



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EFECTO DEL ACIDO LISOFOSFÁTICO
SOBRE LAS CÉLULAS U87-MG Y SU
MODULACIÓN POR LA PROTEÍNA CINASA C**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

GABRIEL CARMONA ROSAS

TUTOR:

DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ



2014



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y con el apoyo de la Dra. María Teresa Romero Ávila en el laboratorio 303 Sur del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM.

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 177556 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo No. 200812 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM)

Gabriel Carmona Rosas fue apoyado por una beca DGAPA.

IF

If you can keep your head when all about you
Are losing theirs and blaming it on you;

If you can trust yourself when all men doubt you,
But make allowance for their doubting too;

If you can wait and not be tired by waiting,
Or, being lied about, don't deal in lies,
Or, being hated, don't give way to hating,
And yet don't look too good, nor talk too wise;

If you can dream—and not make dreams your master;
If you can think—and not make thoughts your aim;
If you can meet with triumph and disaster
And treat those two imposters just the same;
If you can bear to hear the truth you've spoken
Twisted by knaves to make a trap for fools,
Or watch the things you gave your life to broken,
And stoop and build 'em up with wornout tools;

If you can make one heap of all your winnings
And risk it on one turn of pitch-and-toss,
And lose, and start again at your beginnings
And never breathe a word about your loss;
If you can force your heart and nerve and sinew
To serve your turn long after they are gone,
And so hold on when there is nothing in you
Except the Will which says to them: "Hold on";

If you can talk with crowds and keep your virtue,
Or walk with kings—nor lose the common touch;
If neither foes nor loving friends can hurt you;
If all men count with you, but none too much;
If you can fill the unforgiving minute
With sixty seconds' worth of distance run

Yours is the Earth and everything that's in it,

And—which is more—you'll be a Man my son!

Rudyard Kipling (1896)

Dedicatoria

A mi madre: quien ha sido un ejemplo de lucha, trabajo, honestidad y sabiduría durante tantos años. Por haberme brindado las oportunidades que necesite para salir adelante desde muy pequeño y hasta el día de hoy. Sobran palabras para agradecerle el inmenso trabajo y esfuerzo que ha hecho para formar y unir a una familia que pese a todo, logra salir adelante mediante el trabajo, la constancia y la dedicación que solo ella pudo habernos enseñado desde muy pequeños.

A mi padre: quien siempre dedico una gran parte de su vida a mi crecimiento y desarrollo como ser humano y como estudiante. Por aquellos esfuerzos y luchas que ha hecho para brindarme las oportunidades y los recursos que he necesitado para salir adelante. Porque me hizo dueño de sus fines de semana durante mi niñez y por que bajo su silencio verbal, siempre ha estado atento y orgulloso de mí y de lo que venga después.

Mil gracias no son suficientes para los dos. Solo puedo seguir trabajando y llenarlos de orgullos y alegrías conforme la vida y los años pasen. Afortunado soy por contar con ellos de forma incondicional, pero sobre todo, de poder darles un poco de lo mucho que me han dado. De ambos, he aprendido y adquirido el valor del trabajo, la constancia y la entrega del día a día, gracias a lo cual, este tesis es posible.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz: por haberme dado la oportunidad de trabajar y formarme en su laboratorio durante todo este tiempo. Le estoy muy agradecido por haber confiado en mí y darme una oportunidad para iniciarme en la investigación Biomédica desde el primer momento en que tuve el honor de conocerlo. Es difícil encontrar académicos dispuestos a ayudar a los estudiantes sin esperar nada a cambio más que el progreso y la formación de los mismos, afortunadamente, tuve la oportunidad de contar con el apoyo del Dr. en todo momento para seguir adelante con mi formación académica, por lo cual le estoy profunda e infinitamente agradecido.

A la Dra. María Teresa Romero Ávila: por haber sido mi maestra y guía durante mi estancia en el laboratorio. Le estoy muy agradecido por su paciencia, apoyo, enseñanza, confianza y amistad, pero sobre todo, por compartirme y brindarme un espacio de trabajo dentro del laboratorio para poder realizar esta tesis. Estoy seguro que en ningún otro lado podría haber encontrado a una investigadora tan profesional y dedicada como la Dra., lo cual me deja una profunda y sabia enseñanza en lo profesional y en lo académico.

A mis compañeros del laboratorio: que desde el primer día en que puse un pie en el laboratorio, me hicieron sentir bienvenido y conté con su apoyo en todo momento durante mi formación y realización de esta tesis. Les agradezco por haberme recibido de la manera en que lo hicieron, lo cual me dio la confianza de trabajar y aprender de cada uno de ellos en muchos aspectos: Jean, Aurelio, Omar, Marco Morquecho, Marco Alfonso, Carla, Germán, Silvana, Sócrates, Gisselle, Roció y Lupita.

A mis amigos de la Facultad de Psicología: con los que tuve la oportunidad de haber compartido risas, tristezas, frustraciones, enojos, alegrías, sueños, aspiraciones y secretos por mucho tiempo: Ely, Grecia, Oscar, Jorge, Irving, Karina, Ingrid, Gaby, Anahí, Jazmín, Jenny, Nubia y los que falten.

A mis viejos amigos del Karate: a los que tengo la oportunidad de conocer desde hace muchos años y recordar buenos tiempos, así como desahogar frustraciones mientras nos atascamos de pizza y refresco: David “el Errol”, Lucy, Gustavo “el Udsiro”, Agustín “el Ñe” y Ángel “El Hulk”.

Resumen.....	I
Lista de abreviaturas.....	II
Lista de figuras y tablas.....	III
Introducción	
I. Comunicación celular	
Generalidades.....	2
II. Los lisofosfolípidos	
Generalidades.....	5
III. Acido Lisofosfatídico (LPA)	
Generalidades.....	5
Síntesis y metabolismo del LPA.....	6
IV. Receptores acoplados a proteínas G (GPCR's)	
Generalidades.....	8
Proteínas G.....	9
Efectores de las proteínas G.....	10
V. Mecanismo de regulación de los GPCR's	
Desensibilización.....	13
Fosforilación.....	13
Internalización.....	14
VI. Proteína Cinasa C (PKC)	
Generalidades.....	15
Isoformas.....	15
Estructura.....	16
VII. Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK's)	
Generalidades.....	17
Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK).....	17
VIII. Efectos Biológicos del LPA en el Sistema Nervioso	
Generalidades.....	18
Efectos del LPA sobre el SN.....	18
LPA y sus receptores en el Sistema Nervioso.....	19
Efectos conductuales y cognitivos.....	24

Antecedentes

IX. Efectos del LPA sobre cultivos de células nerviosas	
Generalidades.....	27
X. Efecto del LPA sobre la línea celular U87-MG	
Generalidades.....	28

Justificación y Objetivos

Justificación.....	30
Objetivo general.....	31
Objetivos experimentales.....	31

Material y Metodología

Material.....	33
Método.....	34

Resultados

I. Medición de Ca^{2+} intracelular.....	37
II. Análisis microscópico.....	49
III. Activación de ERK 1/2.....	53

Discusión

Introducción.....	57
Modulación de los GPCR's para LPA por la PKC.....	57
Expresión y participación de los receptores LPA_1 y LPA_3 en la señalización y movilización de Ca^{2+} intracelular.....	59
Efecto de la toxina pertussis sobre el proceso señalización intracelular.....	60
Efecto del LPA sobre la estructura y tamaño de las células...61	
Activación de ERK 1/2 por LPA.....	63

Perspectivas y modelos en Neurociencias

Generalidades.....	67
Relevancia del LPA y el Ca^{2+} en procesos neuronales.....	69

Referencias.....	72
------------------	----

Resumen

El ácido lisofosfatídico (1-acil-2sn-glicerol-3-fosfato) es un fosfolípido bioactivo que actúa como hormona local, autacoide y factor de crecimiento induciendo una variedad de acciones en la mayoría de las células del organismo. Estas acciones incluyen la migración celular, proliferación y supervivencia, inducción en la transcripción de genes, agregación plaquetaria, contracción del músculo liso, mielinización, liberación de neurotransmisores, reorganización del citoesqueleto durante la formación de las fibras de estrés, establecimiento de adhesiones locales, retracción de dendritas, redondeo celular, entre otras.

Los datos presentados en esta tesis muestran los efectos que el LPA genera sobre la línea celular de origen neural U87-MG, la cual no había sido estudiada anteriormente con estos propósitos. Se logró determinar la posible expresión de al menos dos GPCR's para el LPA mediante el uso de agonistas y antagonistas; LPA₁ y LPA₃. Igualmente, fue posible determinar la participación de las isoformas α y β de la PKC en la regulación de estos dos receptores. Por otro lado, el uso de la toxina pertussis permitió conocer el tipo de proteína G a la cual estos GPCR's se encuentran acoplados, observándose una clara participación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ en el proceso de señalización intracelular.

El análisis microscópico mostro una disminución en el tamaño y estructura de las células cuando estas eran estimuladas con LPA durante 1 hora. Sin embargo, también fue posible observar efectos importantes sobre las células causados por el uso del antagonista Ki16425 selectivo para LPA₁ y LPA₃, rompiendo, al menos en esta investigación, con la visión tradicional de la función de este antagonista.

Finalmente, el LPA fue capaz de activar la vía de señalización ERK 1/2, sin embargo, el antagonista Ki16425 tuvo los mismos efectos sobre esta vía, aunque en menor magnitud.

Esta serie de resultados forman parte de un creciente número de reportes que indican la participación del LPA en numerosos procesos neuronales, los cuales tienen repercusiones importantes sobre funciones neurofisiológicas, mismas que controlan procesos cognitivos y conductuales tan importantes como el aprendizaje y la memoria.

Lista de abreviaturas

Ingles

GPCR's: G-protein coupled receptors
ERK: Extracellular-signal-regulated kinases
IP3: Inositol trisphosphate
PKC: Protein kinase C
cPKC: Conventional PKC
nPKC: Novel PKC
aPKC: Atypical PKC
AC: Adenylate ciclase
cAMP: Cyclic adenosine monophosphate
PTX: Pertussis toxin
Ca²⁺: Calcium
LP's: Lysophospholipids
LPA: Lysophosphatidic acid
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PLC: Phospholipase c
SN: Nervous system
BIM-1: Bisindolylmaleimide I
Rot: Rottlerin
Hisp: Hispidin

Español

GPCR's: Receptores acoplados a proteínas G
ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares
IP3: Inositol trifosfato
PKC: Proteína cinasa C
cPKC: PKC convencionales
nPKC: PKC nuevas
aPKC: PKC atípicas
AC: Adenilato ciclasa
cAMP: Adeosín monofosfato cíclico
PTX: Toxina pertussis
Ca²⁺: Calcio
LP's: Lisofosfolípidos
LPA: Acido lisofosfatídico
PMA: Forbol 12-miristato 14-acetato
PLC: Fosfolipasa C
SN: Sistema nervioso
BIM-1: Bisindolilmaleimida I
Rot: Rotelina
Hisp: Hispidina

Lista de figuras y tablas:

Introducción:

Fig. 1.1. Tipos de comunicación celular

Fig. 3.1. Molécula del LPA

Fig. 3.2. Vías de síntesis y degradación del LPA

Fig. 4.1. Modelo y estructura de los GPCR's

Fig. 4.2. Efectores y vías de señalización de los GPCR's

Fig. 5.1. Internalización de los GPCR's

Fig. 6.1. Estructura e isoformas de las PKC

Tabla 1: Características de los receptores de LPA

Tabla 2: Patrón de expresión de los receptores de LPA en células nerviosas

Resultados:

Fig. 1. Efecto del LPA sobre las células U87-MG

Fig. 2. Efecto del LPA sobre las células U87-MG incubadas con PMA

Fig. 3. Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por LPA

Fig. 4. Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por bradicinina

Fig. 5. Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por LPA con PMA over-night

Fig. 6. Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por acción de los inhibidores de la PKC

Fig. 7. Curva dosis-respuesta para el agonista selectivo (2S) OMPT

Fig. 8. Curva dosis-respuesta para el antagonista selectivo Ki16425

Fig. 9. Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por PTX y LPA

Fig. 10. Estimulación de las células con LPA

Fig. 11. Incubación de las células con Ki16425 y estimuladas con LPA

III

Fig. 12. Estimulación de las células con Ki16425

Fig. 13. Activación de ERK por LPA y Ki16425

Discusión:

Fig. 1. Modelo de activación y acción de la PKC por PMA en los GPCR's para LPA en la línea celular U87-MG

Fig. 2. Efecto de la toxina pertussis sobre el proceso de señalización intracelular

Fig. 3. Efecto del antagonista Ki16425 en DMSO-10%

Fig. 4. Representación esquemática del mecanismo por el cual la movilización de Ca^{2+} intracelular activa la cascada de ERK 1/2

Perspectivas y modelos en Neurociencias:

Fig. 1. Niveles de estudio e investigación en las neurociencias

INTRODUCCIÓN

I. Comunicación celular

Generalidades:

La coordinación de las diversas actividades fisiológicas a lo largo del cuerpo para llevar a cabo el sustento de la vida y otras respuestas deseadas depende de la habilidad de las células para comunicarse. Dicha capacidad depende de una amplia variedad de elementos importantes y de la coordinación de las células para transmitir las señales y mensajes apropiados (Eguiagaray, J. G. et. al. 2004).

La comunicación celular puede ocurrir por medio de dos sistemas distintos (Fig. 1.1): El primero de ellos es la comunicación directa, la cual implica el contacto físico entre células que interactúan a través de dos procesos:

- Comunicación por medio de uniones comunicantes “gap”: Por medio de estas uniones, las células son capaces de intercambiar iones y moléculas pequeñas sin entrar en contacto con el fluido extracelular.
- Comunicación a través de la unión directa y transitoria de marcadores de superficie: El mejor ejemplo de este tipo de comunicación son algunas células del sistema inmune, las cuales poseen marcadores especializados en la membrana celular que les permiten unirse a otras células que poseen marcadores compatibles para interacciones transitorias. De esta forma, las células del sistema inmune reconocen y destruyen específicamente a las células indeseables sin afectar a las células sanas, permitiendo el correcto funcionamiento de todo el organismo (Sherwood, 2011).

El segundo sistema es la comunicación indirecta, la cual involucra la participación de mensajeros químicos extracelulares o moléculas de señalización. Esto permite clasificar a este tipo de comunicación en cuatro formas distintas: comunicación paracrina, comunicación por neurotransmisores, hormonas y neurohormonas. En cada caso, un mensajero químico específico, es decir, la molécula señalizadora, se sintetiza por células de control especializadas con un propósito determinado. Al ser liberado al espacio extracelular con el estímulo apropiado, este mensajero actúa sobre otras células, llamadas células blanco. Para lograr este efecto, dicho mensajero extracelular debe unirse con los receptores de las células blanco que sean específicos para este mensajero. Una célula puede tener miles o hasta millones de receptores, que pueden ser para el mismo mensajero. Diferentes tipos de células

tienen distintas combinaciones de receptores, permitiéndoles unirse individualmente a diversos mensajeros extracelulares reguladores (Chaban, Cho, Reid, & Norris, 2013).

Los cuatro tipos de mensajeros químicos que se unen a estos receptores y que participan en la comunicación celular indirecta difieren en su fuente, distancia, así como en los medios por los cuales llegan a su destino:

- **Comunicación paracrina:** Una sustancia paracrina es un mensajero local cuyos efectos repercuten solo en las células vecinas ubicadas en el ambiente inmediato del sitio de secreción. Debido a que las sustancias paracrinas se distribuyen por medio de difusión simple a través del líquido intersticial, su acción está restringida únicamente a distancias cortas (Sherwood, 2011).
- **Comunicación por neurotransmisores:** Las neuronas se comunican directamente con las células que inervan (células blanco) mediante la liberación de neurotransmisores, los cuales son mensajeros químicos de muy corto rango en respuesta a señales eléctricas (potenciales de acción). Al igual que las sustancias paracrinas, los neurotransmisores se difunden en su sitio de liberación para actuar localmente sobre una célula blanco inmediata, la cual puede ser otra neurona, un músculo o una glándula. Las propias neuronas pueden transmitir señales eléctricas a través de grandes distancias (dependiente de la longitud del axón), pero el mensajero químico liberado en la terminal axónica actúa en una distancia corta justo a través de la hendidura sináptica (Eguiagaray, J. G. et. al. 2004).
- **Comunicación por hormonas:** Las hormonas son mensajeros químicos de amplio rango secretadas hacia la sangre específicamente por glándulas endocrinas en respuesta a una señal determinada. La sangre las transporta a otro sitio del cuerpo donde provocan un efecto sobre las células blanco que se encuentran lejos del sitio donde fueron liberadas.
- **Comunicación por neurohormonas:** Las neurohormonas son hormonas liberadas en el torrente sanguíneo por neuronas secretoras. Como las neuronas ordinarias, las neuronas secretoras pueden conducir y responder a señales eléctricas. En vez de inervar directamente a las células blanco, una neurona secretora bajo un estímulo determinado libera un mensajero químico, una neurohormona, hacia la sangre. Posteriormente, esta se distribuye hacia las células blanco distantes a través del torrente sanguíneo.

En todos los casos previamente mencionados, los mensajeros químicos se liberan de un tipo de célula e interactúan con otras células blanco en busca de un efecto determinado. Esta coordinación en la comunicación de las células le permite al organismo llevar a cabo sus funciones de forma adecuada, ya que sin este proceso, la homeostasis se vería profundamente afectada, llevando a fallas o deficiencias importantes en el organismo completo (Sherwood, 2011).

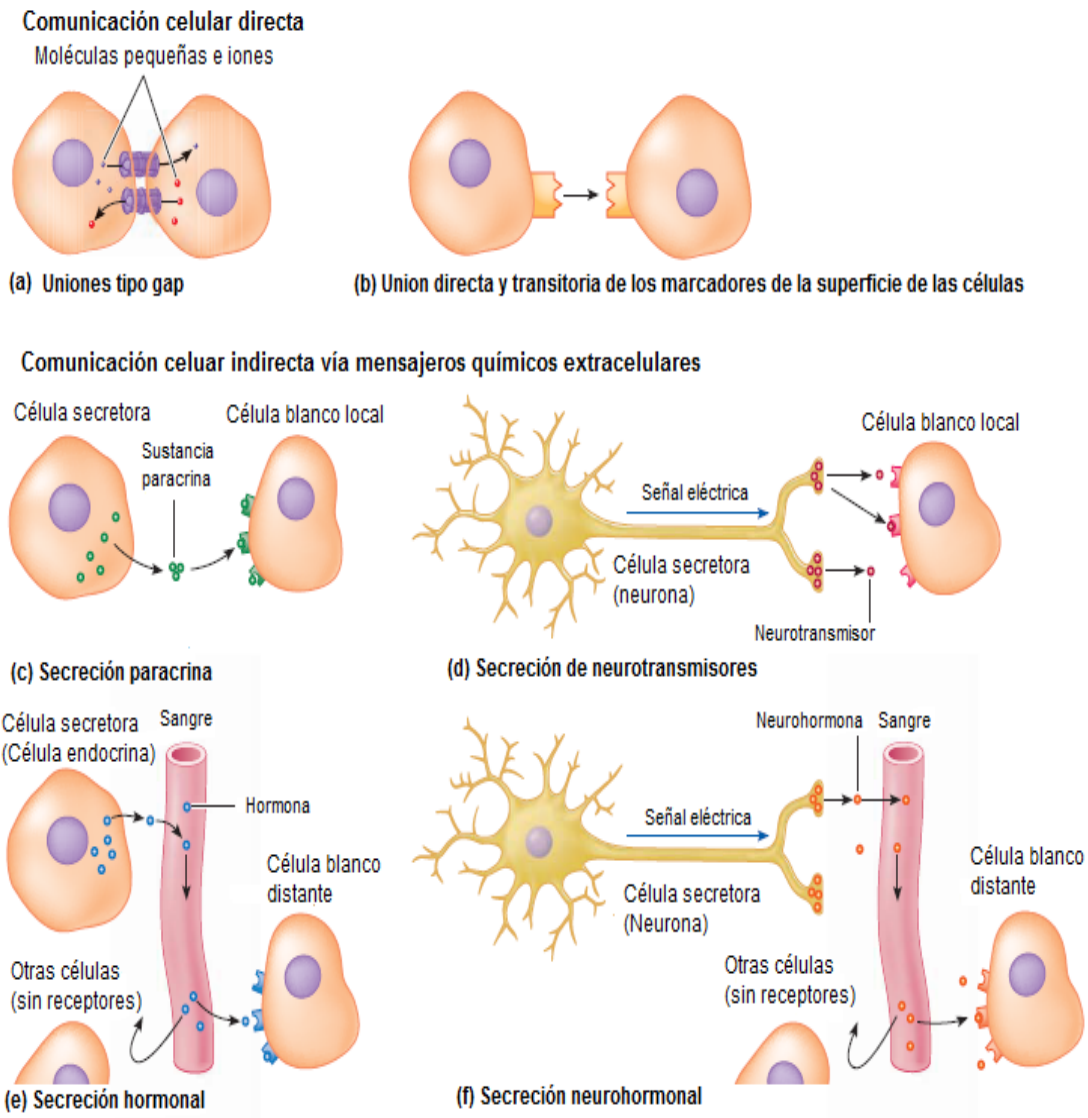


Figura 1.1. Tipos de comunicación celular: Las uniones tipo gap (a) y las uniones transitorias de las células por medio de marcadores complementarios (b) son caminos de comunicación directa entre las células. Las sustancias paracrinas (c), los neurotransmisores (d), las hormonas (e) y las neurohormonas (f) son mensajeros químicos extracelulares que completan la comunicación indirecta entre las células. Estos mensajeros químicos difieren en el origen y la distancia a la que viajan para encontrar sus células blanco.

II. Los lisofosfolípidos

Generalidades:

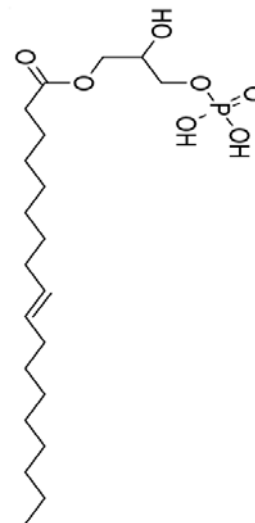
Los lisofosfolípidos (LP's) son una larga familia de moléculas que se derivan de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Anteriormente se pensaba que eran simples compuestos inertes, hoy es claro que un número importante de especies de LP's tienen propiedades de señalización esenciales que regulan el desarrollo así como múltiples procesos celulares. Estos efectos son mediados por una amplia familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR's).

Los receptores para los LP's están presentes en la mayoría de los tejidos, dichos receptores pueden estar acoplados a diferentes proteínas G tales como G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$, dependiendo de la especie y tipo de célula. Esto le permite a los LP's explotar una variedad de efectos mediadores a través de diversos mensajeros tales como la proteína cinasa C, la adenilato ciclasa así como la vía de señalización Rho para elicitar diversas respuestas celulares (Herr & Chun, 2007). Gran parte de las respuestas biológicas generadas por los LP's están asociadas al ácido lisofosfatídico (LPA), un LP importante en el organismo, el cual está atribuido a señalar a través de GPCR's específicos (Anliker & Chun, 2004).

III. Ácido Lisofosfatídico (LPA)

Generalidades:

El ácido lisofosfatídico (1-acil-2sn-glicerol-3-fosfato) es un fosfolípido bioactivo que actúa como hormona local, autacoide y factor de crecimiento induciendo una variedad de acciones en la mayoría de las células del organismo (Fig. 3.1). Estas acciones incluyen la migración celular, proliferación y supervivencia, inducción en la transcripción de genes, agregación plaquetaria, contracción del músculo liso, mielinización, liberación de neurotransmisores, reorganización del citoesqueleto durante la formación de la fibras de estrés, establecimiento de adhesiones locales, retracción de dendritas, redondeo celular, entre otras (Avandaño, Cabrera, Colín, & García, 2007). Por otro lado, a nivel de los receptores para este compuesto, los ratones



knockout han revelado roles fisiológicos y patológicos importantes en la señalización del LPA como el desarrollo cerebral, el dolor neuropático, entre otros, abriendo la posibilidad de importantes implicaciones fisiológicas debido a alteraciones en los niveles tanto del compuesto como de sus receptores (Noguchi, Herr, Mutoh, & Chun, 2009).

