Avendaño-Vázquez, S. E., García-Caballero, A. y García-Sáinz, J. A. (2005). Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA<sub>1</sub>. *Biochem. J* 385: 667-684.
- Basith S., Cui M., Macalino SJY, Park J., Clavio NAB., Kang S. and Choi S. (2018). Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front. Pharmacol.* 9:128. doi: 10.3389/fphar.2018.00128
- Broussard, J. y Green, K. (2017). Research Techniques Made Simple: Methodology and Applications of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Journal Investigative Dermatology*, 137, e185-e191. doi: 10.1016/j.jid.2017.09.006
- Carmona-Rosas, G., Alcántara-Hernández, R., y Hernández-Espinosa, D. A. (2018). Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/ $\beta$ -arrestin/ERK1/2. *European Journal of Cell Biology*, 97(5) 345-358. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.04.001
- Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonso-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., y García-Sáinz, J. A. (2015).  $\alpha 1b$ -Adrenergic Receptors Differentially Associate with Rab Proteins during Homologous and Heterologous Desensitization. *Plos One*, 10(3), doi: 10.1371/journal.pone.0121165
- Culhane, KJ., Liu, Y., Cai, Y. and Yan, ECY. (2015). Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Front. Pharmacol.* 6:264. doi: 10.3389/fphar.2015.00264
- Cullen, P., y Steinberg, F. (2018). To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Molecular Cell Biology*. Volumen 19. doi: 10.1038/s41580-018-0053-7
- Cvacek, V., Goddard III, W. y Abrol, R. (2016). Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications. *PLoS Comput Biol* 12(3): e1004805. doi:10.1371/journal.pcbi.1004805
- Davies, M., Secker, A., Freitas, A., Mendao, M., Timmis, J. y Flower, D. (2007). On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics*. 3113–3118. doi:10.1093/bioinformatics/btm506
- de Oliveira, PG., Ramos, MLS., Amaro, AL., Dias RA. y Vieira, SI., (2019). Gi/o-Protein Coupled Receptors in the Aging Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 11:89. doi: 10.3389/fnagi.2019.00089



- Dores, M. y Trejo, J. (2018). Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors by ubiquitin: Diverse pathways for G-protein-coupled receptor destruction and beyond. *Traffic*, 20:101–109. doi: 10.1111/tra.12619
- Dores, M. y Trejo, J. (2012). Ubiquitination of G Protein-Coupled Receptors: Functional Implications and Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*. 82:563-570. doi: 10.1124/mol.112.079418
- Gainetdinov, R., Premont, R., Bohn, L., Lefkowitz, R. y Caron, M. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:107–44. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206
- García-Sáinz, J.A. (2016). *Hormonas. Mensajeros químicos y comunicación celular*. FCE, SEP, CONACyT.
- Goel, G., Makkar, H., y Becker, K. (2007). Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. *International Journal of Toxicology*, 26:279–288. doi: 10.1080/10915810701464641
- Gonzalez-Gaitan, M. (2009). The Garden of Forking Paths: Recycling, Signaling, and Degradation. *Developmental Cell*, 15, 172-174. doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.001
- González-Gil, I., Zian, D., Vázquez-Villa, H., Ortega-Gutiérrez, S. y López-Rodríguez, M. L. (2015). The status of lysophosphatidic acid type 1 (LPA1) *MedChemComm*, 6(1), 13-23. doi: 10.1039/c4md00333k
- Guerra, F., y Gucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*. 5, 34. doi:10.3390/cells5030034
- Hanlon, C. y Andrew, D. (2015). Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *Journal of Cell Science*. 128, 3533-3542. doi: 10.1242/jcs.175158
- Hanyaloglu, A. y von Zastrow, M. (2008). Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:537–68. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094830
- Hernández-Méndez, A., Alcántara-Hernández, R., y García-Sáinz, JA. (2014). Lysophosphatidic acid LPA1-3 receptors: signaling, regulation and in silico analysis of their putative phosphorylation sites. *Receptors and Clinical Investigation*, doi: 10.14800/rci.193
- Hilger, D., Masureel, M. y Kobilka, B. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 25, 4-12. doi: 10.1038/s41594-017-0011-7
- Hollmann, M., Strumper, D., Herroeder, S. y Durieux, M. (2005). Receptors, G Proteins, and Their Interactions. *Anesthesiology*, 103:1066–78.
- Jean-Alphonse, F. y Hanyaloglu, A.C. (2009). Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 331, 205-214. doi: 10.1016/j.mce.2010.07.010