Síntesis y metabolismo del LPA:

El LPA es un fosfolípido simple que consiste en una columna de glicerol con un grupo hidroxilo en la posición sn-2 (o sn-1), un grupo fosfato en la posición sn-3 y una cadena de ácido graso en la posición sn-1 (o sn-2). La mayoría de los ácidos grasos del LPA son cadenas largas saturadas (C18, C16) o insaturadas (18:1, 20:4) unidas a la columna de glicerol por un grupo acilo (Pagès, Simon, Valet, & Saulnier, 2001).

Los mecanismos moleculares que llevan a la síntesis y degradación del LPA se pueden describir en tres vías (Fig. 3.2):

El LPA puede ser producido por medio de varios precursores, incluyendo el glicerol-3-fosfato (G3P), el ácido fosfatídico (PA), así como varios lisofosfolípidos. La primera vía de síntesis del LPA es a través de la acilación del G3P por acción del glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT); este fenómeno toma lugar en el retículo endoplasmático. La segunda vía de síntesis ocurre debido a la acción de la lisofosfolipasa D-autotaxina (LysoPLD), la cual hidroliza a varios lisofosfolípidos como la lisofosfatidilcolina (LPC), la lisofosfatidiletanolamina (LPE) y la lisofosfatidilserina (LPS). Por último, el LPA puede ser sintetizado extracelularmente a través de la desacilación del PA por la fosfolipasa A1 (PLA₁) o la fosfolipasa A2 (PLA₂) (Frisca, F., Sabbadini, R., Goldshmit, Y. & Pébay, A. 2012).

Por otro lado, la degradación del LPA es un proceso que aún no se termina por comprender; sin embargo, dicho proceso puede ser descrito en tres vías:

La primera vía de degradación del LPA ocurre a través de la acción de la LPA-aciltransferasa (LPAAT), cuya actividad está bajo control de la proteína cinasa dependiente del cAMP (PKA). La LPAAT es capaz de convertir el LPA en PA rápidamente. La segunda vía de degradación ocurre a través de la acción de la fosfatidato fosfohidrolasa (PAP) y del lípido fosfato fosfohidrolasa-1 (LPP1), los cuales hidrolizan el LPA, convirtiéndolo en monacilglicerol (MAG) o en diacilglicerol (DAG). Esta medida permite atenuar el efecto del LPA que se encuentra a nivel extracelular

sobre la activación de los GPCR's. Finalmente, la tercera vía de degradación ocurre mediante la hidrólisis del LPA para ser convertido en G3P por acción de las lisofosfolipasas. Aunque existen diversos tipos de lisofosfolipasas, una lisofosfolipasa específica que actúa sobre el LPA ha sido purificada de cerebros de rata, misma que puede tener una importante función sobre el control de la disponibilidad del LPA en el organismo (Pagès, Simon, Valet, & Saulnier, 2001).

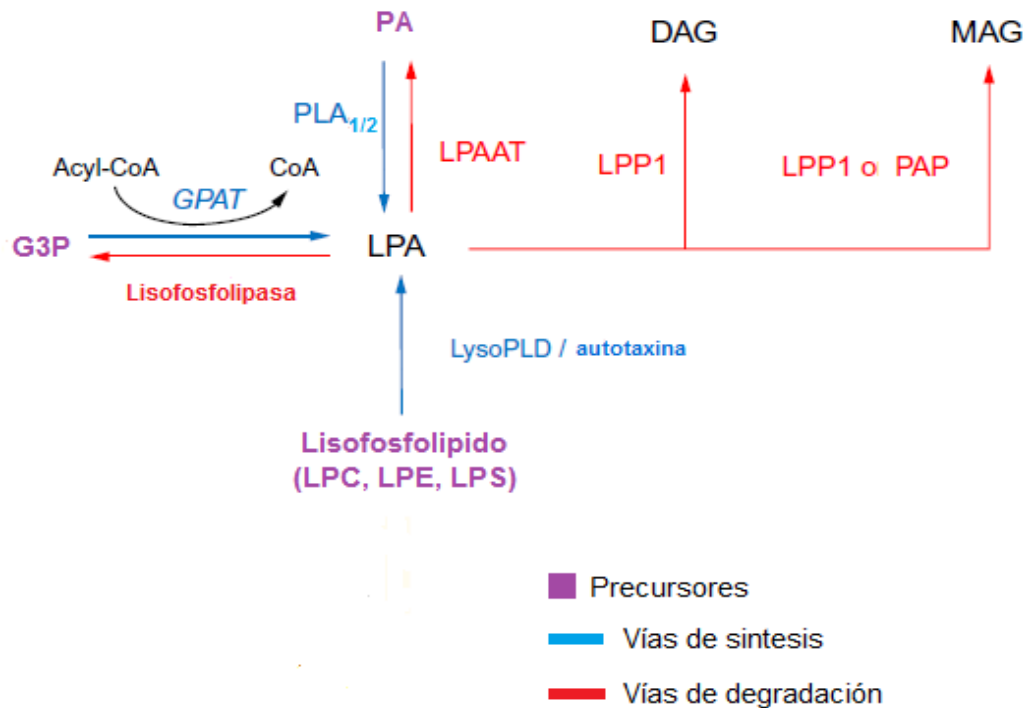


Figura 3.2. Vías de síntesis y degradación del LPA: En morado se muestran los precursoros principales para la producción del LPA. Mientras que en azul se muestran las vías de síntesis y en rojo las vías de degradación.

IV. Receptores acoplados a proteínas G (GPCR's)

Generalidades:

Los organismos complejos requieren de una sofisticada red de comunicación para mantener la homeostasis. Las células de diferentes partes del cuerpo se comunican usando mensajeros químicos en forma de hormonas y neurotransmisores. Las células procesan información codificada en estos mensajeros químicos usando GPCR's, los cuales están localizados en la membrana plasmática (Kobilka, B., 2013). Hay más de 1000 genes que codifican para estos receptores (Lefkowitz, 2004), lo cual representa aproximadamente el 4% total del genoma humano (O'Hayre et al., 2013) y más de 1000 diferentes miembros de esta súper familia de proteínas en todo el cuerpo (Gether, 2000). Numerosas enfermedades y desordenes han sido asociados a la mutaciones y polimorfismos en los GPCR's, haciéndolos blancos de un gran número de agentes terapéuticos, los cuales representan aproximadamente el 50% de los medicamentos modernos (George, O'Dowd, & Lee, 2002).

Basados en la similitud de su estructura, los GPCR's se pueden clasificar en 5 familias. 1) La familia de la rodopsina (con 701 miembros), 2) la familia de los receptores de adhesión (con 24 miembros), 3) la familia de los receptores glutamatérgicos (con 15 miembros), 4) la familia de los receptores para secretina (con 15 miembros) y 5) la familia de los receptores para la vía de señalización Wnt y la activación de la proteína Dishevelled (con 10 miembros) (Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., & Schiot, H. B., 2003).

Los GPCR's tienen una estructura muy particular (Fig. 4.1). Están constituidos por una cola de aminoácidos cuyo extremo amino se localiza en la porción extracelular, mientras que el extremo carboxilo se encuentra en el citoplasma. La cadena peptídica cruza la membrana plasmática siete veces, estas porciones transmembranales están unidas por tres azas intracelulares así como tres azas extracelulares (Sáinz, 2011). Los GPCR's comparten características estructurales comunes en los siete segmentos transmembranales, mientras que las estructuras más variables entre la familia de los GPCR's son el extremo carboxilo, las azas intracelulares TM5 y TM6 así como el extremo amino. La mayor diversidad es observada en el extremo amino, cuya secuencia es relativamente corta (10-50 aminoácidos) para los receptores de monoaminas y péptidos, y mucho más larga

(350-600 aminoácidos) para los receptores hormonales y glicoproteínas, así como para la familia de los receptores glutamatérgicos (B. K. Kobilka, 2007).

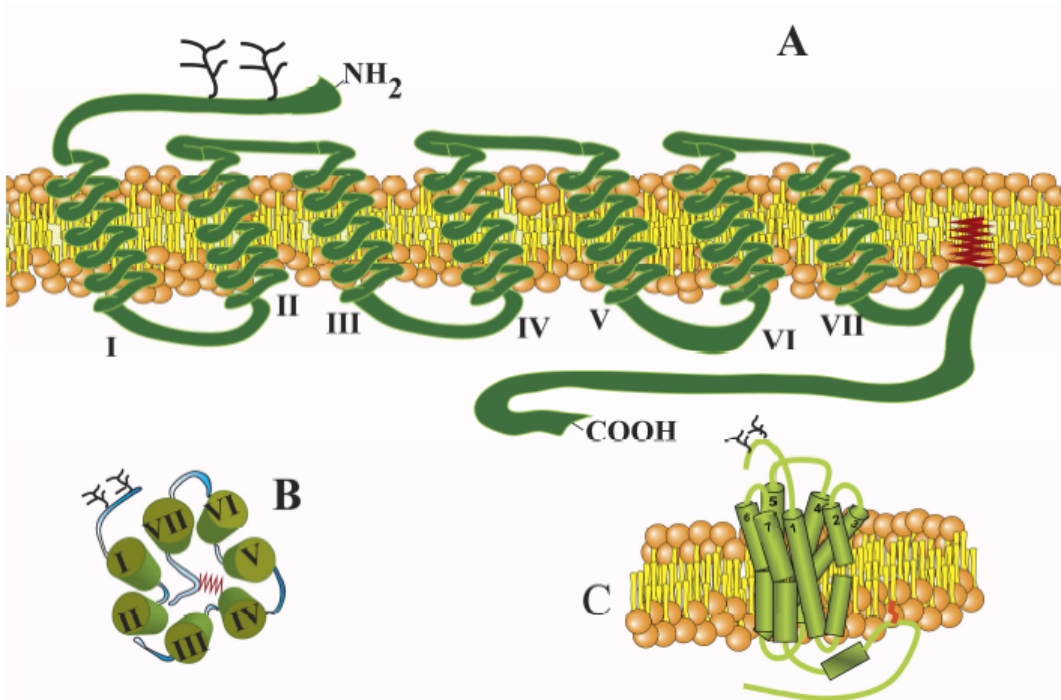


Figura 4.1. Modelo y estructura de los GPCR's: En el panel superior (A) se muestra el receptor extendido con sus siete dominios transmembranales, su extremo amino extracelular, su extremo carboxilo intracelular así como las asas conectoras tanto extracelulares como intracelulares. Bajo una perspectiva externa superior (B) y lateral (C) a la célula, el receptor puede ser apreciado en forma de un complejo proteico embebido en la membrana plasmática.

Proteínas G:

Las proteínas G está constituidas por tres subunidades: α , β y γ ; de ahí la denominación de "proteína G heterotrimérica". (Bohm, Gaudet, & Sigler, 1997). Estas proteínas constituyen uno de los más importantes componentes de la cascada de señalización celular. Los GPCR's perciben señales extracelulares que las traducen a las proteínas G, mismas que traducen estas señales hacia los efectores intracelulares, los cuales juegan un importante rol en varias vías de señalización (Tuteja, 2009). Las proteínas G se acopla a las azas internas del receptor, particularmente a las regiones que están próximas a la membrana plasmática así como al extremo carboxilo, mientras que el sitio de unión del ligando se localiza en los residuos externos de la membrana que la atraviesan o en las azas externas del receptor (Lefkowitz, 2004).

De acuerdo con los datos actuales, existen 16 genes que codifican para las subunidades $G\alpha$, cinco genes para las subunidades $G\beta$ y doce genes para las subunidades $G\gamma$. Clásicamente, las proteínas G están divididas en cuatro familias basadas en la similitud de sus subunidades α : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ (Cabrera-Vera, 2003).

Las funciones de las proteínas G están mayormente determinadas por las subunidades α : esta subunidad es la responsable de la interacción específica con los receptores, precediendo con la cadena de señales y la subsecuente cascada de moléculas efectoras (Orun, 2006). Por otro lado, el dímero $\beta\gamma$ es necesario para la asociación funcional con las subunidades α y con las proteínas G, para que a su vez, ésta pueda unirse al receptor. El dímero $\beta\gamma$ es igualmente un factor importante para la regulación y control de ciertos efectores intracelulares, así como de canales iónicos situados en la membrana plasmática (Hurowitz et al., 2000).

Efectores de las proteínas G:

Como se ya se mencionó previamente, las proteínas comunican señales de una amplia variedad de hormonas, neurotransmisores, quimiocinas, así como factores paracrinos y autocrinos. Estas señales son dirigidas hacia distintas vías de señalización intracelular, las cuales interactúan con otras redes que regulan enzimas metabólicas, canales iónicos, transportadores y otros componentes de la maquinaria celular que controlan un amplio rango de procesos celulares tales como la transcripción, motilidad, contractilidad y secreción. Estos procesos celulares a su vez, regulan diversas funciones en el desarrollo embrionario, en el aprendizaje y la memoria, así como la homeostasis del organismo.

Para que se lleve a cabo este proceso de señalización, un ligando debe actuar sobre alguno o más GPCR's, los cuales adoptan un cambio conformacional que les permite activar a las proteínas G, promoviendo el intercambio de guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP), los cuales están asociados a la subunidad α . Esta acción lleva a la disociación del dímero $\beta\gamma$ de la subunidad α . Ambas fracciones (α y $\beta\gamma$) se liberan para actuar sobre otros efectores "rio abajo" y por lo tanto, iniciar respuestas de señalización intracelular. Después de la propagación de la señal, el GTP unido a la subunidad α (GTP- α) es hidrolizado para ser convertido en GDP, inactivando así a la subunidad α (GDP- α). Dicho fenómeno lleva a una

reasociación del dímero $\beta\gamma$ con la subunidad α para la formación de la proteína G en su estado inactivo (Tuteja, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, las proteínas G pueden ser clasificadas de acuerdo a la función que ejercen las subunidades α , dichas subunidades actúan sobre efectores relativamente distintos: $G\alpha_s$ actúa de manera uniforme sobre la AC, elevando de manera importante los niveles del segundo mensajero cAMP, así como las corrientes de Ca^{2+} y Na^+ , mientras que $G\alpha_{i/o}$ actúa de forma contraria sobre la AC, inhibiendo la producción del cAMP y las corrientes de Ca^{2+} y Na^+ , mientras que aumenta las corrientes de potasio (K^+) (Goodman & Gilman, 1996).

Por otro lado, $G\alpha_{q/11}$ puede activar la movilización de Ca^{2+} debido a la estimulación hormonal, activando a la isoforma β de la fosfolipasa C (PLC- β), la cual a través del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) eleva los niveles del segundo mensajero inositol trifosfato (IP3) así como del DAG, reclutando y activando a la PKC (Fig. 4.2). Por último, $G\alpha_{12/13}$ es capaz actuar directamente a través del factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) para las GTPasas Rho y activar la vía de señalización Rho, llevando a una variedad de efectos asociados al citoesqueleto, así como en la forma y movilización celular (Neves, Ram, & Iyengar, 2002). La clasificación de algunas proteínas G ha sido posible gracias al uso de toxinas bacterianas capaces de actuar y alterar de forma específica las funciones de la subunidad α . Dos ejemplos de estos mecanismos de acción son la toxina causante del cólera y la toxina pertussis (PTX), esta última responsable en la aparición de la tosferina. La primera actúa sobre $G\alpha_s$, generando una inactivación permanente de la AC y por lo tanto, los niveles de cAMP se ven incrementados, mientras que la segunda actúa sobre $G\alpha_{i/o}$, inhibiendo de forma permanente la activación de la AC y por consecuencia, los niveles de cAMP se ven alterados. Esto ha permitido la clasificación e identificación de los GPCR's acoplados a $G\alpha_s$ y a $G\alpha_{i/o}$ de aquellos acoplados a $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ mediante el tratamiento y estimulación con ambas toxinas (Milligan & Kostenis, 2006).

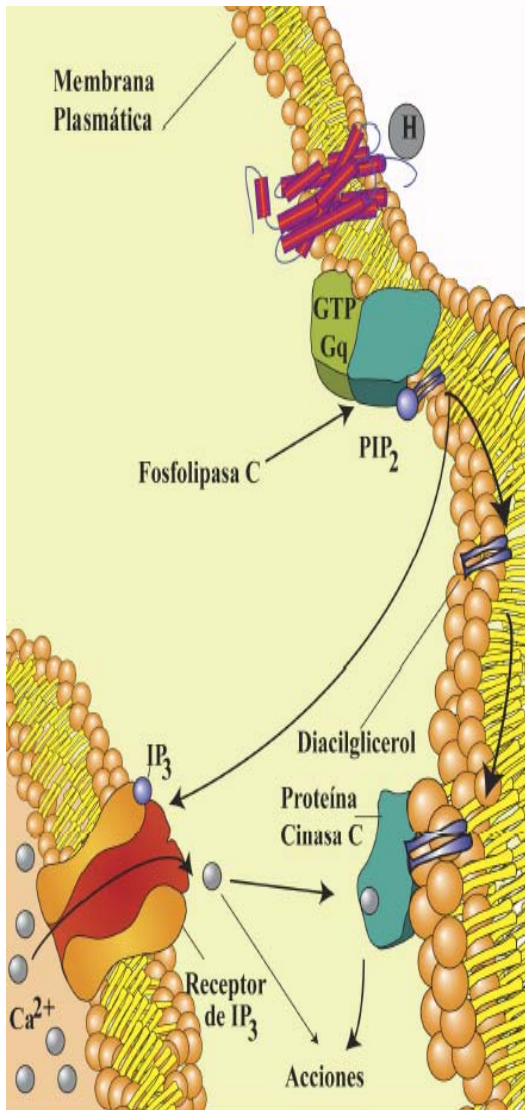
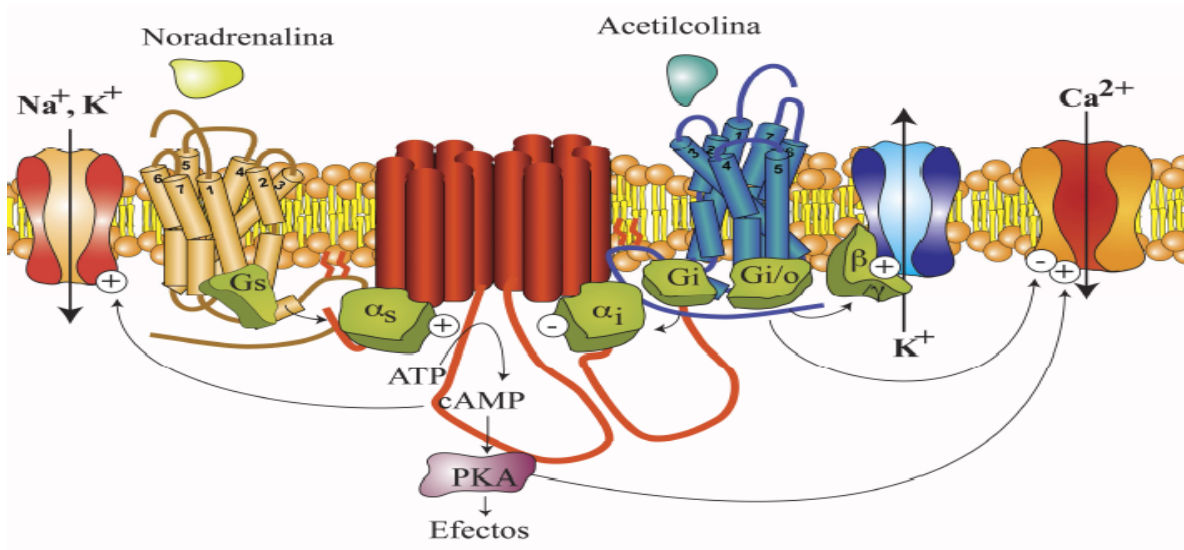


Figura 4.2. Efectos y vías de señalización de los GPCR's: En el panel superior se muestra la modulación de la AC (en rojo) y los canales iónicos por acción de los GPCR's. En café, se representa un receptor para noradrenalina acoplado a la proteína G_s, cuya subunidad α estimula a la AC generando la liberación de cAMP y la subsecuente activación de efectores como la PKA así como la modulación de los canales iónicos.

Por otro lado, en azul, se representa un receptor para acetilcolina acoplado a la proteína G_{i/o}, cuya subunidad alfa actúa de forma contraria a aquella acoplada a la proteína G_s, inhibiendo la acción de la AC y modulando los canales iónicos. De igual forma, el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G_{i/o} tiene acciones sobre algunos canales iónicos, permitiendo el flujo de K⁺ hacia el espacio extracelular.

En el panel izquierdo, se muestran los efectores para la proteína G_{q/n}, la cual puede ser activada por una hormona y generar la liberación del inositol trifosfato (IP₃) y del diacilglicerol (DAG) a través del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂). Los primeros son capaces de reclutar y activar a la PKC, generando una amplia variedad de efectos intracelulares.

V. Mecanismos de regulación de los GPCR's

Desensibilización:

La activación de un GPCR por su ligando inicia un proceso de desensibilización, una respuesta adaptativa usada por las células para detener el proceso de señalización por parte de la proteína G, previniendo de esta forma los potenciales efectos negativos que pueden resultar como consecuencia de la persistente estimulación del receptor (Kohout & Lefkowitz, 2003). En términos generales, la desensibilización de la respuesta de un GPCR puede ser descrita como la pérdida de la subsecuente respuesta por la prolongada o repetida estimulación de un agonista. El tiempo de prolongación representa periodos que pueden ir desde segundos hasta horas o incluso días (Kelly, Bailey, & Henderson, 2008).

Existen dos patrones de desensibilización descritos en los GPCR's; la desensibilización homóloga y la desensibilización heteróloga. En el primer caso, la activación prolongada de un GPCR causa la atenuación de la transducción de la señal solo para ese receptor, sin ningún efecto detectable en la señalización de otros GPCR's presentes en la misma célula, mientras que en el segundo caso, la activación de un GPCR atenúa la señal no solo de ese receptor, sino también la de otros tipos de GPCR's presentes en la misma célula. Este último tipo de desensibilización es consistente con la modificación de los componentes en las vías de transducción de señales que están involucradas en más de un tipo de GPCR (Von, Zastrow, M., 2002).

Fosforilación:

Otro importante tipo de modificación covalente que puede afectar la especificidad de las interacciones de las proteínas G, es la fosforilación. La rápida fosforilación del receptor en respuesta a la estimulación por un agonista es una modificación post-transduccional adoptada para todos los GPCR's. Este proceso involucra la acción de dos familias de proteínas: las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK's) y las β -arrestinas (Torrecilla et al., 2007).

Después de la unión del agonista, el GPCR asume una conformación que le permite unirse a una o más GRK's, las cuales son capaces de fosforilar a sus receptores en los residuos de las azas internas o en el extremo carboxilo (Kohout & Lefkowitz, 2003), aunque diversos tipos de subunidades alfa de la proteínas G también pueden ser fosforiladas en los residuos de serina y treonina (Ri, 1997). La fosforilación del

receptor por las GRK's, promueve una alta afinidad para la unión de las proteínas β -arrestinas y sus receptores, lo cual interfiere con el acoplamiento de sus respectivas proteínas G. Esta disminución en el acoplamiento de la proteína G resulta en una atenuación de hasta un 80% en la señalización del receptor (Kohout & Lefkowitz, 2003).

Internalización:

Otro proceso de regulación del receptor que ocurre de forma más lenta, típicamente entre minutos y horas después de una estimulación prolongada y repetida por su ligando, se denomina "internalización". Dicho mecanismo está estrechamente relacionado con la fosforilación de los GPCR's, lo cual genera un importante decremento en el número de receptores presentes en las membranas de las células (Von, Zastrow, M., 2002). Después de la fosforilación de los receptores por las GRK's y el reclutamiento de las β -arrestinas, los receptores son agrupados e internalizados en vesículas de clatrina (Koppen & Jakobs, 2004). Seguido de la internalización, los receptores pueden ser desfosforilados y reciclados hacia la membrana plasmática para llevar a cabo sus respectivas funciones, o ser degradados por los lisosomas (Fig. 5.1) (Drake, Shenoy, & Lefkowitz, 2006).

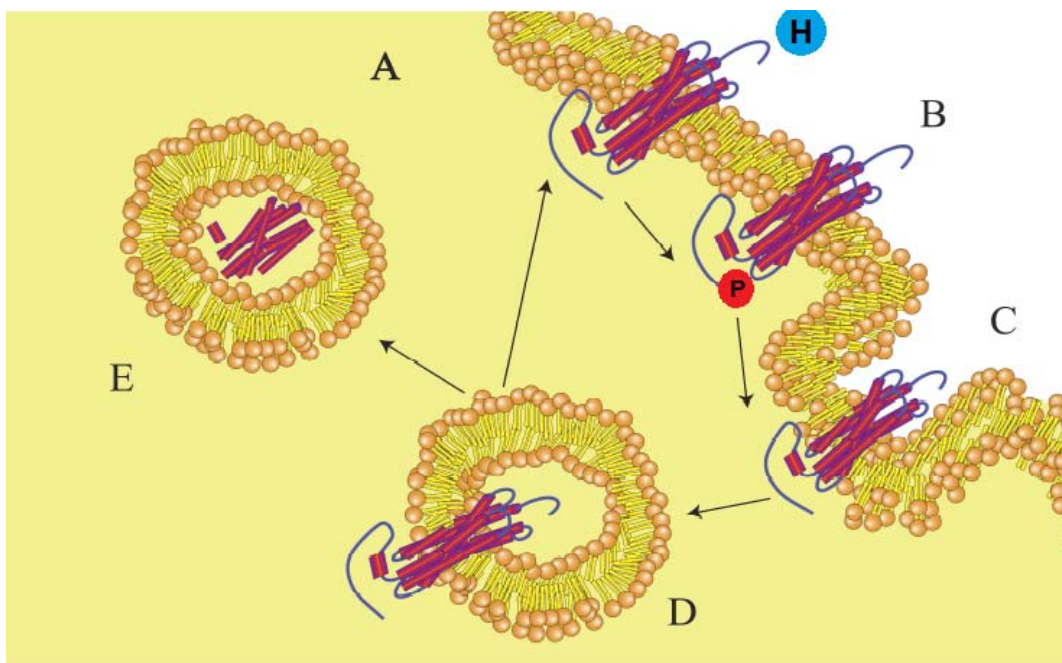


Figura 5.1. Internalización de los GPCR's: Después de la estimulación (A) y fosforilación (B), los GPCR's empiezan un proceso de internalización (C), en donde la vesícula se endocita (D) y los GPCR's pueden ser degradados por lisosomas (E) y/o ser reciclados de nuevo a la membrana plasmática (A).

VI. Proteína Cinasa C (PKC)

Generalidades:

Como se menciono anteriormente, las células son entidades altamente moduladas que responden de forma inmediata a su medio intra y extracelular. La mayoría de estas regulaciones son mediadas de forma directa o indirecta por cambios conformacionales en proteínas, mientras que el equilibrio entre los estados conformacionales activos e inactivos pueden ser alterados por mecanismos alostéricos o covalentes. Una de las formas más importantes de regulación de la actividad proteica por un mecanismo covalente es la fosforilación de proteínas, dicho proceso tiene un rol importante en la transducción de señales y en diversas respuestas celulares. La familia de enzimas catalizadoras de fosforilación de proteínas, las proteínas cinasas, representan un grupo de enzimas que modulan la actividad biológica de proteínas en una forma rápida y reversible (Azzi, Boscoboinik, & Hensey, 1992). Una de estas enzimas catalizadoras, la proteína cinasa C (PKC), es una familia de cinasas que juegan un papel importante en el control de las respuestas celulares mediadas por el segundo mensajero DAG y por promotores tumorales como los ésteres de forbol (Ron & Kazanietz, 1999).

Isoformas:

A la fecha, se han identificado diez diferentes isoformas de la PKC, las cuales se han clasificado en tres grupos en base a su estructura y cofactor de regulación (Fig. 6.1). El grupo mejor caracterizado es conocido como el grupo de las PKC convencionales (cPKC), entre cuyos miembros se encuentran la isoforma α , dos variaciones distintas de la isoforma β (β I y β II), así como la isoforma γ . Los miembros de este grupo requieren de Ca^{2+} , DAG, así como de un lisofosfolípido para su activación. Por otro lado, el grupo de las nuevas PKC (nPKC) está conformado por las isoformas δ , ϵ , η , θ y μ , las cuales, a diferencia del las cPKC, no requieren de Ca^{2+} ni de DAG para su activación, solo de un lisofosfolípido. Por lo tanto, cPKC y nPKC son activadas por medio de una misma vía de transducción, la vía de la PLC. El último grupo es conocido como las PKC atípicas (aPKC), el cual está conformado por las isoformas ζ y ι/λ ; este último grupo no requieren ni de Ca^{2+} ni de DAG para su activación (Newton, 1995).

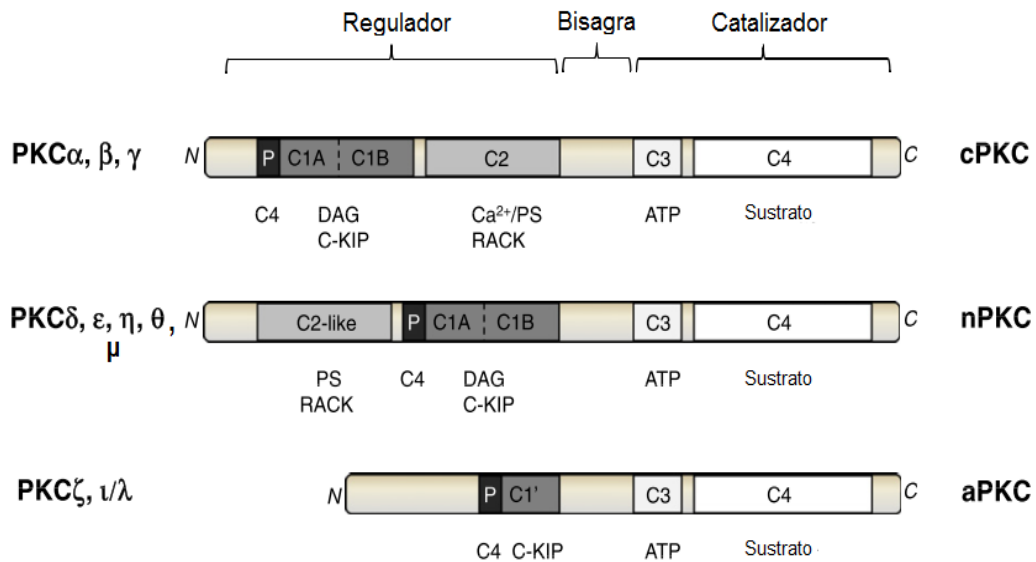


Figura 6.1: Estructura e isoformas de la PKC: Los once diferentes tipos de PKC han sido clasificadas en tres grupos: el grupo de las PKC convencionales (cPKC), las PKC nuevas (nPKC) y las PKC atípicas (aPKC).

Estructura:

Los miembros de las subfamilias de las isoformas de las cPKC, nPKC así como aPKC comparten un dominio catalítico conservado con sitios de unión para adenosín trifosfato (ATP) y sustratos proteicos. En todas las isoformas de la PKC, el llamado sitio de pseudosustrato que se acopla en el resto catalítico, tiene que ser desplazado por cambios conformacionales que permitan la activación de la PKC. En todas las isoformas, el sitio de pseudosustrato está localizado en la región cercana a la zona N-terminal para el dominio C-1, y contiene una alanina en lugar de una serina/treonina, lo que significa que no puede ser fosforilada. Debido a estas similitudes entre todas las isoformas de la PKC, la diversidad funcional viene de variaciones en sus fracciones regulatorias (Heemskerk, Harper, Cosemans, & Poole, 2011).

VII. Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK's)

Generalidades:

La cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's) son vías de señales de transducción intracelulares que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares y controlan un gran número de procesos celulares, fundamentales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la motilidad, la respuesta a estrés, la supervivencia y la apoptosis (Plotnikov, Zehorai, Procaccia, & Seger, 2011). En los mamíferos existen 4 principales subfamilias de MAPK's: 1) Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK), 2) Cinasas C-Jun N-Terminal (JNK), 3) P38 y 4) ERK-5. Cada familia tiene isoformas adicionales que son generadas a partir del procesamiento alternativo durante el proceso post-transcripcional del RNA. Las vías de transducción por MAPK's requieren de componentes de la misma cascada que están localizados entre la célula. Esto puede ocurrir mediante la asociación física y directa de estos componentes con otros o, a través de su acoplamiento con proteínas de andamio (Alcántara, Casas & García, 2005).

Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK):

Las proteínas cinasas ERK1 (p44^{MAPK}) y ERK2 (42^{MPAK}) son componentes esenciales y típicamente designados bajo el nombre de ERK1/2. De hecho, ambas isoformas comparten en 84% en su secuencia de aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, ERK 1/2 es una vía central de señalización que transmite señales desde una variedad de agentes extracelulares para la regulación de procesos celulares como la proliferación, diferenciación, desarrollo, etc. Uno de los eventos celulares que más pueden influir en la actividad ERK 1/2 es el aumento de Ca²⁺ intracelular induce por ligandos extracelulares (Chuderland & Seger, 2008). Una vez activadas, ERK 1/2 pueden fosforilar más de cien diferentes sustratos en los residuos de serina y treonina para generar una amplia variedad de respuestas biológicas. Una vez llevado a cabo este proceso, ERK 1/2 tiene que ser negativamente controlado por un proceso de retroalimentación negativa a través de un proceso de desfosforilación por MAPK's fosfatasas (Zassadowski, Rochette-Egly, Chomienne, & Cassinat, 2012).

VIII. Efectos Biológicos del LPA en el Sistema Nervioso

Generalidades:

El LPA produce una gran variedad de efectos importantes en el Sistema Nervioso (SN), estos efectos pueden ser clasificados bajo tres condiciones diferentes: 1) los efectos de la molécula del LPA sobre el SN bajo condiciones normales y patológicas, 2) el patrón de expresión de los diferentes receptores de LPA en el SN y, 3) el efecto de los dos fenómenos anteriores sobre los procesos conductuales y cognitivos.

Efectos del LPA sobre el SN:

La demostración de una vía de señalización mediada por el LPA en el SN ha centrado las bases para la posterior caracterización de las funciones de este compuesto en el cerebro, hasta constituirse al día de hoy, como una importante molécula reguladora bajo condiciones normales y patológicas (Estivill-torrús, Santín, Pedraza, Castilla-ortega, & Fonseca, 2011). Las primeras indicaciones de su señalización vienen de estudios con líneas celulares neuronales como las N1E-115, NG108-15 y PC12 (N. Fukushima, Ye, & Chun, 2002). En estas últimas, el LPA tiene efectos antagónicos sobre los receptores β -adrenérgicos, los cuales median cambios en la forma y en la estimulación de la AC por la forskolina, induciendo elevaciones de los niveles de cAMP (Farooqui, A., A. & Horrocks, L., A., 2007). Otros estudios sobre la línea celular SH-SY5Y, han demostrado la habilidad del LPA para estimular y promover los incrementos en los niveles del Ca^{2+} intracelular, predominantemente mediante la movilización de los depósitos en el retículo endoplásmico. Esta acción puede ocurrir a través de la producción de diversos segundos mensajeros como el IP_3 (Young, Challiss, Nahorski, & Mackrill, 1999). Además de estos efectos sobre las líneas celulares, el LPA actúa también como un potente inductor en el aumento de la retracción dendrítica e inhibiendo el desarrollo de las células (Farooqui, A., A. & Horrocks, L., A., 2007).

Por otro lado, se ha detectado la presencia de concentraciones muy elevadas de LPA bajo condiciones patológicas en el SN. Diversos estudios han aportado importantes observaciones en los mecanismos celulares por los cuales el LPA en altas concentraciones, induce un proceso de retracción celular posiblemente activado por la vía de señalización Rho. Esto ha sentado las bases para establecer que el LPA, bajo condiciones patológicas, puede causar una degeneración neuronal debido a un daño

importante en la barrera hematoencefálica y a la filtración del LPA hacia el cerebro (Fukushima et al., 2002).

Otros efectos importantes del LPA a nivel neuronal, son aquellos asociados a los mecanismos neuroprotectores, modificaciones importantes a nivel de la corteza cerebral como la morfología, supervivencia, migración y ciclo de progresión neuronal, cambios electrofisiológicos y en el patrón de crecimiento, modificaciones en moléculas señalizadoras (Chun, 2005), incremento en la migración por quimioquinesis en microglías a través de la activación de las corrientes de Ca^{2+} y K^+ (Schilling, Stock, Schwab, & Eder, 2004), cambios neurogénicos sobre los hemisferios corticales de ratón, provocando una expansión y doblez de estos, adoptando una conformación parecida a los cerebros primitivos (Kingsbury, Rehen, Contos, Higgins, & Chun, 2003). Estos últimos efectos en la morfología ha permitido demostrar que el LPA es capaz de actuar como un importante factor de crecimiento en el SN.

Finalmente, las propiedades estructurales del LPA también le permiten actuar como un importante mensajero celular, ya que debido a su composición hidrofílica, puede actuar como un mensajero intracelular de forma paracrina y autocrina, permitiéndole modular la reorganización del citoesqueleto, la neurogenesis, la migración neuronal, la apoptosis así como la liberación de diversos neurotransmisores (Nobuyuki Fukushima, 2004).

LPA y sus receptores en el Sistema Nervioso:

Como ya se mencionó anteriormente, el LPA actúa a través de GPCR's para llevar a cabo sus efectos biológicos. A la fecha, cinco receptores para el LPA (LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄ y LPA₅) han sido identificados, abriendo la posibilidad de que existan más. Varios estudios han demostrado un patrón específico de expresión de los cinco receptores del LPA en el SN. Este patrón de expresión tiene repercusiones importantes sobre el desarrollo y funcionamiento del SN (Noguchi et al., 2009).

Los cinco receptores de LPA tienen características distintas en cuanto a sus vías de señalización y efectos:

El receptor LPA₁ se acopla a las proteínas $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$, dicho receptor está ampliamente asociado con efectos en el SN, fibrosis muscular y renal así como lesión vascular. El LPA₂ comparte un 60% de similitud con el LPA₁ en cuanto a la secuencia

de aminoácidos. El LPA₂ se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_{q/11} y G_{12/13}, teniendo una importante participación en fenómenos de desarrollo en el SN y lesión vascular. Por otro lado, el LPA₃ se acopla a las proteínas G_{i/o} y G_{q/11}. Su delección en ratones knockout resulta en una implantación anormal del embrión en el útero, infertilidad y lesión vascular, mientras que a nivel del SN, está relacionado con la elongación de dendritas. Este receptor comparte un 50% de su estructura con el LPA₁ y LPA₂ en cuanto a la secuencia de los aminoácidos (Chun, Hla, Lynch, Spiegel, & Moolenaar, 2010). El LPA₄ era conocido como un receptor huérfano, sin embargo, hoy se sabe que se activa por LPA y se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_{q/11}, G_{12/13} y G_s. Su delección genética en ratones provoca retracción de dendritas así como redondeo y agregación celular. Por último, el LPA₅ comparte un 35% de similitud con el LPA₄ en la secuencia de los aminoácidos. Esta acoplado a las proteínas G_{q/11} y G_{12/13}, y está asociado con la formación de fibras de estrés, retracción de dendritas y redondeo celular (Tabla 1) (Contos, Ishii, & Chun, 2000).



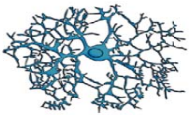


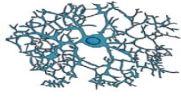
Aunque la expresión de los cinco receptores de LPA es amplia, los efectos más estudiados han sido aquellos asociados al LPA₁, ya que su expresión y/o delección tiene importantes efectos celulares y estructurales. En cultivos de células neurales progenitoras (NPC's) así como en la línea celular B-103, la expresión del receptor LPA₁ juega un rol importante en la proliferación de dichas células. Por otro lado, en células hipocampales, la expresión de los receptores LPA₁ y LPA₄ es capaz de promover su diferenciación. Este fenómeno puede ocurrir principalmente a través de la vía del receptor LPA₄-G_s mediante la activación de la AC y la liberación del cAMP, el cual activa al factor de transcripción CREB, promoviendo la diferenciación neuronal (Noguchi et al., 2009). En neuroesferas (grupo de células principalmente constituidas por NPC's), la vía señalización de LPA a través de los receptores LPA₁ y LPA₃ tiene efectos importantes sobre la proliferación, crecimiento y diferenciación neuronal, aunque dichas respuestas pueden ser inhibidas totalmente si el LPA se encuentra en concentraciones muy elevadas (Dottori, M., Leung, J., Turnley, A. M. & Pebay, A. 2008). En cultivos *ex-vivo* de cerebros embrionarios, el LPA promueve la supervivencia y diferenciación de las NPC's en lugar de la proliferación a través de los receptores LPA₁ y LPA₂ (Kingsbury et al., 2003).

Tabla 1: Características de los receptores de LPA

Receptor	Sinónimo	Localización Genética	Proteína G acoplada	Respuesta celular	Funciones fisiológicas y patológicas
LPA ₁	VZG-1 EDG2 Rec1.3 GPR26 GPCR26	LPAR1/chr9 (humano) Lpar1/chr4 (ratón)	G _{i/o} G _{q/11} G _{12/13}	<ul style="list-style-type: none"> - Proliferación - Supervivencia - Formación de fibras de estrés - Retracción de dendritas - Redondeo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo cerebral - Dolor neuropático - Fibrosis pulmonar - Fibrosis renal - Lesión vascular
LPA ₂	EDG4	LPAR2/chr19 (humano) Lpar2/chr8 (ratón)	G _{i/o} G _{q/11} G _{12/13}	<ul style="list-style-type: none"> - Redondeo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Lesión vascular
LPA ₃	EDG7	LPAR3/chr1 (humano) Lpar3/chr3 (ratón)	G _{i/o} G _{q/11}	<ul style="list-style-type: none"> - Elongación de dendritas 	<ul style="list-style-type: none"> - Implantación y espaciado embrional - Espermatogénesis
LPA ₄	GPR23 P2Y9 P2Y5-like	LPAR4/chrX (humano) Lpar4/chrX (ratón)	G _{i/o} G _{q/11} G _{12/13} G _s	<ul style="list-style-type: none"> - Retracción de dendritas - Redondeo celular - Agregación celular 	<ul style="list-style-type: none"> - No especificado
LPA ₅	GPR92 GPR93	LPAR5/chr12 (humano) Lpar5/chr6 (ratón)	G _{q/11} G _{12/13}	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de fibras de estrés - Retracción de dendritas - Redondeo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - No especificado

Por otro lado, el LPA₁ tiene también un efecto importante sobre la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) a través de Gi/o, mediando la activación y transcripción de genes de expresión temprana, promoviendo así, la proliferación neuronal (Yoshida & Ueda, 2001). Este receptor también puede regular y promover la maduración de neuronas a través de la regulación indirecta de los receptores NMDA mediante la activación de la PKC (N Fukushima, 2002).

Aunque el receptor LPA₁ tiene una participación importante en múltiples procesos neuronales, todos los receptores del LPA han sido ampliamente identificados en las células del SN (Tabla 2). En las NPC's, los receptores LPA₁ y LPA₂ se expresan de forma abundante, contribuyendo a múltiples procesos celulares como la proliferación, diferenciación, entre otros. En neuronas, el receptor mayormente expresado es el LPA₂, el cual contribuye en diversos procesos en los que se encuentran la retracción de dendritas, redondeo celular, colapso en el crecimiento, inhibición de la migración, supervivencia y apoptosis. En oligodendrocitos, sólo se expresa el receptor LPA₁, cuya función está relacionada con el proceso de maduración, retracción y redondeo celular. Es importante mencionar, que los astrocitos parecen expresar los cinco receptores de LPA, teniendo importantes efectos en su proliferación, cambios citoesqueléticos, liberación de factores de diferenciación neuronal, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como una disminución en la captura de glutamato (Noguchi et al., 2009). Por otro lado, en las microglías (células que tienen un papel inmunoprotector en el SN), los receptores mayormente expresados son el LPA₁ y el LPA₃, cuya actividad está mayormente asociada con el incremento en la actividad metabólica y por ende en su proliferación, así como en el mejoramiento de la migración por quimioquinesis. Finalmente, en las células de Schwann (encargadas principalmente de la mielinización de los axones), los receptores mayormente expresados son el LPA₁ y el LPA₂, teniendo efectos importantes en la supervivencia, diferenciación, cambios en el citoesqueleto, así como en la pérdida de mielina, contribuyendo posiblemente, a la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (MS) (Herr & Chun, 2007).

Tabla 2: Patrón de expresión de los receptores de LPA en células nerviosas		
Tipo de célula	Receptor de LPA expresado	Respuestas biológicas
<p>Neuronas progenitoras</p> 	<p>LPA₁</p> <p>LPA₂</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proliferación - Diferenciación - Inhibición de la diferenciación (en concentraciones patológicas) - Retracción de dendritas - Redondeo celular
<p>Neurona</p> 	<p>LPA₂</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Retracción de dendritas - Redondeo celular - Colapso en el cono de crecimiento - Inhibición en la migración - Supervivencia - Apoptosis
<p>Oligodendrocito</p> 	<p>LPA₁</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso de formación (maduración) - Proceso de retracción - Redondeo celular
<p>Astrocito</p> 	<p>LPA₁</p> <p>LPA₂</p> <p>LPA₃</p> <p>LPA₄</p> <p>LPA₅</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proliferación - Deterioro en la captura de glutamato - Producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) - Cambios citoesqueléticos - Liberación de factores de diferenciación neuronal
<p>Microglía</p> 	<p>LPA₁</p> <p>LPA₃</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento en la actividad metabólica (proliferación) - Mejoramiento de la quimioquinesis
<p>Célula de Schwann</p> 	<p>LPA₁</p> <p>LPA₂</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Supervivencia - Diferenciación - Cambios citoesqueléticos - Desmielinización

Efectos conductuales y cognitivos:

Los estudios en ratones han demostrado que la presencia del LPA y el patrón de expresión de sus receptores tienen efectos importantes sobre los procesos conductuales y cognitivos; dichos cambios en el comportamiento se encuentran mayormente asociados al receptor LPA₁, sin que hasta el día de hoy se cuenten con más datos relacionados a otros receptores.

Los ratones carentes del LPA₁ muestran una reducción de las oscilaciones de frecuencias alfa y gamma en las capas superficiales de la corteza entorrinal a nivel del hipocampo, así como del número de neuronas GABAérgicas (Cunningham et al., 2006). La carencia de este mismo receptor tiene efectos importantes en las concentraciones de serotonina (5-HT) y dopamina (DA), así como en los metabolitos intermedios de ambos neurotransmisores, de forma que los animales carentes del receptor LPA₁ presentan un déficit en la producción de 5-HT y DA en numerosas áreas cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo y el núcleo acumbens; por el contrario, hay un aumento de estos neurotransmisores en el cuerpo estriado (Harrison, 2003). Además, la liberación del GABA y del glutamato también se ve afectada y por ende, disminuye la disponibilidad de dichos neurotransmisores en el hipocampo de los ratones, teniendo repercusiones sobre el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Roberts et al., 2005).