- Kamato, D., Thach, L., Bernard, R., Chan, V., Zheng, W., Kaur, H., Brimble, M., Osman, N., y Little, P. (2015). Structure, function, pharmacology, and therapeutic potential of the G protein  $G\alpha_{q11}$ . *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. doi: 10.3389/fcvm.2015.00014
- Klaasse, E. C., Ijzerman, A. P., Grip, W. J., y Beukers, M. W. (2007). Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signalling*, 4(1), 21-37. doi:1007/s11302-007-9086-7
- Kramer, I. (2015) Signal Transduction. Third edition. ELSEVIER.
- Krishnan, A., Almén, MS, Fredriksson, R., Schiöth, HB. (2012). The Origin of GPCRs: Identification of Mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in Fungi. *PLoS ONE* 7(1):e29817. doi:10.1371/journal.pone.0029817
- Latorraca, N., Venkatakrisnan, A. J., Dror, R. (2016). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *American Chemical Society*, 117, 139-155. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177
- Lee, J., Kim, D., Sin Oh, Y., y Jun, H. (2019). Lysophosphatidic Acid Signaling in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 2850. doi:10.3390/ijms20112850
- Luttrell, L. y Lefkowitz, R. (2002). The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Sciences*. 115, 455-465
- Magalhaes, A. C., Dunn, H., y Ferguson, S. S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1717-1736. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x
- Malerba, N., Nittis, P. D., y Merla, G. (2019). The emerging Role of  $G\beta$  Subunits in Human Genetic Diseases. *Cells*, 8(12), 1567. doi:10.3390/cells8121567
- Martínez-Morales, J.C., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G., García-Sáinz, J.A. (2018). S1P1 receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: effects of sphingosine1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine. *Bioscience Reports*. 38 BSR20181612.
- Meizoso-Huesca, A., Villegas-Comonfort, S., Romero-Ávila, M.T., García-Sáinz, J.A. (2018). Free fatty acid receptor 4 agonists induce lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA<sub>1</sub>) desensitization independent of LPA<sub>1</sub> internalization and heterodimerization. *Federation of European Biochemical Societies*. 592, 2612–2623. doi:10.1002/1873-3468.13179
- Murph, M., Scaccia, L., Volpicelli, L., Radhakrishna, H. (2003). Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA<sub>1</sub>/EDG-2 receptors via a dynamin2-and Rab5-dependent pathway. *Journal of Cell Science*. 116, 1969-1980. doi: 10.1242/jcs.00397
- Oakley, R., Laporte, S., Holt, J., Barak, L. y Caron, M. (2001). Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein- coupled Receptor Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 22, 19452-19460. doi: 10.1074/jbc.M101450200

- Park, H. (2013). Structural Basis of Membrane Trafficking by Rab Family Small G Protein. *International Journal of Molecular Science*, 14(5), 8912-8923. doi: 10.3390/ijms14058912
- Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, M. y Houdusse, A. (2017). Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. *SMALL GTPASES*. 1–2, 22–48. doi:10.1080/21541248.2017.1336191
- Rajagopal, S. y Shenoy, S. (2018). GPCR Desensitization: Acute and Prolonged Phases. *Cell Signal*. 41: 9–16. doi:10.1016/j.cellsig.2017.01.024
- Rajagopal, S., Rajagopal, K. y Lefkowitz, R. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (5), 373–386. doi:10.1038/nrd3024.
- Riaz, A., Huang, Y., Johansson, S. (2015). G-Protein-Coupled Lysophosphatidic Acid Receptors and Their Regulation of AKT Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 215. doi:10.3390/ijms17020215
- Rosenfeld, J., Knoll, B. y Moore, R. (2002). Regulation of G-Protein-Coupled Receptor Activity by Rab GTPases. *Receptors and Channels*, 8:87–97. doi: 0.1080/10606820290005029
- Schiöth, HB. y Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology* 142 94–101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018
- Skieterska, K., Rondou, P. y Van Craenenbroeck, K. (2017). Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 923. doi: 10.3390/ijms18050923
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513-525, doi: 10.1038/nrm2728
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., y Huang, X. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Function of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3850-3868. doi: 10.1016/j.mb.2016.08.002
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 4:10, 942-947.
- Tuvim, M., Adachi, R., Hoffenberg, S., y Dickey, B. (2001). Traffic control: Rab GTPases and the Regulation of Interorganellar Transport. *News in Physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 16, 56-61. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16
- Urs, N., Kowalczyk, A., Radhakrishna, H. (2008). Different mechanism regulate lysophosphatidic acid-dependent versus-phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 283, 5249-5257. doi: 10.1074/jbc.M710003200
- Valdés-Rives, S. y González-Arenas, A. (2017). Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2017/9173090

- Vázquez-Prado, J., Casas-González, P. y García-Sáinz, J. A. (2002). G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cellular Signalling*, 15, 549–557. doi: 10.1016/S0898-6568(02)00151-1
- Wandinger-Ness, A., y Zerial, M. (2014). Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(11). doi: 10.1101/cshperspect.a022616
- Wittinghofer, A. (2014). *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 2.* Alemania. Springer.
- Xiang, H., Lu, Y., Shao, M. y Wu, T. (2020). Lysophosphatidic Acid Receptors: Biochemical and Clinical Implications in Different Diseases. *Journal of Cancer*. 11(12): 3519-3535. doi: 10.7150/jca.41841
- Yu, S., Sun, L., Jiao, Y. y Lee, LTP. (2018). The Role of G Protein-coupled Receptor Kinases in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 14(2): 189-203. doi: 10.7150/ijbs.22896
- Yung Y. C., Stoddard, N. C., y Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology, *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1192-1214, doi: 10.1194/jlr.r046458
- Zhang, X., y Kim, K. (2017). Multifactorial Regulation of G Protein-Coupled Receptor Endocytosis. *Biomolecules & Therapeutics*, 25(1) 26-46, doi: 10.4062/biomolther.2016.186
- Zhao, J., Wei, J., Dong, S., Bowser, R., Zhang, L., Jacko, A., y Zhao, Y. (2016). Destabilization of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 Reduces Cytokine Release and Protects Against Lung Injury. *EBioMedicine*. 10 195-203- doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.020
- Zhen, Y., y Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(17), 3171-3176. doi:10.1242/jcs.166074