Todos estos cambios en la liberación y disponibilidad de los neurotransmisores tiene impactos en los patrones conductuales, especialmente aquellos asociados al aprendizaje y la memoria, ya que tanto la DA como la 5-HT están implicados en numerosos procesos cognitivos, entre los que destacan: el comportamiento adaptativo, toma de decisiones, aprendizaje por refuerzo (Carlson, 2006), cambios en la regulación de la temperatura, modificaciones en el ritmo sueño-vigilia, emesis (vómito), comportamiento sexual, agresividad, nocicepción (procesamiento de estímulos potencialmente dañinos para los tejidos), balance energético (Estivill-torrús et al., 2011), desordenes psiquiátricos como el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), ansiedad, depresión y esquizofrenia. Por otro lado, entre los efectos más importantes del GABA y del glutamato se encuentran aquellos implicados en la inhibición y excitación neuronal respectivamente, la aparición de enfermedades neuropsiquiátricas como la corea de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson, inflamación cerebral, la inflamación cerebral, etc. (Carlson, 2006).

Además de toda esta gama de efectos sobre la 5-HT y la DA, el LPA es capaz de influir en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis durante condiciones *ex vivo*, inhibiendo la actividad de la ATPasa para Na^+ y K^+ (Nishikawa, Tomori, Yamashita & Shimizu, 1989), mientras que la carencia del LPA_1 provoca una desregulación de las subunidad α y β de la enzima Ca^{2+} /calmodulina proteína cinasa II (CaMKII) a nivel sináptico, donde la enzima actúa como un regulador clave en la potenciación a largo plazo (LTP), esto es muy importante, ya que a nivel postsináptico, los animales muestran cambios en la interacción de la CaMKII con los receptores NMDA y AMPA, generando una conductancia alterada en los receptores AMPA y una reducción de respuesta en las vías de señalización intracelular por NMDA, lo que en conjunto lleva a una mayor reactividad sináptica, combinada con una menor sensibilidad de respuesta al estímulo mediado por la vía glutamatérgica, lo que pone de manifiesto la disfunción del hipocampo en ausencia del receptor LPA_1 . Bajo todas estas condiciones, los animales muestran alteraciones importantes en las tareas de memoria y reconocimiento (Lisman, Schulman, & Cline, 2002).

Por otro lado, otros estudios también han demostrado el papel del LPA como activador de la GTPasa Rho en la plasticidad y organización estructural sináptica en neuronas hipocampales, donde también participa en la reorganización de dendritas y axones. Este incremento en la actividad de Rho mediado por LPA, permite mejorar la memoria espacial a corto y largo plazo, ya que cuando se administra LPA en el hipocampo y se entrenan a las ratas en el laberinto acuático de Morris (tarea conductual utilizada en ratas para evaluar la memoria espacial), los animales logran localizar la plataforma y escapar en mucho menos tiempo, lo que sugiere un nexo funcional entre Rho y el LPA en dichos procesos cognitivos (Estivill-Torrús et al., 2011).

Otras vías de señalización intracelular que podrían estar implicadas en la formación de la memoria son la vía de la PKC, la mediada por fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) o la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). De hecho, se ha demostrado que los receptores de LPA activan la vía de la PKC, aumentando la fosforilación de una isoforma de la cinasa de adhesión focal (FAK), así como la actividad de los receptores de NMDA en las sinapsis de las neuronas piramidales del hipocampo, lo que sugiere una función reguladora del LPA en la plasticidad sináptica (Nishikawa, Tomori, Yamashita & Shimizu, 1989).

ANTECEDENTES

IX. Efectos del LPA sobre cultivos de células nerviosas

Generalidades:

Como modelo de estudio, los cultivos de líneas celulares han sido ampliamente utilizados para determinar los efectos de diferentes compuestos y condiciones sobre éstas. A nivel neuronal, se han documentado los cambios intra y extracelulares que son consecuencia de las diferentes condiciones bajo las cuales las células son evaluadas y así, determinar los potenciales efectos de estos compuestos y/o condiciones sobre el SN.

En cuanto al LPA, los primeros reportes acerca de sus efectos en neuronas vienen de aquellas líneas celulares N1E-115, NG108-15 y PC12, las cuales han mostrado diversos cambios asociados al redondeo de la célula, retracción dendrítica, alteraciones en el citoesqueleto, supervivencia, migración y ciclo de progresión neuronal, cambios en el patrón de crecimiento, modificaciones en moléculas señalizadoras, así como cambios en diversas vías de señalización intracelulares (Chun, 2005).

Por otro lado, en la línea celular SH-SY5Y, el LPA ha demostrado tener efectos sobre el incremento de Ca^{2+} intracelular mediante la producción de segundos mensajeros como el IP3 y la PKC, sugiriendo la participación de la proteína Gq/11 en el proceso de señalización (Young et al., 1999), mostrando así, los diversos efectos del LPA a través de sus GPCR's sobre el SN bajo diferentes condiciones (Fukushima et al., 2002).

En la actualidad, existe una creciente evidencia en la literatura de que el LPA así como otros fosfolípidos similares como la S1P, representan una familia de moléculas señalizadoras responsables de una amplia variedad de respuestas celulares. La búsqueda de los GPCR's responsables de iniciar esta cascada de respuestas ha llevado al descubrimiento de al menos cinco GPCR's para el LPA. Sin embargo, resulta aún poco claro qué subtipos de receptores son los responsables de los múltiples efectos que el LPA tiene sobre diferentes cultivos neuronales y por ende, cuáles son las modificaciones más importantes a nivel neurofisiológico (Young et al., 1999). Esto ha complicado el escenario para la creación de modelos experimentales que permitan explicar los diversos efectos tanto positivos como negativos que el LPA pudiera tener sobre procesos cognitivos, conductuales, neurológicos y psiquiátricos.

X. Efecto del LPA sobre la línea celular U87-MG

Generalidades:

Algunos fosfolípidos como la S1P han probado tener efectos importantes sobre diversas vías de señalización en la línea celular U87-MG, la cual está clasificada como derivada de un glioblastoma grado IV. Además, se ha logrado identificar el patrón de expresión de los receptores para S1P (S1P₁, S1P₂ y S1P₃) sobre estas células, (Van Brocklyn, Letterle, Snyder, & Prior, 2002) e incluso, ha sido posible la codificación de su secuencia genómica para su uso como modelo de estudio cancerígeno (Clark et al., 2010). Sin embargo, al día de hoy no existe en la literatura registro alguno acerca de los efectos del LPA sobre esta la línea celular a nivel intra y extracelular, mucho menos se ha avanzado en la creación de un modelo de estudio que permita valorar los efectos del LPA bajo diferentes condiciones sobre el SN en base al uso de estas células.

JUSTIFICACIÓN Y

OBJETIVOS

Justificación

Aunque se ha avanzado en la caracterización de los efectos del LPA sobre diversas líneas celulares, así como en modelos *ex-vivo*, al día de hoy no se ha hecho uso de la línea celular U87-MG para la caracterización del LPA bajo diferentes condiciones. Debido a esto, el uso de las células U87-MG como modelo de estudio es importante para la caracterización de las funciones del LPA sobre el SN.

La evaluación de los efectos de este fosfolípido se puede realizar bajo diversos niveles y paradigmas; sin embargo, el objetivo de esta investigación es la determinación de los cambios intracelulares y extracelulares en los que el LPA pudiera participar. Este nivel de estudio implica la caracterización de moléculas señalizadoras que participan en la regulación de la función de los receptores, tales como las proteínas cinasas, así como la activación de diversas cascadas de señalización intracelular como las MAP cinasas.

Por otro lado, además de los cambios moleculares, es importante la evaluación de los efectos del LPA a nivel morfológico y estructural. De esta forma, se espera que la administración del LPA induzca cambios importantes sobre las células tanto a nivel intracelular como extracelular.

Finalmente, los resultados de esta investigación pueden formar parte de un modelo de estudio, que permita explicar los cambios moleculares y estructurales en procesos cognitivos y alteraciones neuropsiquiátricas. Esto es muy importante, ya que la identificación de las vías de señalización responsables de los múltiples efectos del LPA, puede proporcionar las bases para posteriores estudios que involucren la identificación de dianas terapéuticas, así como la creación de tratamientos contra enfermedades en las que el LPA tuviera una participación importante.

Objetivos Generales

Determinar los efectos intracelulares y extracelulares que el LPA pudiera tener sobre las células U87-MG mediante la identificación de proteínas y moléculas señalizadoras, así como la caracterización de las modificaciones estructurales como resultado de la estimulación con LPA.

Objetivos experimentales

- Determinar los efectos del LPA sobre la línea celular U87-MG mediante una curva dosis-respuesta por ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular.
- Determinar la posible participación de la PKC en la regulación de los receptores para LPA por la administración previa del forbol 12-miristato 14-acetato (PMA). Para ello, se realizará una curva dosis-respuestas mediante ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular.
- Identificar las posibles isoformas de la PKC que participan en la regulación de los receptores para LPA, empleando el uso de inhibidores selectivos para diversas isoformas de esta cinasa.
- Determinar la posible expresión y participación de los receptores LPA_1 y LPA_3 , empleando el uso del agonista (2S) OMPT para LPA_1 y el antagonista Ki16425 para LPA_1 y LPA_3 mediante ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular.
- Evaluar la participación de la proteína $\text{G}_{i/o}$ en la señalización por LPA, empleando el uso de la toxina pertussis mediante ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular.
- Evaluar los potenciales efectos sobre la estructura de las células por la estimulación con LPA mediante análisis microscópico.
- Determinar la activación de la vía de señalización de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) por LPA mediante ensayos de Western-Blot.

MATERIAL Y **METODOLOGÍA**

Compuestos:

El medio de cultivo DMEM, el suero fetal bovino (SFB), la tripsina, los antibióticos, así como otros reactivos utilizados para el cultivo celular fueron comprados a Life Technologies, Inc. El ácido lisofosfatídico, la bradicinina, el forbol 12-miristato-14-acetato y los inhibidores de la PKC hispidina y bisindolilmaleimida I fueron comprados a Sigma Aldrich Chemical, mientras que el Gö6976 y rotelina a Calbiochem. El agonista 2S (OMPT) fue comprado a Cayman Chemical, mientras que el antagonista Ki1562 de Adooq Bioscience. El Fura-2AM fue comprado a Invitrogen. El anticuerpo primario fue obtenido de Cell Signaling Technology mientras que el anticuerpo secundario a ZYMED. La toxina pertussis fue purificada en el laboratorio (García-Sáinz., et. al., 1992)

Cultivo celular:

Se realizó el cultivo de las células U87-MG bajo condiciones de esterilidad en medio DMEM con alta glucosa, glutamina, piruvato sódico y complementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico a 37°C con una atmosfera con 95% de aire y 5% de CO₂. Doce horas antes de cada experimento, las células fueron ayunadas con medio DMEM sin SFB con el fin de retirar algunos compuestos que pudieran estimular a las células.

Medición de calcio intracelular:

Se cultivaron las células hasta lograr una confluencia del 90-100% y se ayunaron doce horas antes de cada ensayo. Posteriormente, se les retiró el medio y se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (NaCl, Na₂HPO₄•12H₂O, NaH₂-PO₄•2H₂O PH 7.4). Después, se cargaron con 4 µM del indicador fluorescente de Ca²⁺ intracelular Fura-2AM mezclado con 40 µl de ácido plurónico en medio Krebs-Ringer (BSA-glucosa pH 7.4) a 37°C por una hora. Posteriormente, las células se despegaron de la caja petri con 2 mililitros de versenato y se resuspendieron en 10 mililitros de buffer Krebs-Ringer. Se lavaron tres veces y se concentraron en 12 mililitros de la misma solución empleándose 2 mililitros para cada ensayo.

La medición de Ca²⁺ intracelular se realizó usando el espectrofluorómetro AMINCO-Bowman Serie 2 con dos longitud de onda de excitación de 340 nm y 380

nm y una de emisión de 510 nm. La concentración de Ca^{2+} intracelular se calculó usando la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \left[\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right]$$

Donde K_d representa la constante de afinidad del Fura-2AM por el Ca^{2+} (224 nM). R la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias. R_{\min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar EGTA (5mM) y R_{\max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón-X-100 al 10% (v/v). S_{f2} y S_{b2} representan los coeficientes de proporcionalidad del Fura-2AM libre y asociado al Ca^{2+} en la longitud de onda 2 respectivamente.

Ensayos de Western-Blot:

Se cultivaron las células en cajas de seis pozos hasta alcanzar una confluencia del 90-100%. Doce horas antes de cada experimento, las células fueron ayunadas y estimuladas de acuerdo a los tiempos establecidos a 37°C. Posteriormente, fueron lavadas con PBS frío y lisadas con buffer de muestra para Laemmli sobre hielo (Tris 0.1 M, SDS 10%, Glicerol 20%, azul de bromofenol 0.1%, β -mercapto 0.04%). Los lisados fueron calentados a 96°C por 6 minutos y centrifugados a 1200 rpm por 5 min. Las proteínas de los lisados totales fueron separadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con buffer de corrida (Tris-Base 25 mM, SDS 0.001% Glicina 100mM PH 8.3) a 30 miliamperes por gel. Después, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 120 miliamperes por gel durante 1 hora. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS-Tween (TBS 10X, H₂O, Tween 20) con leche descremada al 3% durante 1 hora a 37°C con agitación constante.

Pasado este tiempo, a una membrana se le adicionó el anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de ERK mientras que a la otra membrana se le adicionó el anticuerpo dirigido contra t-ERK, dejándose en agitación constante a 4°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween. Después, se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa en una solución de TBS-Tween y leche descremada al 3% a una dilución de 1:10000 a 37°C, durante 1 hora en agitación constante. Posteriormente, se dieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween y otro de TBS-1X (NaCl, TRIS-BASE, Tween 20 PH 7.6) por 5 minutos. Finalmente, las membranas fueron analizadas en un escáner LI-COR

Análisis microscópico:

Se cultivaron aproximadamente 4000 células en cajas Petri de cristal. Doce horas antes del experimento, las células fueron ayunadas y estimuladas en los tiempos establecidos. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Olympus 1X81 de iluminación invertida (Olympus Corporation, Tokio, Japon) con el objetivo 40X.

Análisis estadístico:

Los datos se analizaron y se graficaron con el Software Graph Pad Prism 5.0. Se presentan los datos como promedios \pm SEM. A los datos presentados en gráficas de barras se les aplicó una t de student para comparaciones simples y un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se estableció una $p < 0.05$ como límite significativo. A los datos presentados en curvas dosis-respuesta se les aplicó un análisis no paramétrico de curva dosis-respuesta sigmoidea.

RESULTADOS

I. Medición de Ca^{2+} intracelular

Se realizaron ensayos de estimulación con LPA para cuantificar la movilización de Ca^{2+} intracelular sobre las células U87-MG mediante una curva dosis-respuesta. Las células fueron cargadas con $4 \mu\text{M}$ de Fura-2AM y $40 \mu\text{l}$ de ácido plurónico durante una hora. Los resultados mostraron una respuesta dependiente de la concentración de LPA con una respuesta mínima de 42.87 nM , una respuesta máxima de 308.7 nM así como una EC_{50} de 13.3 nM .

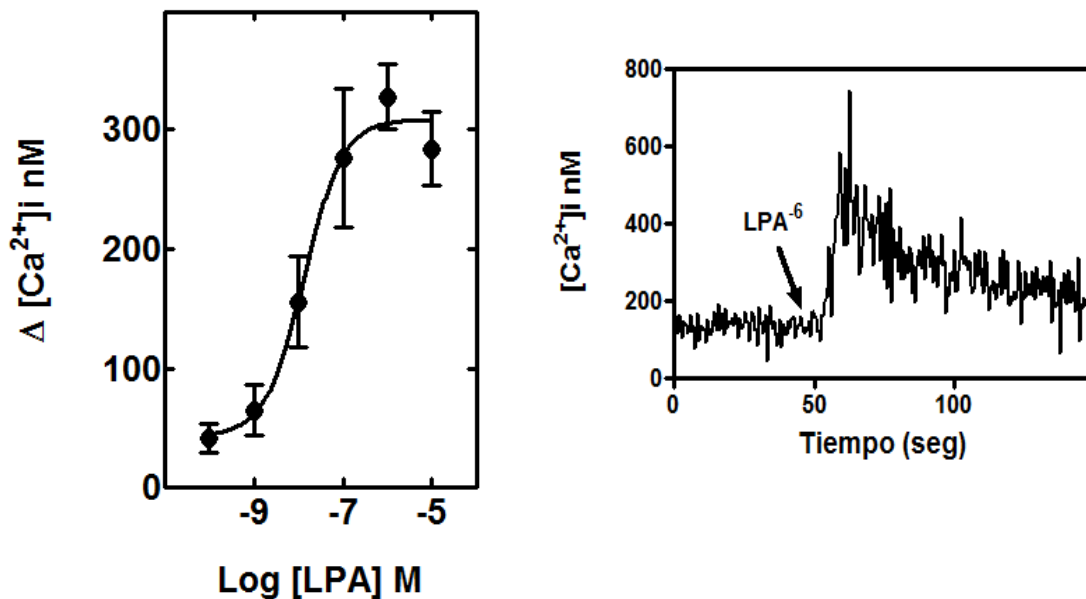


Figura 1. Efecto del LPA sobre las células U87-MG. A) Se usaron concentraciones crecientes de LPA desde 10^{-10} hasta 10^{-5} . La EC_{50} fue de 13.3 nM . Los datos se presentan como $\pm\text{SEM}$ y se realizaron al menos cinco experimentos independientes. **B)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células U87-MG por LPA. La concentración del LPA utilizada en esta figura es de $1 \mu\text{M}$.

Con el objetivo de identificar la posible participación de la PKC en la fosforilación de los receptores que modulan la respuesta celular para LPA, se realizó una curva dosis-respuesta de inhibición incubando las células 5 minutos con diferentes concentraciones de PMA antes de ser estimuladas con LPA $1 \mu\text{M}$. Los datos muestran un decremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular dependiente de la concentración de PMA, con una respuesta mínima de 62.79 nM , una respuesta máxima de 306.6 nM así como una IC_{50} de 1 nM .

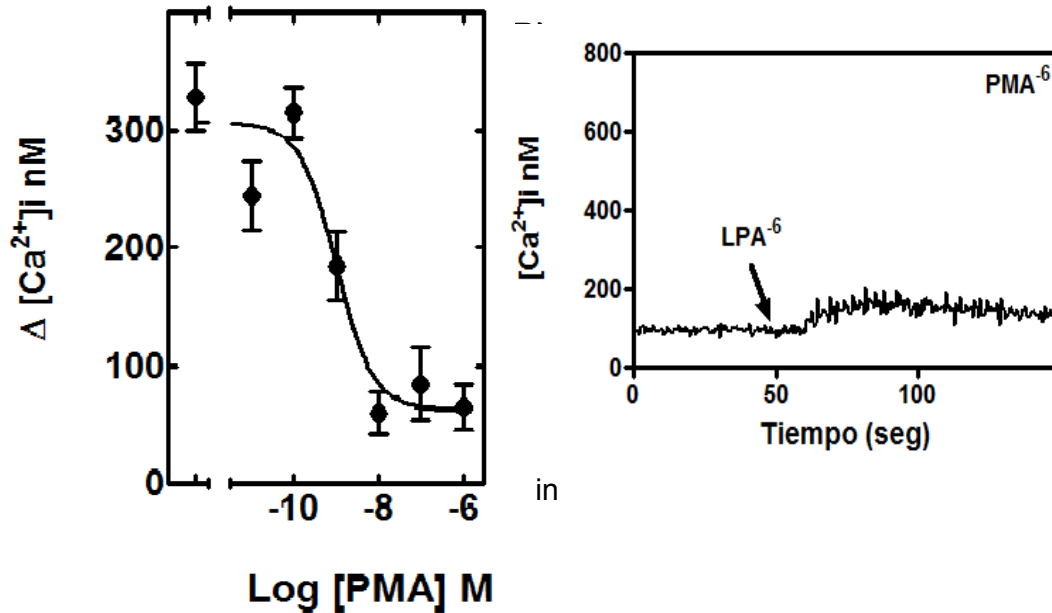


Figura 2: Efecto del LPA sobre las células U87-MG incubadas con PMA. A) Se usaron concentraciones crecientes de PMA desde 10^{-11} hasta 10^{-6} , mientras que la concentración del LPA empleada fue siempre la misma $1 \mu\text{M}$. La IC_{50} fue de 1 nM. Los datos se presentan como $\pm\text{SEM}$ y se realizaron al menos cinco experimentos independientes. **B)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células U87-MG incubadas con PMA durante cinco minutos y posteriormente estimuladas con LPA. Las concentraciones de PMA y LPA utilizadas en esta figura son de $1 \mu\text{M}$.

Los resultados de la figura 2, muestran claramente la participación de la PKC en la movilización de Ca^{2+} intracelular cuando las células son incubadas con PMA por 5 minutos y posteriormente estimuladas con LPA. En otras palabras, la actividad de la PKC fue dependiente de la concentración de PMA. Esto indica que la regulación de los GPCR's para LPA en esta línea celular puede ser modulada por la acción de esta cinasa, de manera que, una o varias isoformas activas estarían participando en este proceso.

Estas posibles isoformas de la PKC muestran que, al fosforilar al receptor en algún aminoácido presente en el extremo carboxilo o en alguna de las azas intracelulares del receptor, éste se desensibiliza y se internaliza, atenuando la movilización de Ca^{2+} intracelular de manera importante en respuesta al LPA, aún cuando este último se administra en concentraciones máximas de $1 \mu\text{M}$.

Para apreciar mejor el efecto de la incubación con PMA y la posterior estimulación con LPA sobre la respuesta en la movilización de Ca^{2+} intracelular, además de las dos curvas dosis-respuesta presentadas anteriormente, se usaron concentraciones máximas de ambos compuestos para medir la respuesta celular. La metodología empleada fue la misma: se incubaron las células con PMA $1\mu\text{M}$ y posteriormente se estimularon con LPA $1\mu\text{M}$. Los datos se presentan en la siguiente figura:

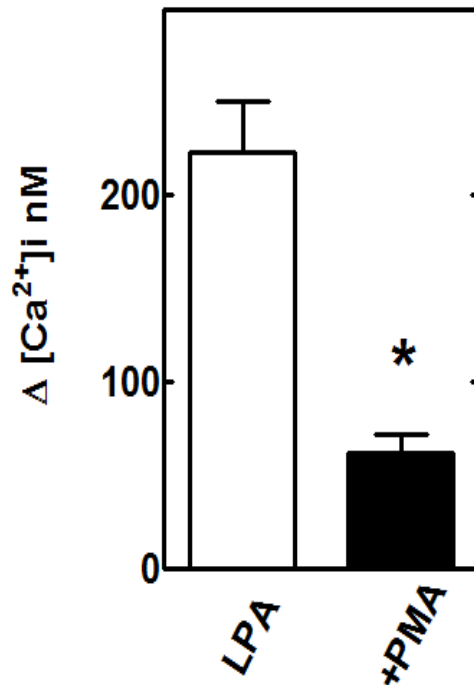


Figura 3. Gráfica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por LPA. El efecto de la previa estimulación de las células con PMA $1\mu\text{M}$, muestra un decremento importante de la respuesta celular cuando éstas son estimuladas con LPA $1\mu\text{M}$. Los datos fueron analizados con una prueba t de student, la cual mostró diferencias significativas entre ambos grupos con una $p < 0.05$.

Un aspecto importante que vale la pena mencionar, es que la determinación de Ca^{2+} intracelular requiere de una manipulación que podría dañar o matar a las células; de ser así, éstas mostrarían una respuesta completamente nula o, mucho menor a la normal cuando son estimuladas. Aunque las células fueron manipuladas cuidadosamente, para asegurarse de que estaban en condiciones óptimas después de ser incubadas con PMA y estimuladas con LPA, durante el mismo ensayo y 150 segundos posteriores a la estimulación con LPA, las células fueron estimuladas con bradicinina, una hormona peptídica selectiva para los receptores B1 y B2.

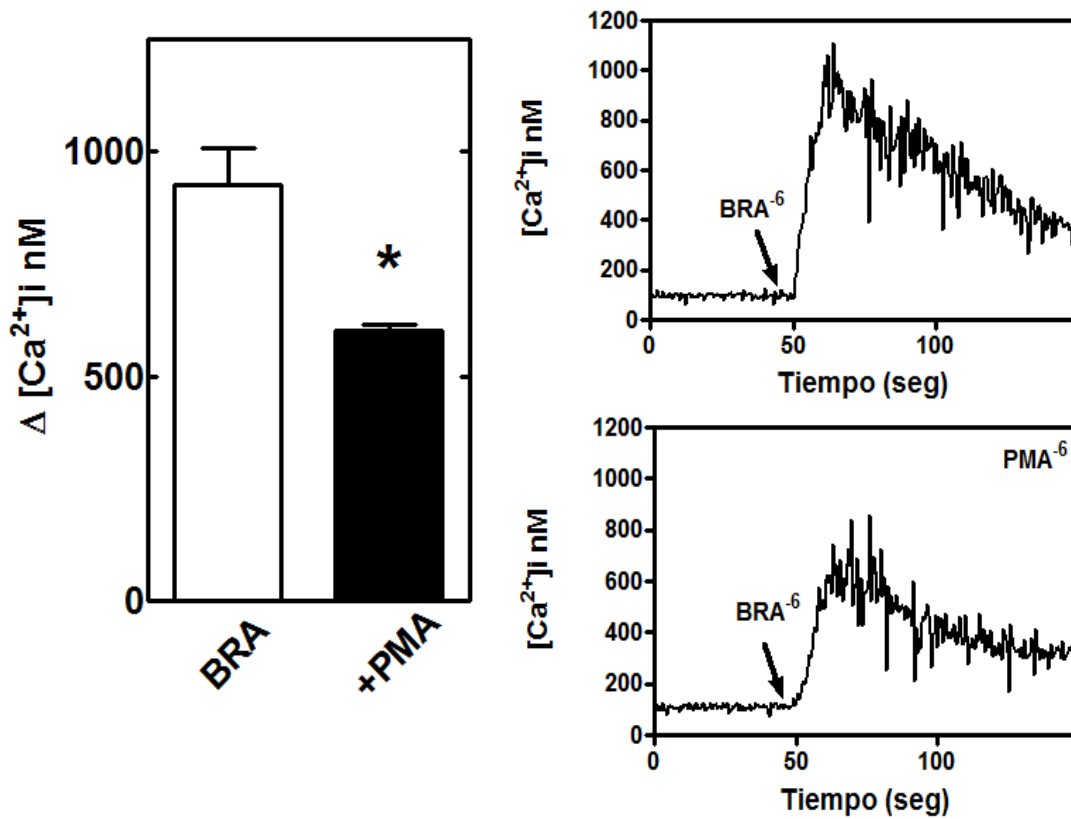


Figura 4: Grafica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por bradicinina. A) El efecto de la previa estimulación de las células con PMA $1 \mu\text{M}$, muestra un decremento importante de la respuesta celular cuando estas son estimuladas con bradicinina $1 \mu\text{M}$. Los datos fueron analizados con una prueba t de student, la cual mostró diferencias significativas entre ambos grupos con una $p < 0.05$. **B)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células U87-MG por bradicinina. **C)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células incubadas con PMA durante cinco minutos y posteriormente estimuladas con bradicinina. Las concentraciones de PMA y bradicinina utilizadas en A y B fueron de $1 \mu\text{M}$.

Los datos presentados en la figura 4 mostraron resultados interesantes. La bradicinina generó una respuesta mucho mayor en la movilización de Ca^{2+} intracelular de aproximadamente 930 nM sobre las células, en comparación con el LPA. Esto nos habla de una posible sobreexpresión de los receptores B1 y/o B2 sobre las células U87-MG, haciendo de este compuesto un control adecuado para los experimentos de determinación de Ca^{2+} intracelular. Para estos ensayos, se utilizaron concentraciones máximas de bradicinina de $1 \mu\text{M}$.

Por otro lado, para determinar si los receptores de bradicinina que están participando en la respuesta de estas células son también regulados por acción de la PKC, se realizó el mismo protocolo de incubación con PMA previamente descrito. Los datos mostraron un decremento significativo de la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la bradicinina, con una respuesta máxima de aproximadamente 590 nM. Esto indica que los receptores para bradicinina expresados en esta línea celular pueden ser también regulados por acción de alguna isoforma de la PKC, la cual, al igual que con los GPCR's para LPA, podría fosforilar al receptor, desensibilizándolo e internalizándolo, llevando a una atenuación importante de la respuesta celular. Esto es interesante, ya que al día de hoy, no hay registro en la literatura que indique la regulación de dos diferentes tipos de GPCR's por una misma cinasa en esta línea celular. El uso de la bradicinina como control, ha permitido validar la funcionalidad de las células después del proceso de manipulación necesario para llevar a cabo los ensayos de determinación de Ca^{2+} intracelular, de modo que, todos los datos presentados han podido ser validados mediante el uso de este compuesto como control.

Como se ha visto hasta aquí, el PMA es capaz de activar a la PKC, ejerciendo un efecto notable sobre los receptores de LPA, lo que se traduce en una atenuación importante y significativa en la movilización de Ca^{2+} intracelular como respuesta al LPA. Estos datos han sido probados mediante la incubación de las células con PMA durante 5 minutos, sin embargo, un tiempo de incubación mucho más prolongado debería tener efectos diferentes a los iniciales debido a la constante y prolongada estimulación de la PKC, ya que la funcionalidad de esta cinasa se vería modificada y por ende, los efectos ya observados en la respuesta celular sufrirían una modificación drástica.

Para corroborar esta hipótesis, las células fueron incubadas 12 horas con $1 \mu\text{M}$ de PMA. Posterior a las 12 horas de incubación y durante los ensayos, el protocolo experimental fue exactamente el mismo que los anteriores: las células fueron incubadas durante 5 minutos en ausencia o presencia de PMA $1 \mu\text{M}$ y posteriormente estimuladas con LPA $1 \mu\text{M}$.

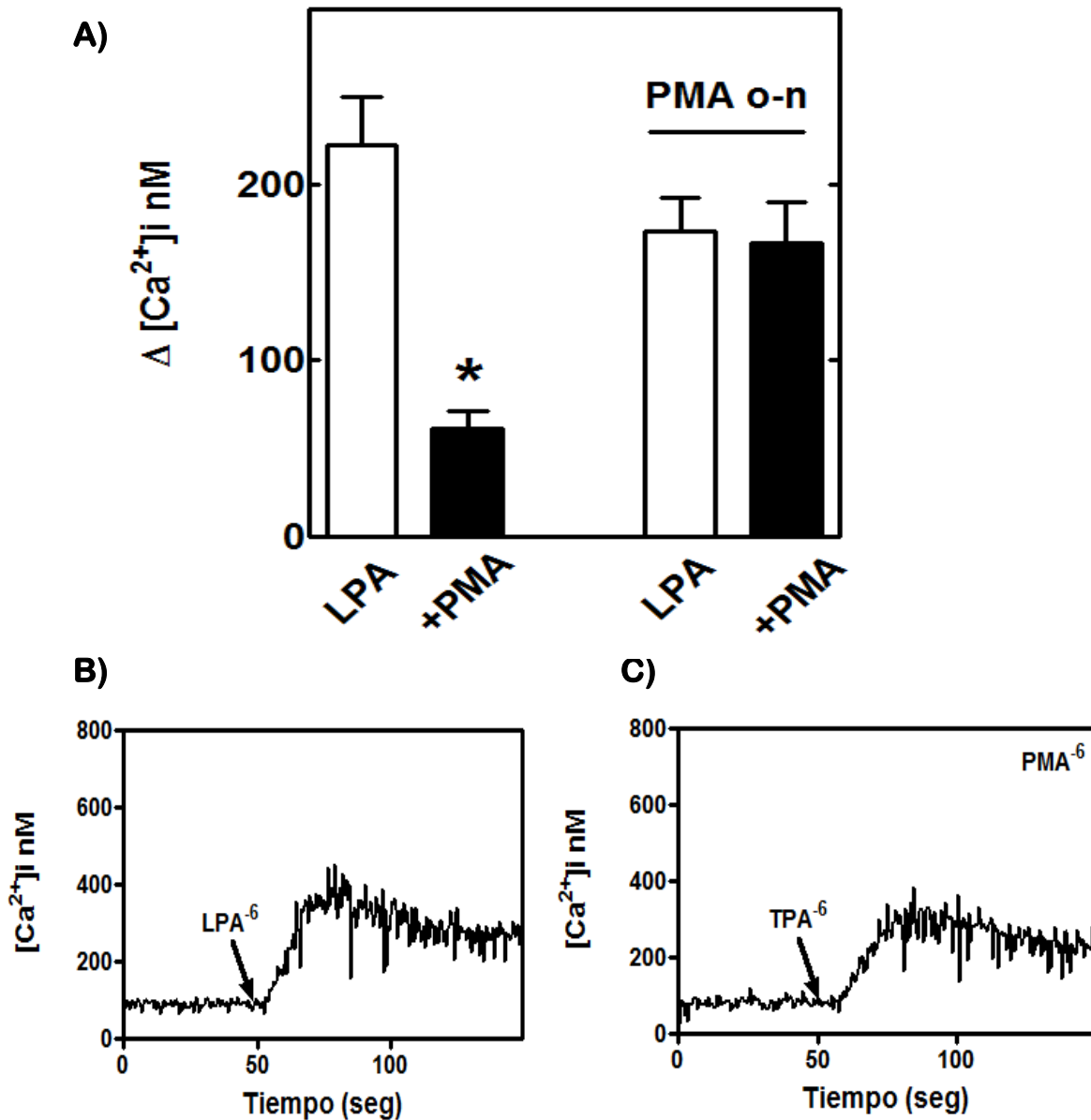


Figura 5: Gráfica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por LPA con PMA over-night. **A)** La gráfica muestra una comparación de la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a LPA entre las células incubadas sólo 5 minutos con PMA durante los experimentos y aquellas incubadas durante 12 horas. Los datos muestran que, mientras existen diferencias significativas en la disminución de la respuesta celular por LPA cuando éstas son incubadas por 5 minutos, por el otro lado, no existen diferencias significativas en la respuesta celular por LPA cuando éstas son incubadas con PMA durante 12 horas. Los datos se presentan como \pm SEM con al menos 5 experimentos independientes y fueron analizados con una prueba t de student con una $p < 0.05$. **B)** y **C)** Se muestran figuras representativas de la respuesta celular por LPA cuando las células son incubadas con PMA 12 horas con y sin la incubación previa de 5 minutos con PMA.

Los datos presentados en la figura 5 resultan muy interesantes, ya que muestran una clara disminución en la acción de la PKC como consecuencia de la prolongada estimulación por PMA. Esto nos dice que, al igual que los GPCR's, la PKC puede ser desensibilizada como consecuencia de la exposición a una estimulación prolongada, atenuando su actividad enzimática y por ende, modificando el patrón de fosforilación, desensibilización e internalización de los GPCR's para LPA. Las figuras representativas muestran que, además de la incubación "over-night", las células fueron incubadas con PMA 5 minutos antes de los ensayos, sin embargo, a diferencia de los datos presentados en la figura 3, la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta al LPA no se modificó en lo absoluto.

Por otro lado, aunque fue posible observar la desensibilización de la PKC por la estimulación prolongada con PMA, fue necesario determinar qué tipo de isoforma de la PKC está actuando sobre los GPCR's para LPA. Para esto, se emplearon los inhibidores selectivos de las isoformas de la PKC disponibles en el laboratorio. Estos inhibidores permiten inhibir la actividad funcional de la PKC, la cual fue previamente activada por PMA, de modo que los GPCR's para LPA dejan de ser fosforilados y pueden señalizar adecuadamente. De esta forma, la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta al LPA se vería recuperada parcial o completamente dependiendo de la isoforma de la PKC inhibida. Los inhibidores selectivos empleados fueron los siguientes:

- Bisindolilmaleimida I (BIM-1): Selectivo para PKC- α , β I, β II, ζ , δ y ϵ .
- Gö6976: Selectivo para PKC- α y β .
- Rotelina: Selectivo para PKC- δ .
- Hispidina: Selectivo para PKC- β .

El protocolo consistió en incubar a las células con cada uno de los inhibidores selectivos 1 μ M por 5 minutos, posteriormente, se incubaron las células con PMA 1 μ M durante 5 minutos con el fin de activar a la PKC. Después, las células fueron estimuladas con LPA 1 μ M para observar el efecto de la recuperación de la respuesta celular debido a la acción de cada uno de los inhibidores.

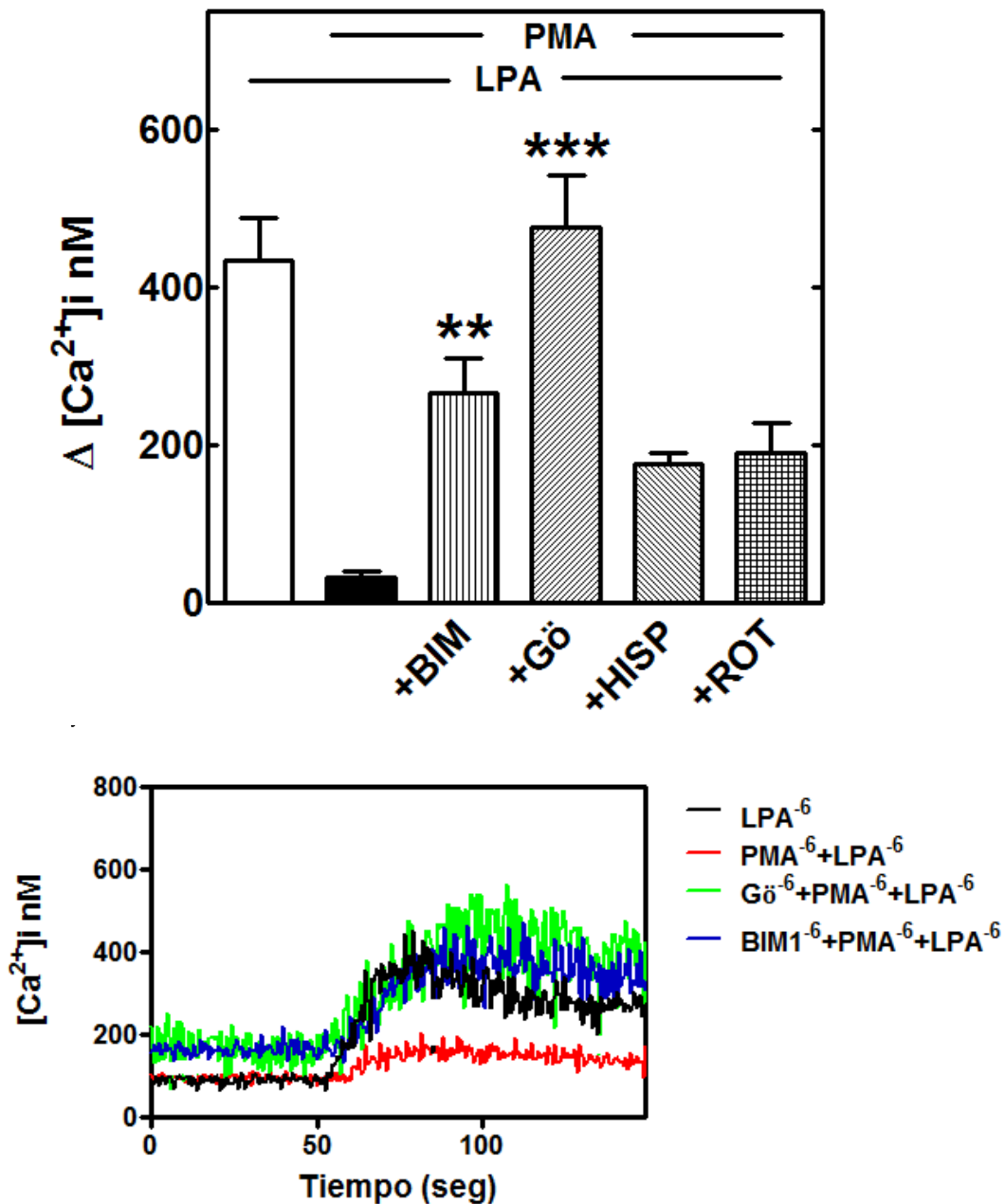


Figura 6: Gráfica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por acción de los inhibidores de la PKC. A) Se usaron concentraciones constantes de cada compuesto para determinar la inhibición de la PKC previamente estimulada mediante la cuantificación de la movilización de Ca^{2+} intracelular. La gráfica muestra que los inhibidores BIM1 y Gö generan una recuperación parcial y total respectivamente de la respuesta celular con diferencias significativas. Por otro lado, los inhibidores Hispidina y Rotelina no tuvieron ningún efecto significativo sobre la recuperación de la respuesta celular. Los datos se presentan como \pm SEM con al menos 5 experimentos independientes y fueron analizados con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $p < 0.05$ así como un análisis post-hoc con la prueba Bonferroni. **B)** Se muestra una figura representativa de la recuperación de la movilización de Ca^{2+} intracelular por acción de los inhibidores de la PKC previamente estimulada. Se representa la acción de los inhibidores BIM1 y Gö6976.

Los datos presentados en la figura 6 muestran que la recuperación de la movilización de Ca^{2+} intracelular por inhibición de la PKC es llevada a cabo por la acción de los inhibidores BIM1 y Gö, es decir, las isoformas de la PKC que participan en la fosforilación de los GPCR's para LPA son α y β . Estos hallazgos resultan muy interesantes debido a la magnitud de la respuesta recuperada por cada uno. Como se señaló anteriormente, BIM1 es un inhibidor selectivo para una gran variedad de isoformas de la PKC, lo cual lo convierte en un inhibidor de amplio espectro, mientras que Gö es selectivo únicamente para las isoformas α y β . Dado que ambos inhibidores comparten dos isoformas (α y β), sería necesario observar una recuperación en la movilización de Ca^{2+} intracelular similar para ambos, sin embargo, Gö presenta una mayor efectividad y respuesta en comparación con BIM1.

Por otro lado, con el fin de identificar los posibles tipos de GPCR's para LPA que expresan las células U87-MG, se empleo el agonista (2S) OMPT, el cual es selectivo para los LPA_3 . El uso de este agonista, permitiría saber si los LPA_3 tienen alguna participación sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta al LPA en estas células. De ser cierta esta hipótesis, la estimulación con este agonista generaría una respuesta celular dependiente tanto de la concentración del ligando, como de la expresión y participación de los LPA_3 , por este motivo, se realizó una curva dosis-respuesta. Es importante mencionar, que actualmente se cuentan con muy pocos agonistas y antagonistas selectivos para los receptores de LPA, lo que hace difícil su uso como indicadores de la expresión de alguno o varios GPCR's para este fosfolípido.

Los resultados presentados en la figura 4 muestran que como agonista selectivo, el (2S) OMPT fue menos efectivo y potente en comparación con el LPA. Esto nos sugiere una posible participación parcial de los LPA_3 en la movilización de Ca^{2+} intracelular en estas células. Como se mencionó al inicio de este proyecto, las líneas celulares pueden expresar una variedad de subtipos de receptores para el mismo ligando. En el caso de las U87-MG, la expresión de los LPA_3 puede ser vista por la respuesta parcial que genera el agonista (2S) OPMT; sin embargo, esto sugiere la participación de al menos otro subtipo de receptor para LPA en estas células.

Los datos mostraron una respuesta dependiente de la concentración del agonista, con una respuesta mínima de 36.31 nM y una respuesta máxima de 109.7 nM así como una EC50 de 188 nM.

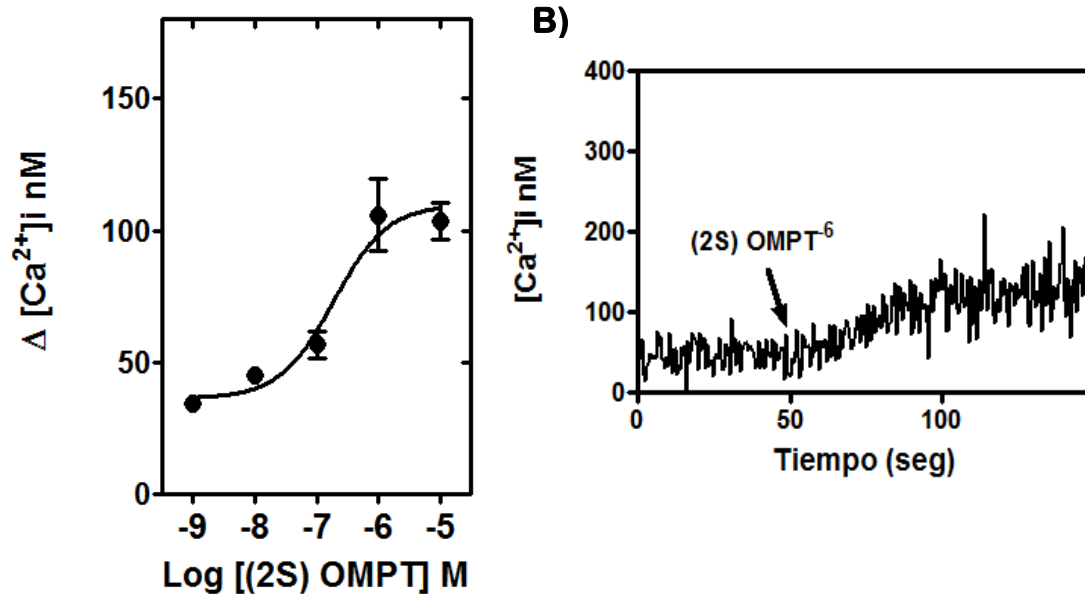


Figura 7: Curva dosis-respuesta para el agonista selectivo (2S) OMPT. A) Se usaron concentraciones crecientes del agonista selectivo (2S) OMPT desde 10^{-9} hasta 10^{-5} . La EC50 fue de 188 nM. Los datos se presentan como \pm SEM y se realizaron al menos cinco experimentos independientes. **B)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células U87-MG por LPA. La concentración del agonista utilizada en esta figura es de 1 μ M.

Con el objetivo de profundizar aún más en la determinación de los subtipos de receptores que median la respuesta celular por LPA, se empleó el antagonista Ki16425, el cual es selectivo para los receptores LPA_1 y los LPA_3 . Esto permitiría elucidar si los LPA_1 tienen una participación en conjunto con los LPA_3 sobre la respuesta celular. De ser así, el Ki16425 disminuiría de forma importante la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la estimulación por LPA.

Los datos mostraron un decremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular dependiente de la concentración del antagonista, con una respuesta mínima de 11.32 nM, una respuesta máxima de 214.1 nM así como una IC50 de 79.16 nM.

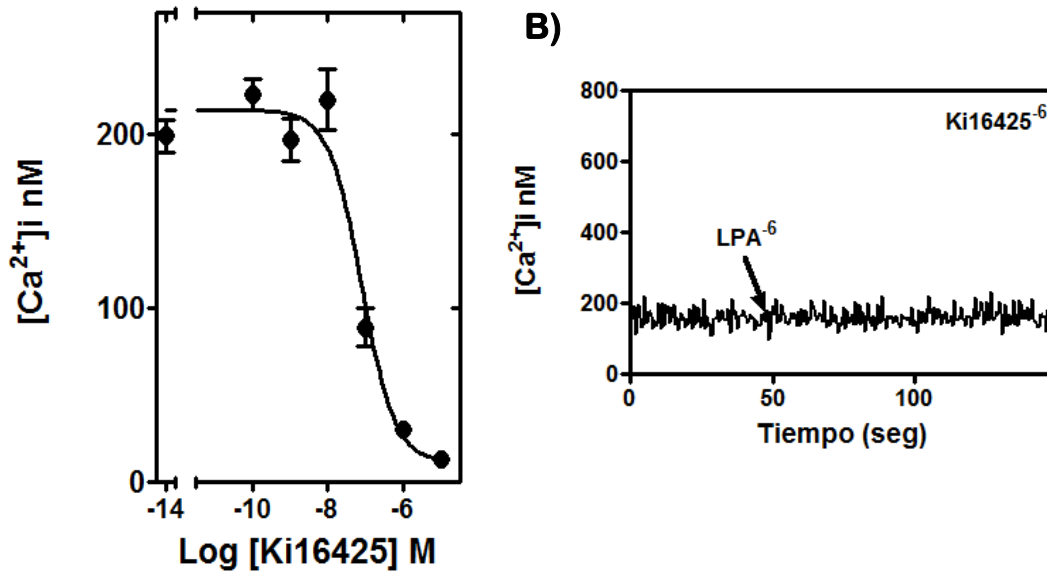


Figura 8: Curva dosis-respuesta para el antagonista selectivo Ki16425. A) Se usaron concentraciones crecientes del Ki16415 desde 10^{-11} hasta 10^{-5} , mientras que la concentración del LPA empleada fue siempre la misma $1 \mu\text{M}$. La IC_{50} fue de $79\text{-}16 \text{ nM}$. Los datos se presentan como $\pm\text{SEM}$ y se realizaron al menos cinco experimentos independientes. **B)** Se muestra una figura representativa de la respuesta de las células U87-MG incubadas con el Ki16425 y posteriormente estimuladas con LPA.

Los datos presentados en la figura 8 muestran un decremento importante y casi total en la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta al LPA debido a la selectividad del antagonista Ki16425 por los receptores LPA_1 y LPA_3 . Esto sugiere la participación de ambos receptores en la regulación de la respuesta celular por LPA. El efecto del Ki16425 fue muy parecido al que ejerce el PMA sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a LPA, sin embargo, el primero actúa antagonizando los receptores, impidiendo la asociación de la molécula de LPA con éstos, mientras que el segundo activa a las isoformas α y β I de la PKC, la cuales fosforilan, desensibilizan e internalizan a los receptores de LPA.

Hasta aquí, el uso de agonistas y antagonistas selectivos como método de estudio farmacológico en esta línea celular ha permitido la identificación de dos diferentes subtipos de receptores que regulan la respuesta celular por LPA: LPA_1 y LPA_3 . Y aunque esto pudiera indicar la participación total de estos dos subtipos de GPCR's, la línea celular U87-MG pudiera expresar algún otro subtipo de receptor, sin embargo, la falta de agonistas y antagonistas selectivos para estos receptores hacen imposible esta labor.

Además de la identificación de receptores por ligandos selectivos, es posible detectar la participación de proteínas G en la señalización de estos GPCR's mediante el uso de toxinas bacterianas. Como se mencionó al inicio de esta investigación, una de estas formas de detección es el uso de la toxina pertussis, la cual es capaz de actuar selectivamente sobre $G\alpha_{i/o}$, reduciendo de forma permanente la inactivación de la AC y por ende, alterando los niveles de cAMP. Debido a que tanto los LPA_1 como los LPA_3 pueden acoplarse a $G\alpha_{i/o}$, el uso de esta toxina permitiría ver un decremento importante en la movilización de Ca^{2+} intracelular mediado por la señalización de los GPCR's para LPA.

Para corroborar esta hipótesis, las células fueron incubadas 12 horas con 100 ng/ml de PTX. Posterior a las 12 horas de incubación, el protocolo experimental de estimulación con LPA se realizó con una concentración máxima de 1 μ M. Al igual que los protocolos anteriores, se empleó el uso de bradicinina como control, con una concentración máxima de 1 μ M.

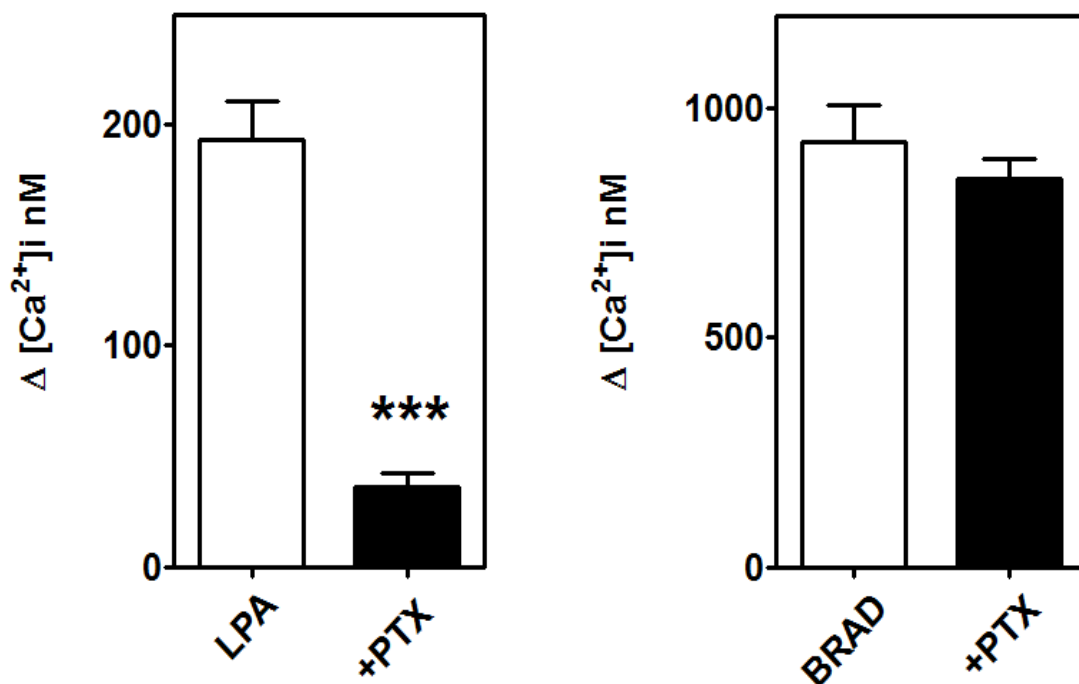


Figura 9. Gráfica comparativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular por PTX y LPA. A) El efecto de la incubación por 12 horas con PTX genero un decremento importante y significativo de la respuesta celular cuando éstas son estimuladas con LPA 1 μ M. **B)** El efecto de la incubación por 12 horas con PTX no generó cambios significativos en la respuesta celular cuando éstas son estimuladas con bradicinina. Los datos se presentan como \pm SEM con al menos 5 experimentos independientes y fueron analizados con una prueba t de student con una $p < 0.05$

Los datos presentados en la figura 9 muestran una disminución importante en la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta al LPA, sin embargo, esto no sucede cuando las células son estimuladas con bradicinina. El primer resultado indica claramente la participación de la proteína $\text{G}\alpha_{i/o}$ en la señalización de los GPCR's para LPA. Esto se esperaba, ya que los receptores LPA_1 y LPA_3 se acoplan a $\text{G}\alpha_{i/o}$, de forma que el uso de PTX confirma la participación de estos dos receptores en la respuesta a LPA. Sin embargo, es importante destacar que también los LPA_1 y los LPA_4 se acoplan a $\text{G}\alpha_{i/o}$, de forma que estos podrían también expresarse en esta línea celular, aunque la caída total de la respuesta celular por el Ki16425 hace parecer que los LPA_1 y los LPA_3 son los únicos responsables de la movilización de Ca^{2+} en respuesta al LPA. Por otro lado, los efectos de la incubación con PTX sobre la respuesta a bradicinina no generó una disminución significativa en la movilización de Ca^{2+} intracelular, lo que sugiere que los receptores para bradicinina expresados en estas células no están acoplados a la proteína $\text{G}\alpha_{i/o}$, sino probablemente con $\text{G}\alpha_{q/11}$.

II. Análisis microscópico

Como se mencionó anteriormente, la estimulación con LPA tiene efectos importantes sobre diversas células neuronales. Esto ha sido ampliamente documentado a través del uso de diversas líneas celulares, las cuales han mostrado cambios estructurales cuando son estimuladas con LPA. En el caso de la línea células U87-MG, este tipo de cambios no ha sido documentado. Por ello, para determinar si el LPA tiene algún efecto estructural sobre esta línea celular, se llevó a cabo un análisis microscópico mientras las células eran estimuladas con LPA.

Para llevar a cabo esto, se sembraron aproximadamente 4000 células en cajas Petri de cristal y 24 horas antes del experimento, las células fueron ayunadas para evitar que estuvieran siendo estimuladas. De esta forma, los efectos del LPA serían observados de mejor manera. Se partió de dos grupos, en el primero se estimularon a las células con el vehículo (H_2O), mientras que para el segundo se estimuló con el LPA a una concentración de $1 \mu\text{M}$ durante 1 hora (Figura 10). Por otro lado, con el fin de determinar la eficacia del antagonista Ki16425, se usaron dos grupos más: en el primero se estimularon a las células con el vehículo (H_2O), mientras que para el segundo se incubaron a las células con el antagonista en una concentración de $1 \mu\text{M}$ por 5 minutos y, posteriormente se estimularon a las células con LPA a una concentración de $1 \mu\text{M}$ durante 1 hora (Figura 11).

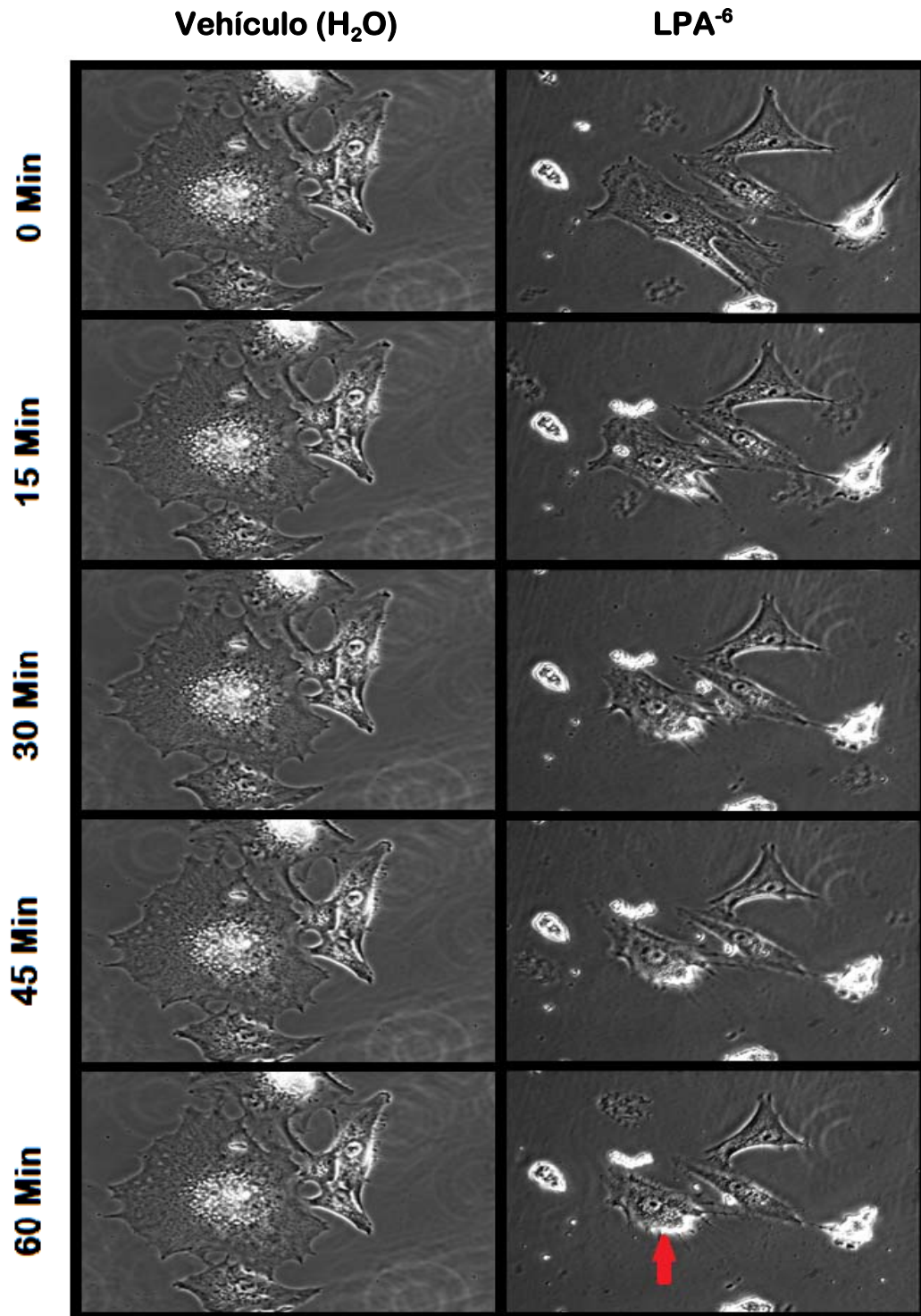


Figura 10. Estimulación de las células con LPA: En el primer grupo, las células fueron estimuladas con el vehículo (H₂O) durante 1 hora. En el segundo grupo, las células fueron estimuladas con LPA 1 μ M durante 1 hora. Se observan cambios importantes en la estructura y tamaño de las células cuando estas son estimuladas con LPA (flecha roja).

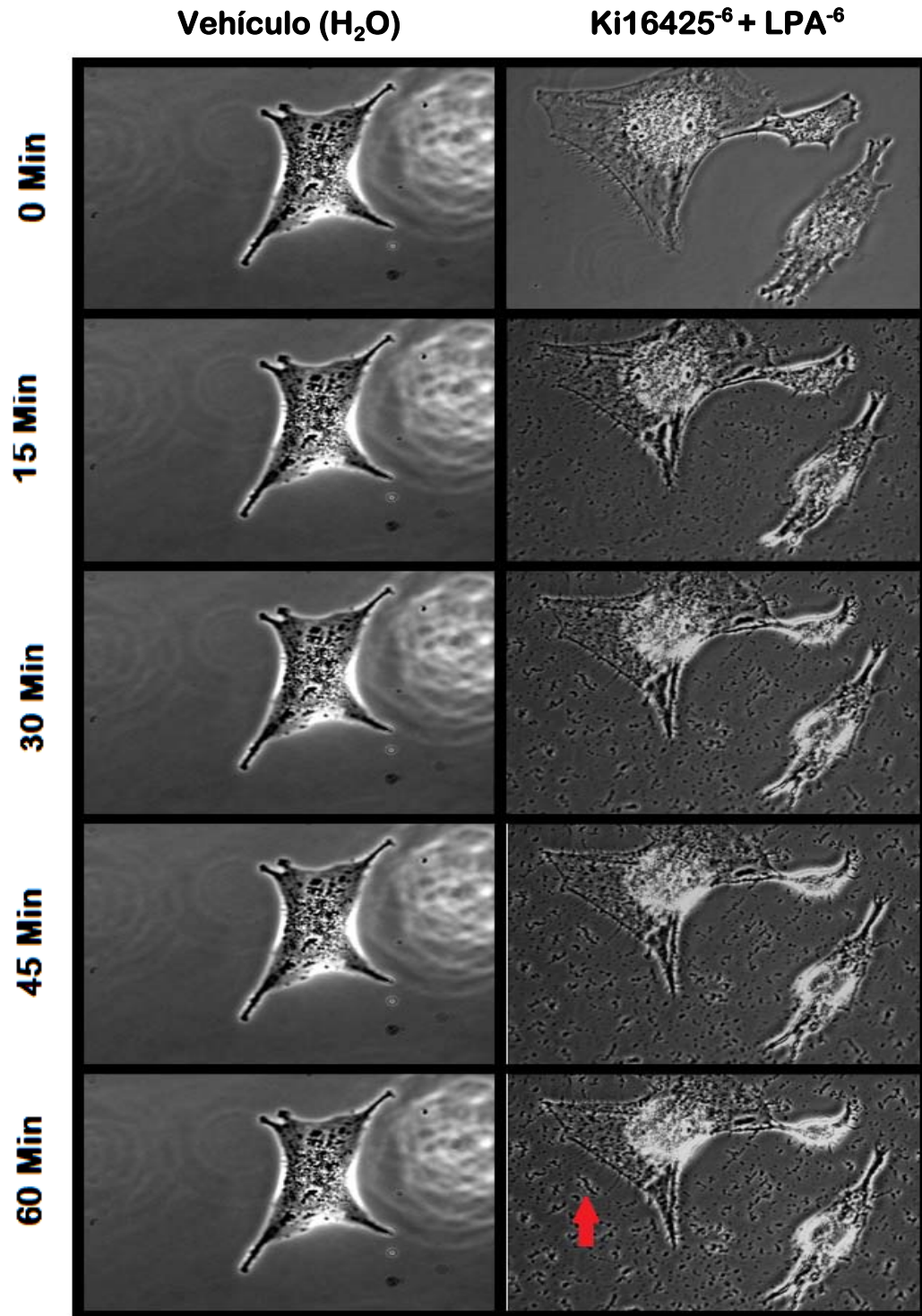


Figura 11: Incubación de las células con Ki16425 y estimuladas con LPA: En el primer grupo, las células fueron estimuladas con el vehículo (H₂O) durante 1 hora. En el segundo grupo, las células fueron incubadas con el antagonista Ki16425 1 μ M por 5 minutos y posteriormente estimuladas con LPA 1 μ M durante 1 hora. Aunque no se observan cambios importantes en la estructura y tamaño de la célula, si se pueden apreciar partículas que las células expulsan a lo largo del tiempo (flecha roja). Estas partículas se empiezan a observar inmediatamente después de que se incuban a las células con el antagonista, no con el LPA.

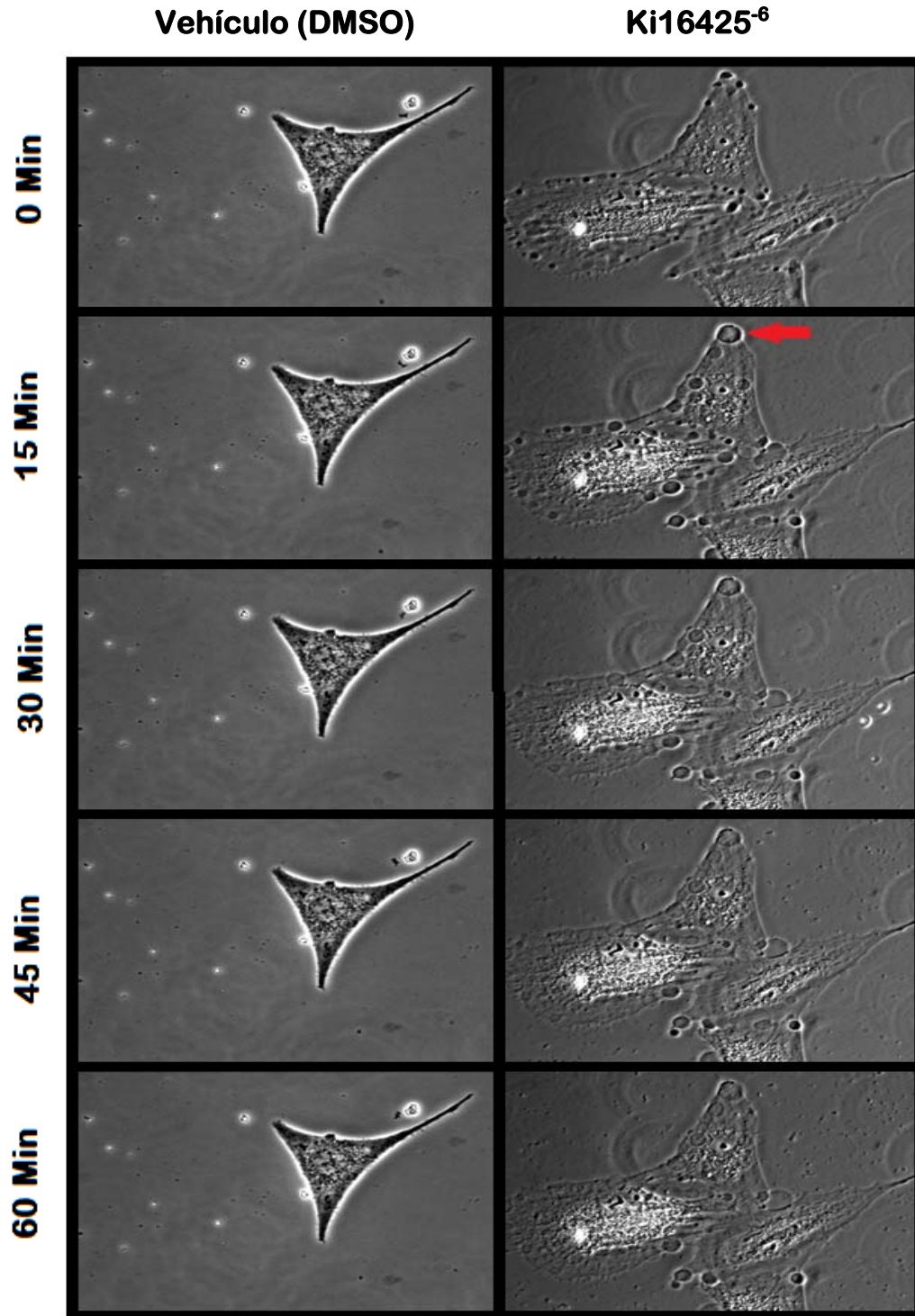


Figura 12. Estimulación de las células con Ki16425: En el primer grupo, las células fueron estimuladas con el vehículo (DMSO) durante 1 hora. En el segundo grupo, las células fueron incubadas únicamente con el antagonista Ki16425 $1 \mu\text{M}$ durante 1 hora. Al igual que en la figura 11, aunque no se observan cambios importantes en la estructura y tamaño de la células, si se observan partículas que son expulsadas por las células inmediatamente después de la administración del antagonista así como “burbujas” que son derivadas de la membrana de la célula (flecha roja).

Como se muestra en la figura 10, el LPA tuvo efectos importantes sobre la estructura y tamaño de las células, reduciendo el tamaño de éstas de forma inmediata. Dichos hallazgos muestran que el LPA está actuando inmediatamente sobre sus GPCR's en esta línea celular. Para corroborar los anteriores resultados asociados a la posible expresión de los receptores LPA₁ y LPA₂ en estas células, se incubaron a las células con el antagonista Ki16425 5 minutos antes de estimularlas con LPA. De ser igual de efectivo, el antagonista bloquearía el efecto del LPA sobre las células, impidiendo los cambios en su tamaño y forma. La figura 11 muestra que aunque el antagonista logró bloquear la acción del LPA, las células liberaron partículas inmediatamente después de la administración del antagonista. Este hallazgo muestra que el antagonista por si solo está teniendo un efecto sobre las células.

III. Activación de ERK 1/2

Para corroborar que el antagonista por si solo causa esta liberación de partículas en las células, se estimularon a las células únicamente con el antagonista durante 1 hora. La figura 12 muestra el mismo patrón de acción del antagonista sobre las células, incluso se puede apreciar la aparición de "burbujas" derivadas de la membrana plasmática. Estos hallazgos indican que el antagonista parece no solo bloquear los GPCR's para LPA, sino que también genera cambios a nivel intra y extracelular.

Por otro lado, se determino si el LPA es capaz de activar la vía de señalización de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) mediante ensayos de Western-Blot. Debido a los resultados encontrados en el análisis microscópico, fue necesario determinar si el antagonista Ki16425 también activaba estas cinasas. De ser cierta esta hipótesis, se comprobaría que el antagonista por si solo tiene un efecto a nivel intracelular además de su acción como bloqueador de los GPCR's para LPA. Los tiempos de estimulación con LPA 1 μ M y con el antagonista Ki16425 1 μ M fueron de 1, 2, 5, 15 y 30 minutos. Mientras que para determinar si con el antagonista se bloqueaba la activación de estas cinasas, se incubaron las células con el antagonista 1 μ M durante 5 minutos y posteriormente se estimularon con LPA 1 μ M en los tiempos previamente mencionados.

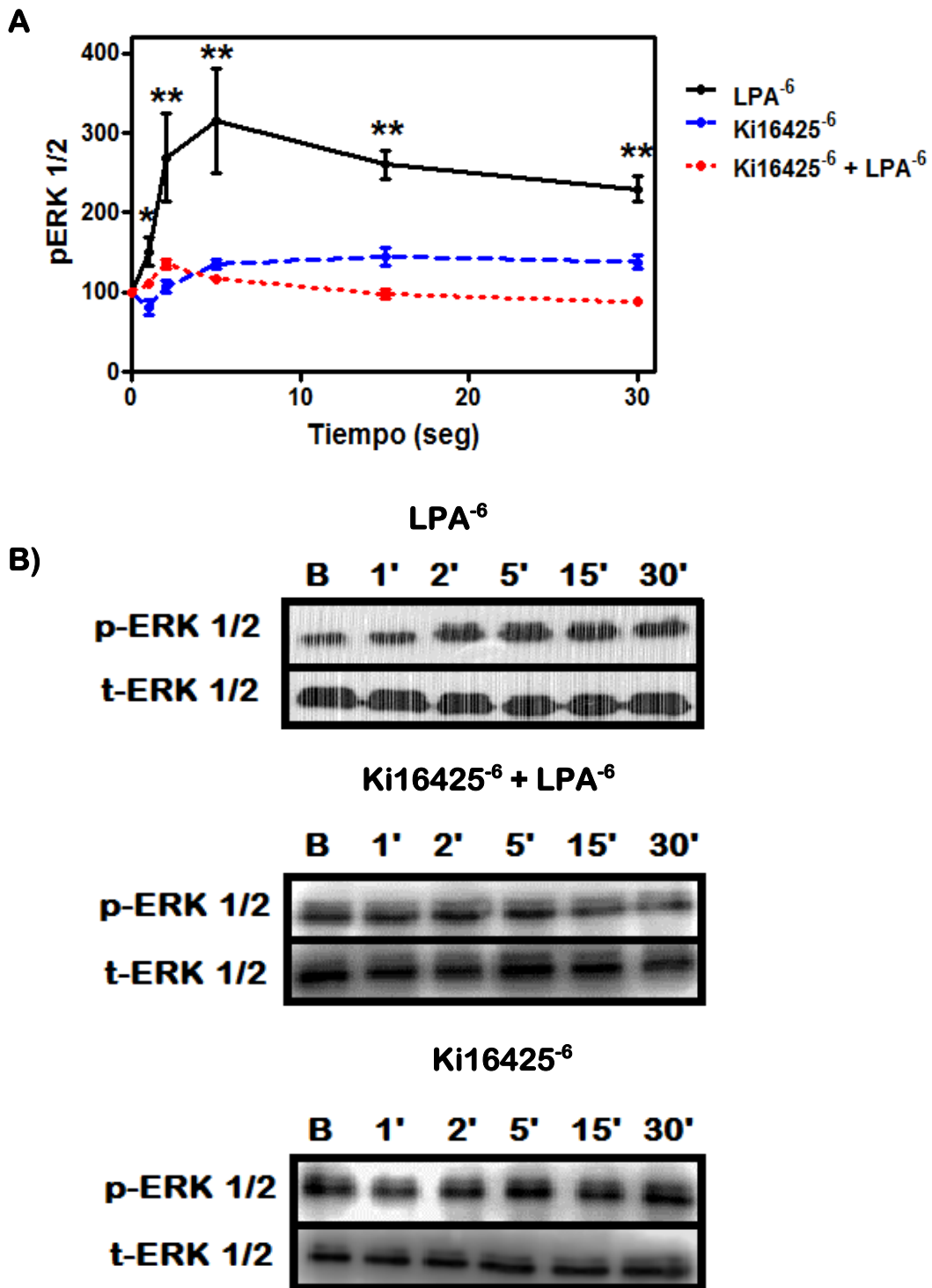


Figura 13. Activación de ERK por LPA y Ki16425: Gráfica de fosforilación de ERK 1/2 por acción de LPA, Ki16425+LPA y Ki16425. **A)** Se muestran los niveles de fosforilación de ERK 1/2 por acción del LPA, Ki16425 + LPA y Ki16425 con diferencias significativas entre los grupos. LPA genera mayores niveles de fosforilación en comparación con Ki16425+LPA y Ki16425; sin embargo, estos dos últimos tienen un nivel de fosforilación similar. Los datos se presentan como \pm SEM con al menos 5 experimentos independientes y fueron analizados con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $p < 0.05$ así como un análisis post-hoc con la prueba Bonferroni. **B)** Se muestran los Western-Blot para t-ERK 1/2 (total) y p-ERK 1/2 (fosfo) para los tres grupos.

Los datos presentados en la figura 14, muestran que tanto el LPA así como el antagonista son capaces de activar y fosforilar ERK 1/2. Es importante mencionar que los valores presentados para los niveles de fosforilación son arbitrarios. Sin embargo, se puede hacer un análisis comparativo de estos valores, de esta forma, se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Como se observa en la gráfica, el LPA genera niveles elevados de fosforilación, observándose el pico más alto de actividad en el minuto 5. Por otro lado, los valores observados cuando las células son incubadas con el antagonista y posteriormente estimuladas con LPA, muestran un patrón activación mucho menor, observándose el pico más alto de actividad en el minuto 2. Esto resulta interesante, ya que el efecto del LPA se está bloqueando por completo con el antagonista; sin embargo, es posible apreciar un patrón de fosforilación importante. Esto nos lleva a la hipótesis de que si el LPA ya no está ejerciendo un efecto, entonces esta activación de ERK 1/2 sería causado por el antagonista. Para elucidar esto, se estimularon a las células únicamente con el antagonista. Como se comprueba, el antagonista por sí solo genera un patrón de fosforilación similar al anterior, observándose el pico más alto de actividad en el minuto 15.; sin embargo, este efecto no es estadísticamente significativo con el grupo Ki16425+LPA. Esto nos dice que el antagonista, tal como lo vimos en el análisis microscópico, genera efectos intracelulares, además de sus propiedades como bloqueador de los GPCR's para LPA.

DISCUSIÓN

Introducción:

El Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación de una gran variedad de procesos neuronales. Al igual que las células de otros órganos y sistemas, las neuronas usan las fuentes intra y extracelulares de Ca^{2+} para llevar a cabo múltiples procesos biológicos, entre los que destacan aquellos asociados a su participación como segundo mensajero. (Carafoli, 2002). Esto ha permitido conocer en gran medida los mecanismos responsables de la regulación de las funciones neuronales por la liberación y afluencia de Ca^{2+} intracelular (Berridge, 1998).

Los resultados presentados muestran que el LPA es capaz de generar una variedad de respuestas biológicas mediante la participación del Ca^{2+} como segundo mensajero en la línea celular U87-MG. Esto se determinó mediante ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular. Así mismo, se logró determinar la participación de al menos dos GPCR's para LPA en esta células; LPA_1 y LPA_3 , los cuales son regulados por acción de las isoformas α y β de la PKC.

Por otro lado, fue posible determinar la participación de la proteína $\text{G}\alpha_{i/o}$ en el proceso de señalización en los GPCR's para LPA. Los hallazgos presentados también muestran los efectos del LPA así como del propio antagonista Ki16425 sobre la estructura y tamaño de las células. Y finalmente, se logro determinar la participación y activación de ERK 1/2 por acción del LPA y del antagonista Ki16425.

Modulación de los GPCR's para LPA por la PKC:

Los esteres de forbol, potentes promotores tumorales, han sido utilizados ampliamente como sustitutos del DAG para la activación inicial de la PKC con el traslado de ésta hacia la membrana plasmática, donde es capaz de llevar a cabo diversos procesos celulares entre los que se encuentran la fosforilación e internalización de los GPCR's. A diferencia del DAG, los ésteres de forbol no son fácilmente metabolizados, lo cual resulta en una mayor y prolongada activación de la PKC (Newton, 1995).

La caracterización y denominación de la PKC como un "receptor" para estos compuestos, ha aportado importantes avances en la comprensión de los sitios de unión de las diferentes isoformas de la PKC para los ésteres de forbol así como su interacción con diferentes ligandos. Estudios con radioligandos ha permitido demostrar que los ésteres de forbol se unen a las distintas isoformas de la PKC con

una alta afinidad en presencia de fosfatidilserinas como cofactores, dejando claro que tanto el DAG como los ésteres de forbol comparten los mismos sitios de unión en la PKC y por ende, similares funciones (Ron & Kazanietz, 1999).

Bajo esta perspectiva, la incubación de la células con PMA permitiría desensibilizar los GPCR's para LPA. Sin embargo, este fenómeno sólo sucedería si estos GPCR's fueran modulados por esta cinasa. Los datos que muestran la modulación de los receptores para LPA por PMA en las células U87-MG resultan interesantes. La curva dosis-respuesta de inhibición muestra una reducción en la movilización de Ca^{2+} intracelular por activación y acción de la PKC, con una IC50 de 1 nM. Esto permitió demostrar que la PKC modula la acción y señalización de estos receptores (Fig. 1).

Esta participación de la PKC fue comprobado con la incubación de las células con PMA "over-night", las cuales mostraron una recuperación en la movilización de Ca^{2+} intracelular en comparación con aquellas que no fueron incubadas con PMA. Este fenómeno responde a una desensibilización de la PKC por la prolongada acción del PMA. Sin embargo, más interesante resulto elucidar las diversas isoformas de esta cinasa que participan en dicho proceso. Los datos presentados en la figura 6 muestran que las isoformas α y β 1 son las responsables de la fosforilación y desensibilización de los receptores para LPA en esta línea celular. Es importante destacar que la respuesta recuperada por acción del inhibidor BIM1 es mucho menor que aquella recuperada por Gö. Esto resultaría irrelevante si no fuera por el hecho de que BIM1 es un inhibidor de amplio espectro que es capaz de inhibir las mismas isoformas que Gö inhibe (α y β 1), por lo tanto, ambas respuestas recuperadas tendrían que tener el mismo nivel; sin embargo, esto no fue así. Esto nos habla de un posible mecanismo de acción diferente por parte de BIM1 en esta línea celular, lo cual hace interesante la planeación de futuras investigaciones.

Por otro lado, vale la pena mencionar que la PKC fue capaz de disminuir la movilización de Ca^{2+} intracelular para los GPCR's para bradicinina. Recordemos que la estimulación con bradicinina fue empleada como grupo control para esta investigación. Esto resulta muy interesante, ya que estos receptores, al igual que los GPCR's para LPA, son modulados por la misma cinasa. Sin embargo, sería necesario en un futuro determinar qué isoformas de la PKC participan en este proceso de fosforilación y desensibilización.

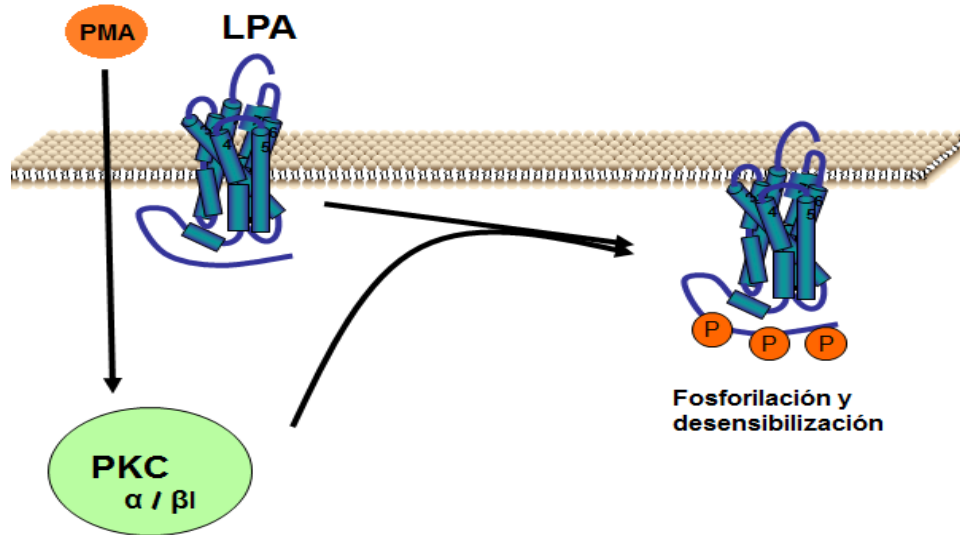


Figura 1: Modelo de activación y acción de la PKC por PMA en los GPCR's para LPA en la línea celular U87-MG. Una vez que la PKC es activada por el PMA, esta ejerce sus funciones fosforilando a los GPCR's para LPA. Una vez fosforilados, los GPCR's se desensibilizan de manera inmediata, atenuando y disminuyendo la respuesta celular, lo que se traduce en una disminución significativa en la movilización de Ca^{2+} intracelular.

Expresión y participación de los receptores LPA_1 y LPA_3 en la señalización y movilización de Ca^{2+} intracelular:

La estimulación de las células U87-MG con LPA permitió determinar los parámetros farmacológicos a partir de la curva dosis-respuesta para LPA, la cual muestra una EC_{50} de 13.3 nM y un incremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular de aproximadamente 308.7 nM. A pesar de esto, la necesidad de conocer los posibles GPCR's que participan en este proceso de señalización llevó al uso de agonistas y antagonistas para LPA disponibles en el laboratorio. Como se mencionó anteriormente, actualmente se carecen de ligandos exógenos efectivos para los GPCR's de LPA, lo que dificulta la labor de estudio de estos receptores a través de la obtención de sus parámetros farmacológicos mediante curvas dosis-respuesta. A pesar de esto, fue posible elucidar la participación de dos receptores para LPA por medio de ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular:

El agonista (2S) OMPT, selectivo para LPA_3 mostro un incremento de la respuesta parcial en comparación con aquella mostrada por el LPA, con una EC_{50} de $-6.7 \mu\text{M}$ y un incremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular de aproximadamente 109.7 nM. Esto en un inicio indico la participación del LPA_3 , sin embargo, debido a la

magnitud de la respuesta total generada por el LPA, se planteó la hipótesis de la posible participación de otros GPCR's para LPA en el proceso de señalización intracelular.

El antagonista Ki16425, selectivo para LPA₁ y LPA₃ fue capaz de reducir la respuesta celular de forma total con una IC₅₀ de 79.16 nM. Este patrón en la reducción de la respuesta celular fue similar a la observada en aquella cuando las células son incubadas con PMA. Esta caída total en la respuesta nos habla de la posible participación de otro GPCR para LPA en el proceso de señalización intracelular; el LPA₁. Esta serie de parámetros farmacológicos derivados de las curvas dosis-respuestas sugieren la expresión y participación de los receptores LPA₁ y LPA₃ en esta línea celular.

Pese al uso tradicional de métodos farmacológicos en la determinación de la expresión y participación de receptores en la respuesta celular, es necesario recurrir a métodos mucho más específicos que muestren todos los posibles receptores presentes en estas células. Para ello, será necesario la planeación del uso de una Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) con el fin de determinar los GPCR's para LPA en esta línea celular.

Efecto de la toxina pertussis sobre el proceso señalización intracelular:

Como se mencionó anteriormente, las toxinas han sido ampliamente utilizadas para determinar el tipo de proteína G que se encuentra acoplada a su respectivo receptor para poder llevar a cabo el proceso de señalización. La incubación con la toxina pertussis permite conocer si el GPCR de interés esta acoplado a la proteína G $\alpha_{i/o}$. De ser así, la respuesta celular se vería ampliamente opacada debido a la acción de la toxina sobre esta proteína. El mecanismo por el cual esta toxina actúa sobre la proteína G $\alpha_{i/o}$ es el siguiente: La toxina se fija a la membrana, penetra y utilizando Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD) del citoplasma celular, produce la ADP-ribosilación de la subunidad α de la proteína G $\alpha_{i/o}$ conduciendo al bloqueo de su acción (Fig. 2) (García-Sainz, 2011).

Los resultados muestran que los GPCR's para LPA se encuentran acoplados a la proteína G $\alpha_{i/o}$, la cual resulta necesaria para llevar a cabo el proceso de señalización intracelular. Esto por lo tanto, resultó en un decremento significativo de la movilización de Ca²⁺ intracelular en células previamente incubadas con la toxina y

estimuladas con LPA. Por otro lado, los datos muestran que aunque los GPCR's para bradicinina son modulados por la PKC, éstos no se encuentran acoplados a la proteína $G\alpha_{i/o}$.

Es importante mencionar que todos los GPCR's se encuentran en un continuo acoplamiento de proteínas G, es decir, cada receptor puede estar acoplado a diversas proteínas G durante diferentes tiempos. En el caso de los GPCR's para LPA, todos los receptores a excepción del LPA_5 se encuentran acoplados a la proteína $G\alpha_{i/o}$, sin embargo, también se acoplan a otras proteínas como $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$. Esto sin duda abre la posibilidad de que los receptores para LPA expresados en esta línea celular tengan diferentes patrones de señalización intracelular

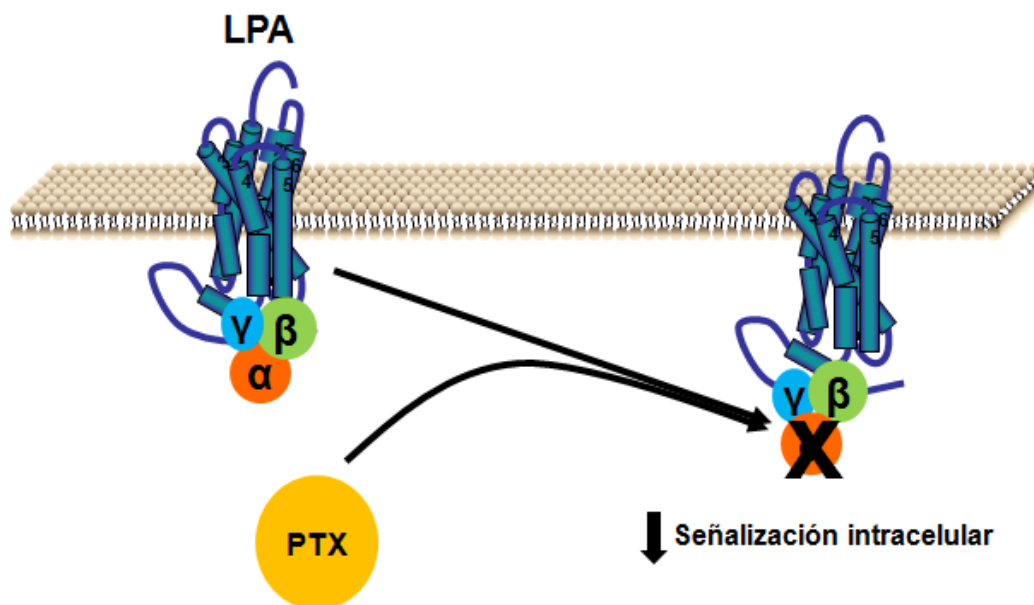


Figura 2: Efecto de la toxina pertussis sobre el proceso de señalización intracelular: La PTX penetra la membrana plasmática para bloquear la acción de la subunidad α de la proteína $G\alpha_{i/o}$. Esto conduce a una disminución en el proceso de señalización intracelular.

Efecto del LPA sobre la estructura y tamaño de las células:

Las imágenes presentadas muestran que el LPA ejerce un importante efecto sobre el tamaño de las células. La administración del LPA $1 \mu\text{M}$ provocó que las células se contrajeran en un lapso de 1 hora en comparación con aquellas que solo fueron estimuladas con el vehículo. Esto nos habla de la participación de los GPCR's para LPA en el proceso de señalización, el cual tiene relevancia en los cambios

intracelulares y extracelulares de las células, confirmando así, una de las propiedades que el LPA ejerce sobre esta línea celular.

La visión tradicional sobre los antagonistas indica que estos son exclusivos bloqueadores de los GPCR's para los cuales son afines, esto no involucra la activación de ningún tipo de respuesta intra o extracelular o cambios estructurales similares a aquellos causados por agonistas. La incubación de las células U87-MG con el antagonista Ki16425 durante 5 minutos, fue capaz de bloquear los efectos en el tamaño y estructura de las células causados por el LPA. Sin embargo, interesante resultó el hecho de que la sola administración del antagonista causó una serie de eventos ajenos aparentemente a lo que un antagonista es capaz de hacer. Las células parecían expulsar una serie de partículas a través de la membrana plasmática, además de la aparición de "burbujas" derivadas de la misma membrana. Cabe destacar que este fenómeno sucedió inmediatamente después de la administración del antagonista y sin la administración del LPA. Aunque después de los 5 minutos de incubación establecida con el antagonista se administró el LPA, las células no dejaban de expulsar estas pequeñas partículas hasta un tiempo de aproximadamente 30 minutos.

Esta serie de eventos parecía romper con el paradigma de que los antagonistas solo bloqueaban los sitios de unión de los ligandos en los receptores, y aunque este fue el caso, los fenómenos observados no obedecen a las funciones esperadas para un antagonista. Para comprobar esto, se estimuló a las células únicamente con el antagonista bajo las mismas concentraciones y tiempos establecidos (1 μ M - 1 hora). Los resultados muestran el mismo fenómeno observado anteriormente, las células expulsaban partículas y la aparición de burbujas derivadas de la membrana plasmática eran aun más evidentes.

Explicar este fenómeno resulta difícil ya que es necesario conocer aún más las propiedades de este antagonista en particular, así como las diversas funciones que esta línea celular lleva a cabo. También es necesario apoyarse de la biología celular para comprender mejor cuáles son las posibles causas que lleven a las células a generar y expulsar estas partículas así como a la formación de "burbujas" derivadas de la membrana plasmática. En un inicio, se pensó que este fenómeno posiblemente era causado por un estrés oxidativo generado en las células debido al DMSO-100%, el compuesto en el que el antagonista tiene que ser diluido. Para descartar esto, se llevó el DMSO a una concentración del 10% (mezclado en H₂O) para diluir el antagonista.

De ser el DMSO-100% responsable, la administración del antagonista con DMSO-10% no generaría este fenómeno de nuevo, sin embargo, esto no sucedió, y las células mostraron las mismas características:

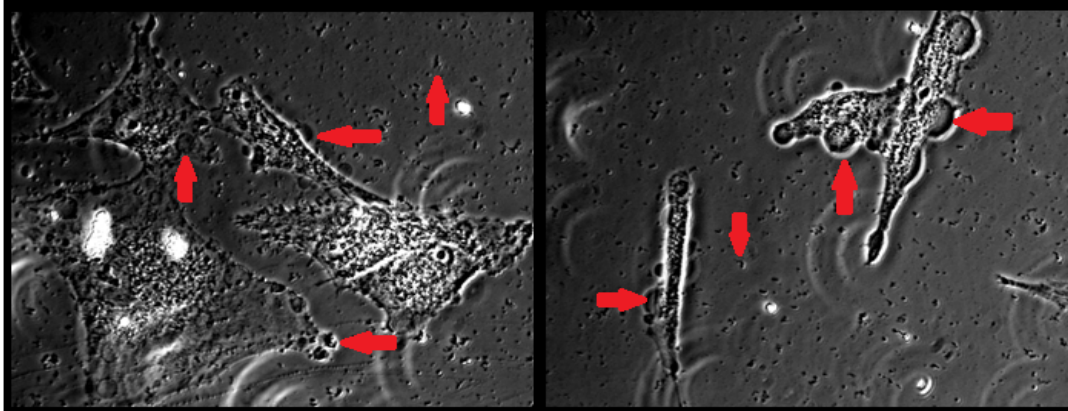


Figura 3: Efecto del antagonista Ki16425 en DMSO-10%: Inmediatamente después de la administración del antagonista Ki16425, las células liberaron una serie de partículas y generan “burbujas” derivadas de la membrana plasmática (flechas rojas).

Como se muestra en la figura 3, el antagonista genera este fenómeno sobre las células, descartándose la posibilidad de estrés oxidativo derivado del DMSO-100%. Por otro lado, la sola administración del DMSO-100% tampoco produjo tal efecto. Investigaciones futuras serán necesarias para establecer las causas de este tipo de respuesta celular y sobre todo, de elucidar las propiedades funcionales del antagonista.

Activación de ERK 1/2 por LPA:

Una variedad de reportes indican que MAPK's son activadas por diversos agonistas y compuestos. Esta activación, particularmente ERK 1/2, juegan un papel importante en un amplio rango de funciones celulares como crecimiento, diferenciación, migración, etc. En la línea celular U87-MG, el LPA es capaz de activar ERK 1/2. Los datos presentados muestran un pico máximo en la fosforilación de estas cinasas a los 5 minutos, el cual decrece hasta el minuto 30. Como se mencionó anteriormente, esta activación de ERK 1/2 puede deberse en parte, al incremento de Ca^{2+} intracelular generado por la estimulación con ligandos. El siguiente esquema, muestra la relación entre el incremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular generada por ligandos y la activación de ERK 1/2, cuya acción se traduce en la fosforilación de diferentes sustratos citoplasmáticos así como en la transcripción genética (Fig. 4).

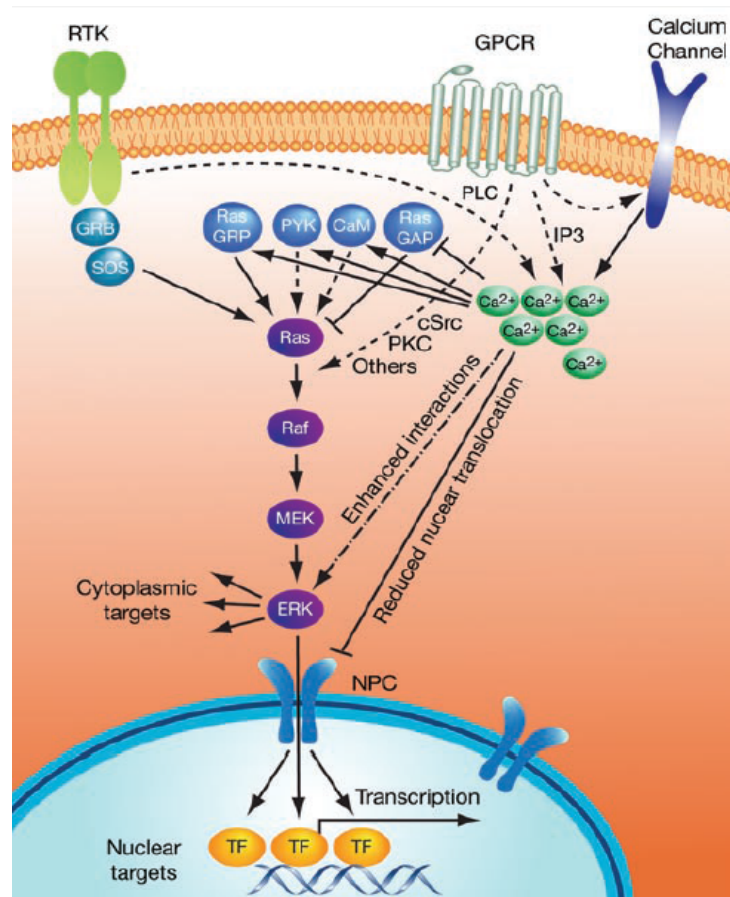


Figura 4: Representación esquemática del mecanismo por el cual la movilización de Ca^{2+} intracelular activa la cascada de ERK 1/2: El incremento del Ca^{2+} intracelular por acción de un ligando sobre un GPCR genera la activación de ERK 1/2, el cual hace blanco sobre diversos sustratos citoplasmáticos así como sobre procesos biológicos llevados a cabo en el núcleo celular.

Por otro lado, la incubación con el antagonista Ki16425 no evitó la activación de ERK 1/2, aunque dicha respuesta no puede ser atribuida al LPA. Como se muestra en la figura 13, la activación de ERK 1/2 con la previa incubación del antagonista mas las estimulación con LPA, generó un pico de fosforilación a los 2 minutos, el cual disminuyó hasta el minuto 30. Sin embargo, esta activación fue mucho menor a la observada con LPA. Esto nos indica que, aunque el antagonista es capaz de bloquear los GPCR's para LPA, no evita que por sí mismo genere una respuesta intracelular a nivel de MAPK's. Esto fue confirmado mediante la estimulación con el solo antagonista. La figura 13 muestra una clara activación de ERK 1/2 generada por la estimulación con el antagonista.

Es importante mencionar, que en el patrón de activación de “Ki16425+LPA”, quien parece generar la activación de ERK 1/2 es el antagonista y no el LPA. Por ello, es importante tener en cuenta que los tiempos reportados corresponden a aquellos por la estimulación con LPA. Esto quiere decir que la activación de ERK 1/2 por el antagonista se encuentra retardada por al menos 5 minutos. Debido a esto, es posible observar una activación menor en este patrón, aunque no significativa, en comparación con aquella generada por el patrón “Ki16425”. Esto confirma la capacidad del antagonista para activar MAPK's en esta línea celular.

Los resultados presentados en esta tesis muestran los diversos efectos que el LPA genera sobre las células U87-MG, los cuales no habían sido reportados con anterioridad. Diversos hallazgos en torno a los componentes y al mismo proceso de señalización del LPA sobre estas células, pudieron ser observados en su mayoría mediante los ensayos de cuantificación de Ca^{2+} intracelular. La participación de dos isoformas de la PKC (α y β) y de la proteína $G\alpha_{i/o}$ en el proceso de señalización de los GPCR's para LPA, fueron parte de los resultados generados en esta investigación.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos a partir de los experimentos con el antagonista Ki16425, tienen que ser valorados y estudiados en otros modelos celulares con el fin de determinar y conocer las propiedades de este compuesto que, bajo la visión tradicional de los antagonistas, su función tendría que estar limitada a la de bloquear los receptores LPA_1 y LPA_3 . Esto abre la posibilidad de que otros compuestos con actividad similar tengan este tipo de efectos y por lo tanto, deban de ser revalorados y estudiados para su uso en la investigación biomédica y en el área clínica

PERSPECTIVAS Y
MODELOS EN
NEUROCIENCIAS

Generalidades:

Los constantes avances de la investigación en las neurociencias hacen necesario el uso de métodos diferentes y fuera de los tradicionales estándares de investigación con los que hasta el día de hoy se cuentan. El uso de líneas celulares de origen neural abre nuevas brechas que permiten comprender mejor los mecanismos intracelulares por los cuales las neuronas llevan a cabo sus funciones biológicas más importantes y por lo tanto, se pueda tener un panorama más amplio y aproximado a las neurociencias.

Además de la línea celular U87-MG, existen otras líneas celulares que pueden ser empleadas como herramientas biomédicas para elucidar los mecanismos de acción de diferentes compuestos y condiciones. Esto por supuesto, genera una serie de reportes que pueden ser “enganchados” en serie con el objetivo de construir protocolos de investigación que revelen los procesos generados en el SN y por los cuales, los procesos cognitivos y conductuales son ejecutados.

En esta tesis, el uso de una línea celular como herramienta ayudo a generar una serie de resultados que pueden ser empleados como antecedentes sobre las acciones del LPA sobre el SN. Otros reportes (Young et al., 1999) han mostrado otros efectos similares del LPA sobre el SN con el uso de líneas celulares distintas, sin embargo, otros más han mostrado resultados que difieren de los presentados aquí. La generación de resultados, podrá contribuir a la comprensión de los actuales paradigmas en las neurociencias. Esta serie de paradigmas pueden ser comprendidos mediante el estudio del SN bajo sus diferentes escalas, es decir, de lo micro a lo macro. En esta tesis, la investigación en lo micro permitió comprender una serie de mecanismos que subyacen a los efectos del LPA sobre ciertas células. En la figura 1 se puede apreciar el proceso por el cual esta serie de paradigmas descritos pueden ser estudiados, sin olvidar en cual escala esta investigación fue llevada a cabo.

Como ejemplo de esta serie de escalas de investigación en torno al LPA, se puede generar una recapitulación de los hallazgos encontrados en esta tesis con aquellos previamente documentados que van desde lo molecular, pasando por los niveles celulares, de circuitos y de regiones, hasta el cerebro como órgano ejecutor de diversas funciones fisiológicas, cognitivas y conductuales.

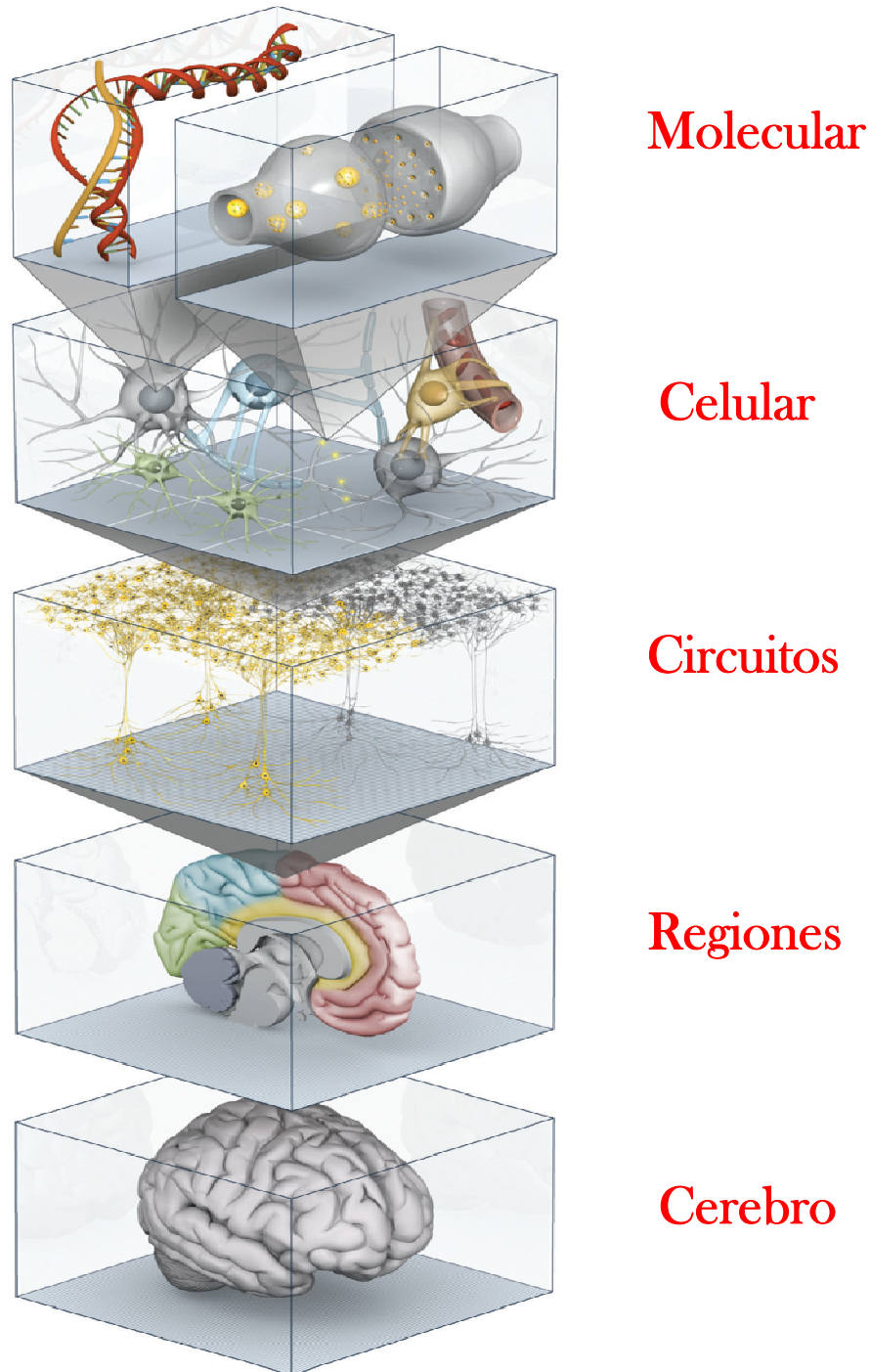


Figura 1. Niveles de estudio e investigación en las neurociencias: Existen diferentes niveles de estudio de los cuales las neurociencias pueden nutrirse mediante empalmes y reconstrucciones de datos y resultados que permitan la construcción de un conocimiento amplio en cada uno de los diferentes niveles. El objetivo de esta investigación puede situarse a niveles moleculares y celulares del esquema.

Los resultados generados en esta tesis pueden ser situados sobre niveles moleculares y celulares con un impacto sobre procesos neurofisiológicos. Brevemente, se puede hacer un análisis de los compuestos y agentes involucrados en esta investigación y su relevancia en procesos estudiados por las neurociencia.

Relevancia del LPA y el Ca^{2+} en procesos neuronales:

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, las modificaciones y alteraciones neurofisiológicas también forman parte de la amplia gama de efectos que el LPA modula, entre estos efectos se encuentran: cambios en el neurodesarrollo desde sus inicios más tempranos a nivel del tubo neural, neurogenesis durante condiciones normales y patológicas, lesiones, algunos tipos de cánceres como los glioblastomas, dolor neuropático, esclerosis múltiple, audición, visión, esquizofrenia y epilepsia (Nobuyuki Fukushima, 2004). Sin embargo, ha resultado difícil elucidar con exactitud la manera en como el LPA participa y genera este tipo de fenómenos, particularmente por que a nivel del SNC, los niveles totales de LPA no son completamente conocidos debido a la dificultad en su medición en compartimentos así como en el fluido cerebroespinal. Pese a esto, se ha logrado avanzar en el reconocimiento de blancos terapéuticos asociados al LPA, cuya finalidad se encuentra en la prevención y tratamiento de ciertos tipos de cáncer cerebral, enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, dolor neuropático, así como desordenes oculares. Esta serie de efectos regulados en parte por el LPA, forman parte la participación que el LPA tiene hasta niveles de la etapa adulta (Frisca, Sabbadini, Goldshmit, & Pébay, 2012).

Por otro lado, el Ca^{2+} ha sido tradicionalmente descrito como un segundo mensajero liberado desde los depósitos intracelulares para llevar a cabo diversos procesos de señalización (Carafoli, 2002). Describir los procesos en los cuales el Ca^{2+} está involucrado a nivel neuronal resultaría difícil. Como segundo mensajero, el Ca^{2+} regula una gran variedad de procesos neuronales, entre los que destacan la actividad de enzimas post-sinápticas, las cuales, generan modificaciones importantes en la estructura y fuerza sináptica. Dos procesos fundamentales que involucran este tipo de modificaciones en la fuerza y en la estructura sináptica son las formas de plasticidad sináptica a largo plazo, tales como la Potenciación a Largo Plazo (LTP) y la Depresión a Largo Plazo (LTD), cuyos procesos requieren de las propiedades de señalización post-sináptica del Ca^{2+} , ya que las modificaciones en la fuerza sináptica,

surgen en los cambios en los receptores locales de glutamato y en la señalización local del Ca^{2+} (Augustine, Santamaria, Tanaka, & Carolina, 2003).

Como en muchos otros procesos neuronales, el Ca^{2+} tiene una relevancia vital que lo perfila como un compuesto clave en los procesos de señalización intracelular, cuyos efectos se ven reflejados en mecanismos ocurridos en ciertas regiones cerebrales como el hipocampo y por supuesto, en procesos tan importantes como el aprendizaje y la memoria.

Finalmente, será necesario el desarrollo de nuevas herramientas y métodos de investigación en neurociencias para conocer con exactitud los procesos de señalización celulares, cuyos datos nos darían nuevos “insights” acerca de los mecanismos exactos por los cuales el LPA y el Ca^{2+} llevan a cabo procesos biológicos que pudiera ser benéficos y/o dañinos para el organismo.

REFERENCIAS

- Alcántara, H. R., Casas, G. P. & García S. J. A. (2005). Signal transduction pathway cross talk. Roles of protein kinases, protein phosphatases and reactive oxygen species. *Current Trends in Endocrinology*, 1, 19-29
- Anliker, B., & Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry*, 279 (20), 20555-8.
- Augustine, G. J., Santamaria, F., Tanaka, K., & Carolina, N. (2003). Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron*, 40, 331-346.
- Azzi, A, Boscoboinik, D., & Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *European journal of biochemistry / FEBS*, 208 (3), 547-57.
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21, 13-26.
- Bohm, A, Gaudet, R., & Sigler, P. B. (1997). Structural aspects of heterotrimeric G-protein signaling. *Current opinion in biotechnology*, 8 (4), 480-7.
- Cabrera-Vera, T. M. (2003). Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews*, 24 (6), 765-781.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (3), 1115-22.
- Chaban, V. V., Cho, T., Reid, C. B., & Norris, K. C. (2013). Physically disconnected non-diffusible cell-to-cell communication between neuroblastoma SH-SY5Y and DRG primary sensory neurons. *American journal of translational research*, 5 (1), 69-79.
- Chuderland, D., & Seger, R. (2008). Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Communicative & integrative biology*, 1(1), 4-5.
- Chun, J. (2005). Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 77 (1-4), 46-51.
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S., & Moolenaar, W. H. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacological Reviews*, 62 (4), 579-587.
- Clark, M. J., Homer, N., O'Connor, B. D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B., et al. (2010). U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS genetics*, 6 (1), 32-46.
- Contos, J. J., Ishii, I., & Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Molecular pharmacology*, 58 (6), 1188-96.

- Cunningham, M. O., Hunt, J., Middleton, S., LeBeau, F. E. N., Gillies, M. J., Gillies, M. G., Davies, C. H., et al. (2006). Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26 (10), 2767–76.
- Drake, M. T., Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2006). Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation research*, 99 (6), 570–82.
- Dottori, M., Leung, J., Turnley, A. M. & Pebay, A. (2008). Lysophosphatidic Acid Inhibits Neuronal Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26, 1146–1154.
- Eguiagaray, J. G., Egea, J., Bravo-Cordero, J. J. & García, A. G. (2004). Neurotransmisores, señales de calcio y comunicación neuronal. *Neurocirugía*, 15, 109-118.
- Estivill-torrús, G., Santín, L. J., Pedraza, C., Castilla-ortega, E., & Fonseca, F. R. De. (2011). Función del ácido lisofosfatídico como regulador lipídico modulador del comportamiento Role of lysophosphatidic acid as lipid mediator in behavior. *Escritos de Psicología*, 4, 1–14.
- Frisca, F., Sabbadini, R. A, Goldshmit, Y., & Pébay, A. (2012). Biological effects of lysophosphatidic acid in the nervous system. International review of cell and molecular biology. *Neuroscience Journal*, 296, 273–322.
- Fukushima, N. (2002). Lysophosphatidic Acid Influences the Morphology and Motility of Young, Postmitotic Cortical Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20 (2), 271–282.
- Fukushima, N., Ye, X., & Chun, J. (2002). Book Review: Neurobiology of Lysophosphatidic Acid Signaling. *The Neuroscientist*, 8 (6), 540–550.
- Fukushima, Nobuyuki. (2004). LPA in neural cell development. *Journal of cellular biochemistry*, 92 (5), 993–1003.
- García-Sáinz., et. al. (1992). Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine*, 10(5), 341-344.
- George, S. R., O'Dowd, B. F., & Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(10), 808–20.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*, 21 (1), 90–113.

- Harrison, S. (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*, 1170–1179.
- Heemskerk, J. W. M., Harper, M. T., Cosemans, J. M. E. M., & Poole, A. W. (2011). Unravelling the different functions of protein kinase C isoforms in platelets. *FEBS letters*, *585* (12), 1711–6.
- Herr, D. R., & Chun, J. (2007). Effects of LPA and S1P on the Nervous System and Implications for Their Involvement in Disease. *Current Drug Targets*, *1*, 155–167.
- Hurowitz, E. H., Melnyk, J. M., Chen, Y. J., Kouros-Mehr, H., Simon, M. I., & Shizuya, H. (2000). Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, *7* (2), 111–20.
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology*, *153*, 379–88.
- Kingsbury, M. A., Rehen, S. K., Contos, J. J. a, Higgins, C. M., & Chun, J. (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nature neuroscience*, *6* (12), 1292–9.
- Kobilka, B. (2013). The structural basis of g-protein-coupled receptor signaling (nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *52* (25), 6380–8.
- Kobilka, B. K. (2007). G Protein Couple Receptor Structure and Activation. *Biochim Biophys Acta*, *1768* (4), 794–807.
- Kohout, T. A, & Lefkowitz, R. J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Molecular pharmacology*, *63* (1), 9–18.
- Koppen, C. J. Van, & Jakobs, K. H. (2004). Arrestin-Independent Internalization of G Protein-Coupled Receptors. *Molecular Pharmacology*, *66* (3), 365–367.
- Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, *25* (8), 413–22.
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews. Neuroscience*, *3* (3), 175–90.

- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, *147*, 46–55.
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *296* (5573), 1636–9.
- Newton, A. C. (1995). Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *48*, 28495–28498.
- Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T., & Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current opinion in pharmacology*, *9* (1), 15–23.
- O’Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E. W., Handel, T. M., Seshagiri, S., & Gutkind, J. S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *13* (6), 412–24.
- Orun, O. (2006). A structural approach to G-Protein Signaling Mechanisms: α subunits. *Marmara Medical Journal*, *19* (1), 41–45.
- Pagès, C., Simon, M., Valet, P., & Saulnier, J. S. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & other lipids mediators*, *64* (33), 1–10.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta*, *1813* (9), 1619–33.
- Ri, M. C. V. (1997). Regulation of cellular signals by G-proteins. *J. Biosci*, *22* (3), 375–397.
- Roberts, C., Winter, P., Shilliam, C. S., Hughes, Z. α ., Langmead, C., Maycox, P. R., & Dawson, L. α . (2005). Neurochemical Changes in LPA1 Receptor Deficient Mice – A Putative Model of Schizophrenia. *Neurochemical Research*, *30* (3), 371–377.
- Ron, D., & Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13* (13), 1658–76.
- Sáinz, J. A. G. (2011). Receptores acoplados a proteínas G y su desensibilización. *Revista Odontológica Mexicana*, *15* (4), 210–213.
- Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., & Eder, C. (2004). Functional importance of Ca^{2+} -activated K^{+} channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *The European journal of neuroscience*, *19* (6), 1469–74.

- Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A., & Tobin, A. B. (2007). Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *The Journal of cell biology*, 177 (1), 127–37.
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior*, 4 (10), 942–7.
- Van Brocklyn, J., Letterle, C., Snyder, P., & Prior, T. (2002). Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta. *Cancer letters*, 181 (2), 195–204.
- Yoshida, A., & Ueda, H. (2001). Neurobiology of the Edg2 Lysophosphatidic Acid Receptor. *Jpn. J. Pharmacol*, 87, 104–109.
- Young, K. W., Challiss, R. A. J., Nahorski, S. R., & Mackrill, J. J. (1999). Neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling , but dependent on sphingosine kinase activation. *Biochem. J.*, 52, 45–52.
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., & Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular signalling*, 24 (12), 2369–77.

Bibliografía complementaria:

- Carlson N. R. (2006). Fisiología de la conducta. (8º edición). Madrid: Pearson Addison Wesley.
- Goodman & Gilman (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica (9º edición). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Sherwood L. (2011). Fisiología humana. De las células a los sistemas. (7º edición). México: CENGAGE Learning.
- García-Sainz J. A. (2011). Hormonas y mensajeros químicos. (4º edición). México: Fondo de Cultura Económica.

Capítulos de libros:

- Farooqui, A., A. & Horrocks, L., A. (2007). Lysophosphatidic Acid and its Metabolism in the Brain. In Farooqui, A., A. and Horrocks, L., A (Ed). *Glycerophospholipids in the Brain* (pp. 219-237). Columbus, Ohio, USA: Springer.
- Von, Zastrow, M. (2002). Regulation of the G-Protein Coupled Receptors by Phosphorylation and Endocytosis. In Davis, K., L., Charney, D., Coyle, J, T. and Nemeroff, C. (Ed). *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of*

Progress. (pp. 59.79). Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins.