



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“La activación del Receptor para el factor liberador de  
corticotropina tipo1 (CRF1) estimula la vías PI3K/Akt y  
MAPK, involucradas en la señalización de la insulina”**

T E S I S

Que presenta:

**LIZETH SANDOVAL VÁZQUEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOQUÍMICA**

Director de Tesis:

**Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**

*México, D. F.*

*MARZO, 2015.*

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Transducción de Señales del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes con el apoyo técnico de la Bióloga Judith Hernández Aranda. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del donativo SEP/CONACYT 167673, UC-MEXUS/CONACYT 2012-2014 (parcial) y también por parte del CINVESTAV-IPN. Durante el desarrollo del mismo, la autora fue becaria CONACYT (No. 278093).

# Agradecimientos

Le agradezco al Dr. Alberto Olivares por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, además del aprendizaje de vida obtenido. A mis asesores, Dr. Guillermo Ávila y Dr. Antonio Arias gracias por el tiempo, asesoría, conocimientos, comentarios brindados para el enriquecimiento de este trabajo.

A Judith Hernández y Esperanza Jiménez les agradezco su disponibilidad para cualquier duda y ayuda en el trabajo experimental.

Citlaly, Luisa, Huguet, Adriana, Paola, Fernanda y por supuesto a mi sensei Gustavo gracias por su amistad, hicieron que el trabajo experimental fuera más ameno; gracias por escuchar mis problemas y siempre brindarme su consejo y ayuda, los aprecio demasiado.

Juan, Ricardo y Chuy gracias por hacerme la maestría más divertida, nunca olvidare las bromas, sesiones de estudio y nuestras caras aterradas por algún examen o exposición; me han brindado una amistad sincera que han hecho imposible no quererlos.

A mis amigas Lups, Bere y Mara, no importa el tiempo de conocernos, sea 8 años o apenas uno, gracias por soportar mis locuras y siempre apoyarme, las quiero mucho.

A mi papá y a mi mamá gracias por motivarme a estudiar la maestría, por esa confianza ciega que tienen en mí, por siempre brindarme palabras de aliento cuando dudaba de mis capacidades, por siempre escuchar mis divagues, por eso y más los amo mucho.

A mis hermanos Alfredo, Vero, Claus y Goyito gracias por sus críticas constructivas, por esas platicas que me hacían analizar mi vida y lo que quiero de ella, por siempre confiar en mí y darme un buen coscorrón cuando lo ameritaba, en verdad les agradezco mucho su ayuda al escuchar lo que escribía o en realización de los esquemas, también el soportar mis ataques neuróticos y de ansiedad, los amo mucho, y ya saben aquí estoy para joderlos, porque, para eso son los hermanos, tú qué opinas Goyito????.

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción</b>	4
Insulina	4
Generalidades	4
Secreción de Insulina	5
Acciones de la Insulina	7
Efectos Mitogénicos	7
Incorporación de la Glucosa	7
Síntesis de Glucógeno	8
Glucogénesis	8
Síntesis de Proteínas	9
Vías de señalización de Insulina	9
Receptor de Insulina	9
Sustrato del Receptor de Insulina	10
Vía de señalización PI3K/Akt	11
Vía de señalización MAPK	13
Mecanismos de regulación de la señal de Insulina	14
Resistencia a la Insulina	15
Sensibilidad a la Insulina	16
Receptor de CRF tipo 1	17
Generalidades	17
Estructura	18
Distribución del receptor CRF <sub>1</sub>	19
Agonistas	20
Factor liberador de Corticotropina (CRF)	20
Urocortina 1 (UCN1)	21
Vías de señalización	21

Desensibilización	22
<b>Antecedentes</b>	25
<b>Justificación</b>	30
<b>Hipótesis</b>	30
<b>Objetivos</b>	30
Objetivo General	30
Objetivos Particulares	30
<b>Materiales y Métodos</b>	31
Cultivo celular y Transfección	31
Western Blot	32
Detección con Anticuerpos	33
Detección de pAkt 1/2/3 Ser 473	33
Detección de pERK 1/2 Thr 202 Tyr 204	33
Detección de pIR Tyr 1158	33
Detección de Actina	33
Análisis de Datos	34
<b>Resultados</b>	35
El efecto de la Insulina en su vía de señalización	35
Efecto de CRF por medio del receptor tipo 1 de CRF en la vía de señalización de la Insulina	38
Efecto de UCN1 por medio del receptor tipo 1 de CRF en la vía de señalización de la Insulina	41
Efecto de los inhibidores AG1024 y PP2 en la vía de insulina	44
<b>Discusión</b>	48
<b>Conclusiones</b>	53
<b>Perspectivas</b>	54
<b>Bibliografía</b>	55

# Abreviaturas

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa	<b>GSK</b>	Cinasa de la glucógeno sintasa
<b>Akt</b>	Proteína cinasa B	<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adenosín monofosfato cíclico	<b>JNK</b>	Cinasa c – Jun N – Terminal
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitogenos
<b>CREB</b>	Proteína de unión a elementos responsivos AMP <sub>c</sub>	<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de molécula blanco de rapamicina en mamífero
<b>CRF</b>	Factor liberador de corticotropina	<b>PC</b>	Prohormona convertasa
<b>COS-7</b>	Línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano	<b>PDK1</b>	Proteína cinasa dependiente de fosfoinositidos
<b>DAG</b>	Diacilglicerol	<b>PH</b>	Dominio de pleckstrina
<b>eEF2</b>	Factor de elongación eucariote 2	<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4-5 bifosfato
<b>EPAC</b>	Proteína Intercambiadora activada por AMP <sub>c</sub>	<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
<b>ERK 1/2</b>	Cinasas activadas por señales extracelulares	<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3 cinasa
<b>GAP</b>	proteína activadora de GTPasas	<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	<b>PKC</b>	Proteína cinasa B
<b>Glut</b>	Transportador de glucosa	<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>Grb2</b>	Proteína de unión del receptor de factor de crecimiento	<b>PTB</b>	Dominio de unión a fosfotirosinas
<b>GRK</b>	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G	<b>PTEN</b>	Fosfatasa de fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
<b>GSIS</b>	Liberación de insulina estimulada por glucosa	<b>RTK</b>	Receptores tirosina cinasa
		<b>Shc</b>	Proteína que contiene el dominio SH2
		<b>SHIP2</b>	Fosfatasa de inositol
		<b>SH2</b>	Dominio de homología a Src 2
		<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
		<b>UCN1</b>	Urocortina 1

# Resumen

La insulina juega un rol importante en la homeostasis de la glucosa plasmática, ejerciendo sus efectos principalmente en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Los efectos de la insulina son mediados por la activación de las vías de PI3K/Akt y de MAPK. La cascada de señalización de la insulina puede ser alterada por diversos factores; lo que puede provocar una mayor actividad en las acciones de la insulina, es decir causa sensibilidad a la insulina; o bien provocar una disminución en la señalización de la insulina causando resistencia. El sistema de CRF está ampliamente distribuido en el sistema periférico; se ha reportado la expresión del receptor de CRF<sub>1</sub> en tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa, como son las células  $\beta$ -pancreáticas, músculo esquelético y tejido adiposo. Se ha reportado que la activación del receptor de CRF<sub>1</sub> en la línea celular MIN6 causa un incremento en la secreción de insulina estimulada por altas concentraciones de glucosa, además de un incremento en los niveles de fosforilación de ERK 1/2. En estudios anteriores del laboratorio, se encontró que en células COS-7, transfectadas con el receptor de CRF<sub>1</sub>, el pretratamiento con CRF causa un incremento en los niveles de fosforilación en el receptor de insulina y de Akt inducidas por insulina. Por lo anterior, se investigó el papel que ejerce la activación del receptor CRF<sub>1</sub> por sus ligandos, CRF y UCN1, en la vía de señalización de la insulina. Los resultados obtenidos son que CRF y UCN1 incrementan los niveles de fosforilación de ERK1/2 de forma bifásica, la primera fase a tiempos cortos (5–30 min) y la segunda fase a tiempos largos (150–180 min); además de incrementar los niveles de fosforilación de Akt y del receptor de insulina (10–150 min). La temporalidad de los resultados indica que la activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por CRF o UCN1, ejerce sus efectos por dos mecanismos diferentes, una vía dependiente de proteínas G y una segunda vía en la cual depende de la transactivación del receptor de insulina y la subsecuente activación de las vías PI3K/Akt y MAPK.

# Abstract

Insulin plays an important role in the homeostasis of the plasma glucose, exerting its effects mainly in skeletal muscle, adipose tissue and liver. The insulin effects are mediated by activation of pathways PI3K/Akt and MAPK. The signaling cascade of insulin can be altered various factors; this can cause increased activity in insulin actions, this means sensitivity to insulin is produced; on the other hand, generate a decrease in insulin signaling causing resistance. CRF system is wide distributed in the peripheral system; there are reports of expressed CRF<sub>1</sub> receptor in tissues involved on glucose homeostasis, like pancreatic- $\beta$  cells, skeletal muscle and adipose tissue. It has been reported that activation of the CRF<sub>1</sub> receptor in the cell line MIN6 causes an increase in insulin secretion stimulated by high concentrations of glucose, also increased phosphorylation of ERK1/2. In previous laboratory studies found that in COS-7 cells, transfected with the CRF<sub>1</sub> receptor, pretreated with CRF cause increased phosphorylation levels of insulin receptor and insulin-induced Akt. Therefore, the role played CRF<sub>1</sub> receptor activation by its ligands, UCN1 and CRF in the signaling pathway of insulin was investigated. The results are that CRF and UCN1 increase levels of phosphorylation of ERK1/2 in a biphasic way, the first stage at short times (5-30 min) and the second stage at long times (150-180 min); and increase levels of Akt phosphorylation and insulin receptor (10-150 min). These results indicate that CFR receptor activation by CRF<sub>1</sub> or UCN1 exerts its effects by two different mechanisms a G protein-dependent pathway and a second pathway in which depends on the transactivation of the insulin receptor and subsequent activation of the pathways PI3K/Akt and MAPK.

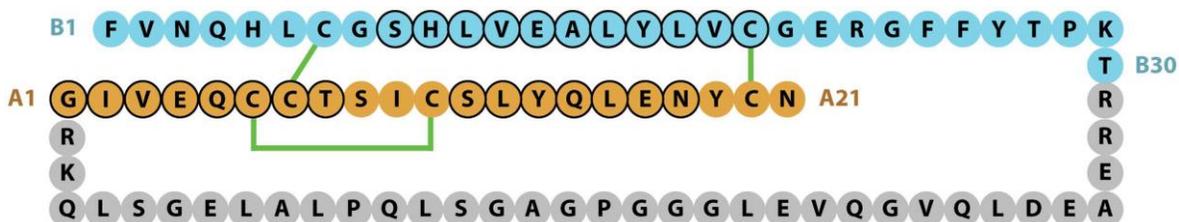
# Introducción

## Insulina

### Generalidades

La insulina es una proteína de 5.8 kDa, así mismo es una hormona anabólica que es esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. La insulina es sintetizada por las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans, y es producida como una sola cadena precursora de 110 aminoácidos conocida como preproinsulina. La preproinsulina pierde el péptido señal conformado por 24 aminoácidos por medio de proteasas al ser translocado al lumen del retículo endoplásmico rugoso, dando origen a la proinsulina. La proinsulina es almacenada en gránulos secretorios inmaduros donde se convierte en insulina, que es la forma con actividad biológica, ya que sufre proteólisis por la prohormona convertasa PC1 y PC2 y la carboxipeptidasa 2, eliminando al péptido C [1,2].

La insulina está conformada por dos cadenas unidas por puentes disulfuro, la cadena A formada por 21 aminoácidos y la cadena B por 30 aminoácidos, ambas unidas por 2 puentes disulfuro entre las cisteínas Cys B7/Cys A7 y Cys B19/Cys A20, con un tercer puente disulfuro dentro de la misma cadena A entre Cys A6/Cys A11 (véase esquema1) [3,4].



Esquema 1. Secuencia del precursor de la Insulina de humano. La cadena A de color café, la cadena B de color azul y de gris el Péptido C. Los puentes disulfuro indicados en verde. Tomado de Ward y cols (2011)

La insulina es almacenada en gránulos de secreción, los cuales se dividen en dos grupos, el grupo de reserva (RP) y el grupo de fácil liberación (RRP). Este último grupo está localizado en la cercanía de la membrana plasmática y solo comprende el 1- 10% de la insulina total de la célula; por el contrario los RP se localizan en el citoplasma y es el almacenamiento más grande de insulina [5,6].

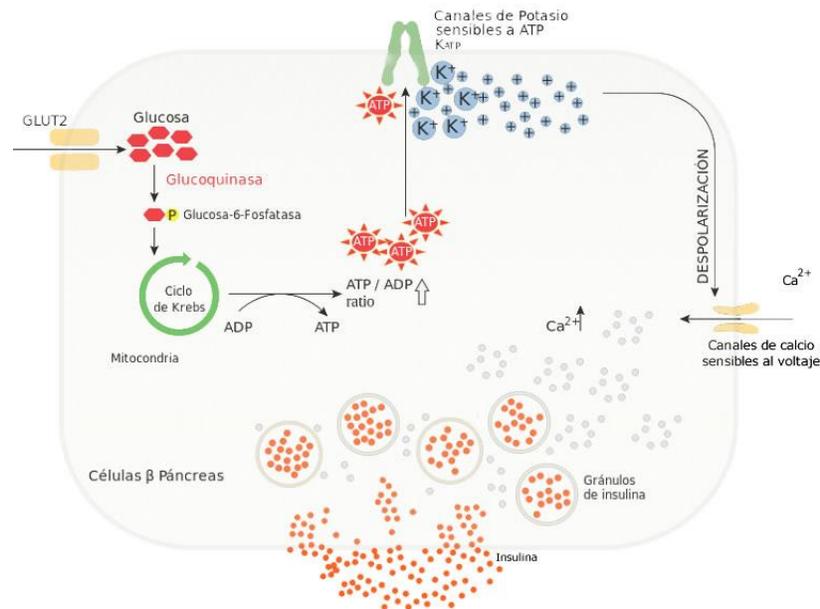
## **Secreción de insulina**

Diversos nutrientes, como algunos aminoácidos (leucina y glutamina), ácidos grasos no esterificados y hormonas peptídicas insulínótropas, como es el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP), estimulan la secreción de insulina; pero la glucosa es el principal secretagogo de liberación de esta hormona [5,6].

La secreción de insulina inducida por altas concentraciones de glucosa plasmática, que se encuentran en periodo postprandial llegando a una concentración de 10–25 mM, es un proceso rápido que ocurre en dos pasos y es llamado secreción de insulina bifásica. La primera fase ocurre muy rápido dentro de los primeros minutos del estímulo, en el cual los gránulos RRP se fusionan con la membrana plasmática resultando en una brusca liberación de insulina a la circulación. La segunda fase es sostenida y puede llegar a durar 30–40 min, esto depende si la concentración de glucosa plasmática es todavía elevada [2,7].

Este proceso es iniciado por una entrada rápida de glucosa por el transportador 2 (Glut2) en células  $\beta$ -pancreáticas, el cual es un transportador de baja afinidad y equilibra las concentraciones de glucosa a través de la membrana plasmática; la glucosa incorporada es fosforilada por la glucocinasa y entra a la glucólisis para generar piruvato; el piruvato producido entra a la mitocondria y es oxidado para entrar al ciclo de Krebs como Acetil Co–A, esto para la generación de NADH y FADH<sub>2</sub>. Los equivalentes reducidos son oxidados en la cadena transportadora de electrones para producir ATP [1, 2, 6].

En condiciones basales los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) están abiertos, por lo cual hay una difusión de potasio cercanas al equilibrio a través de la membrana; pero cuando hay un incremento de producción de ATP debido a un aumento en el metabolismo de la glucosa, el ATP se une al poro del canal causando el cierre de  $K_{ATP}$ , inhibiendo el flujo de  $K^+$  e induce la despolarización de la célula. La despolarización provoca un incremento en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  por la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, resultando en la exocitosis de los gránulos RRP (esquema 2) [5,7].



Esquema 2. Mecanismo de liberación de Insulina dependiente de glucosa en células  $\beta$ -pancreáticas. Modificada de wikipedia.com

El NADPH, malonil CoA, cadena larga de acil CoA, la producción de GTP y glutamato sirven como amplificadores de señal que corresponde a la fase 2 de la secreción de la insulina; la cual involucra el suministro de nuevos gránulos para su liberación de una forma dependiente de tiempo y ATP [3,6]

Reportes recientes han sugerido que las células  $\beta$  presentan receptores a carbohidratos que pueden participar en la regulación de la secreción de insulina. En línea celular de islotes  $\beta$ -pancreáticos (MIN6), la cual expresa receptores de sabor dulce funcionales, como son TIR2 (TAS1R2) y TIR3 (TAS1R3). Estos

receptores son activados por carbohidratos y endulzantes artificiales no metabolizables como son sucralosa y 3-O-metil-glucosa, observando un incremento de los niveles intracelulares de AMPc, Ca<sup>2+</sup> y ATP [8].

## **Acciones de insulina**

La insulina regula el metabolismo de la glucosa en diversos tejidos, en el hígado decreta la salida de glucosa hepática a través de la disminución de la gluconeogénesis y glucogenólisis; mientras que en tejido adiposo y músculo esquelético incrementa la incorporación de glucosa, esto para mantener los niveles de glucosa plasmática dentro del rango 4–6 mM. Además, modula la transcripción, altera el contenido de numerosos ARNm, estimula el crecimiento, promueve la síntesis proteica, la replicación y la supervivencia celular [1, 7, 9, 10].

### **Efectos mitogénicos**

La vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) conduce a efectos mitogénicos como son el crecimiento celular, la supervivencia y la diferenciación. ERK1/2 activada fosforila una serie de blancos incluida la p90RSK (cinasa de la proteína ribosomal S6) que promueve la síntesis de proteínas y de los factores de transcripción Elk-1 y c-Fos [1, 9, 10].

### **Incorporación de glucosa**

El Glut4 es la isoforma más abundante en adipocitos y miocitos, así mismo es el único transportador de glucosa regulado por la insulina. En condiciones sin estímulo o restricción de nutrientes solo el 5–10% de Glut4 se encuentra en la membrana plasmática, mientras que la mayor parte se encuentra en vesículas; sin embargo bajo estímulo de insulina el Glut4 es translocado desde las vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática, mecanismo que es dependiente de la vía PI3K/Akt. El músculo esquelético es el responsable del 75% de la incorporación de glucosa estimulada por insulina [4,8].

## **Síntesis de glucógeno**

La glucogénesis es un proceso importante para el almacenamiento del exceso de glucosa en el hígado y músculo esquelético. En ayuno con una baja concentración de glucosa, la glucógeno sintasa es fosforilada por GSK3 en 3 residuos Ser 641, Ser 645 y Ser 649 induciendo la inactividad. Cuando la insulina es secretada por un estado hiperglucémico se produce la activación de la vía PI3K/Akt, en donde uno de los blancos de Akt es GSK3, en el cual Akt fosforila a GSK3 causando su inactivación catalítica, por lo cual no es capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa. La glucógeno sintasa no fosforilada puede convertir la UDP-glucosa a glucógeno en músculo y hepatocito. La insulina también estimula la actividad específica de la fosfatasa de proteína 1 (PP1), localizada en la cercanía de los gránulos de glucógeno. Esta enzima remueve los grupos fosfatos de la glucógeno sintasa haciéndola catalíticamente activa [1, 2, 7].

## **Gluconeogénesis**

La gluconeogénesis es la vía que convierte a los precursores no provenientes de carbohidratos incluido el glicerol, lactato y alanina a glucosa a través de las reacciones inversas de la glucólisis y 4 reacciones adicionales por las enzimas: piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK), fructosa 1–6 bifosfatasa y glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa). La gluconeogénesis es esencial para la supervivencia en ayuno prolongado debido a que para las células rojas sanguíneas y el cerebro su principal fuente de energía es la glucosa. Los genes que codifican las enzimas encargadas de las 4 reacciones adicionales son regulados por 2 factores transcripcionales que son FoxO (factor transcripcional de la caja forkhead) y CREB (proteína de unión a elementos responsivos de AMPc). En estado de ayuno, FoxO se une a sus elementos responsivos como son los elementos responsivos de insulina (IRE) en la región promotora de PEPCK y G6Pasa, lo cual promueve su expresión. Los altos niveles de glucosa extracelular e insulina inhiben la tasa gluconeogénica, como resultado en la señalización de insulina, ya que Akt fosforila a FoxO en Thr 24, Ser 256 y Ser 319 previniendo su

translocación al núcleo, por lo cual se inhibe la transcripción de los genes PEPCK y G6Pasa [3, 7, 10].

### **Síntesis de Proteínas**

La insulina estimula la síntesis de proteínas, estos efectos anabólicos que son mediados por la activación de mTORC1 que es activado por Akt. mTORC1 regula varios pasos en la síntesis de proteínas incluido la iniciación de la traducción, elongación y biogénesis de los ribosomas [9, 10].

Cuando los niveles de insulina son altos, mTORC1 causa la liberación de eIF4E de su proteína inhibidora e inicia la traducción dependiente de CAP. También activa a eIF2B que es un GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) que facilita el intercambio de GDP-eIF2 a GTP-eIF2, este último es el encargado de enlazar el primer codón del ARNm con el ARNt de metionina [1, 4].

La insulina también regula el paso de elongación en la síntesis de proteínas, ya que inhibe la cinasa de eEF2 permitiendo que eEF2 facilite la translocación del ribosoma al siguiente codón del ARNm [4, 9]. La insulina promueve la biosíntesis de los ribosomas a través de mTORC1, el cual fosforila a p70 (cinasa S6K) que es una cinasa que fosforila a la proteína ribosomal S6 en la subunidad 40s del ribosoma provocando la biosíntesis del ribosoma activo [1, 4, 9].

## **Vías de señalización de la insulina**

### **Receptor de insulina**

Es una glicoproteína tetramérica transmembranal que pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasa de tirosina. Está conformado por dos subunidades extracelulares  $\alpha$  que presenta el dominio de unión a ligando y dos subunidades transmembranales  $\beta$  con actividad de cinasa de tirosina, las subunidades están unidas por puentes disulfuro. La

subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  están generadas por un mismo precursor que sufre ruptura proteolítica. El receptor de insulina presenta dos isoformas, la isoforma IR-B que se expresa en tejidos sensibles a insulina, principalmente en hígado, siendo responsable de las acciones metabólicas de la insulina, y la isoforma IR-A que carece de 12 aminoácidos en la parte carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  y se expresa principalmente en tejidos fetales [1, 11, 12].

En estados basales la subunidad  $\alpha$  ejerce un papel regulador sobre la subunidad  $\beta$ , evitando la autofosforilación del receptor. Al unirse la insulina a la subunidad  $\alpha$  provoca un cambio conformacional que conduce a la activación del dominio intracelular de cinasa de tirosina; el primer paso de activación es el movimiento de un brazo inhibidor que mantiene el dominio de cinasa de tirosina en un estado basal o de baja actividad, para lo cual se requieren fosforilaciones en residuos de tirosina en las posiciones 1158, 1162 y 1163. Seguida de la activación del dominio cinasa de tirosina, se fosforilan residuos en la subunidad  $\beta$  que sirven como sitios de anclaje para proteínas involucradas río abajo de la cascada de señalización. Al menos hay siete residuos de Tyr, doce de Ser y uno de Thr que se fosforilan en respuesta a insulina. Entre las proteínas reclutadas se encuentran IRS, Shc, Cbl y APS [4, 9].

### **Sustrato del receptor de insulina**

IRS es una proteína de andamiaje que organiza y media complejos de señales; presenta 6 isoformas, siendo IRS1 e IRS2 las más ampliamente expresadas y están implicadas en las acciones metabólicas de la insulina [1, 11].

IRS es reclutado hacia la membrana por medio de su dominio PH e interacciona con el receptor de insulina fosforilado en residuos de tirosina a través de su dominio PTB; el receptor de insulina fosforíla múltiples residuos de tirosina de IRS creando sitios de anclaje para proteínas que contengan dominio SH2, como son PI3K, Grb2 y SHP2. PI3K y Grb2 son las primeras proteínas involucradas en las dos principales cascadas de señalización de insulina, la vía

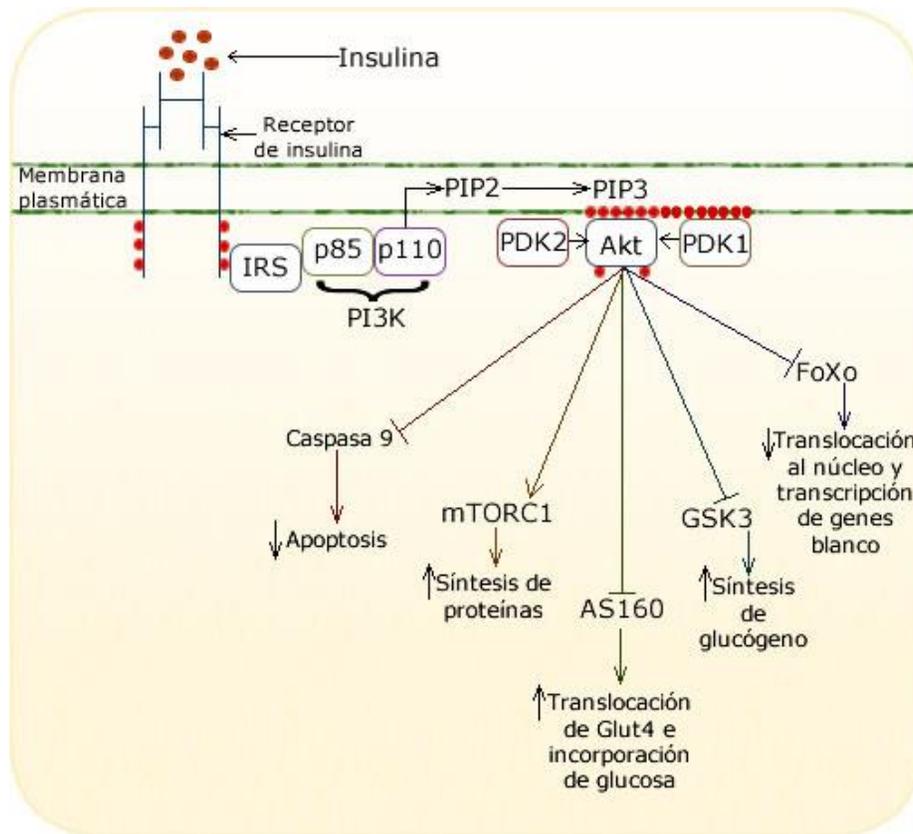
PI3K/Akt que conduce a la traducción proteica, el control metabólico, ciclo celular y supervivencia celular; además de la vía Grb2/SOS/MAPK que controla el crecimiento y diferenciación celular [2, 12].

### **Vía de señalización PI3K/Akt**

PI3K es una cinasa que fosforila lípidos de la membrana en la posición 3 del anillo de inositol. Es un heterodímero citosólico que consiste de una subunidad reguladora y una catalítica. La subunidad reguladora presenta 3 isoformas, siendo la más abundante p85; la subunidad catalítica también presenta 3 isoformas p110  $\alpha/\beta/\gamma$ . La unión de la subunidad catalítica y reguladora incrementa la estabilidad de la subunidad catalítica y la mantiene en un estado de inhibición [1, 2, 13].

El reclutamiento y activación de PI3K depende de la unión de la subunidad reguladora, que presenta dominios SH2, con residuos de fosfotirosina del IRS. La activación de la subunidad catalítica de PI3K ocasiona la fosforilación de PIP2 (fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato) para generar PIP3 (fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato) que es un segundo mensajero lipídico. Esto provoca el reclutamiento de PDK1 y Akt hacia la membrana (esquema 3) [11-13].

PDK1 presenta dominio PH para unirse a PIP3 de la membrana que desencadena su activación. PDK1 fosforila en residuos de Serina/Treonina para activar a proteínas cinasas, entre ellas Akt y PKC atípicas, en las que se encuentran PKC $\zeta$  y PKC  $\zeta/\lambda$  que juegan un importante rol en el transporte de glucosa estimulada por insulina [1, 2, 14].



Esquema 3. Vía de señalización de PI3K/Akt, Sandoval L.

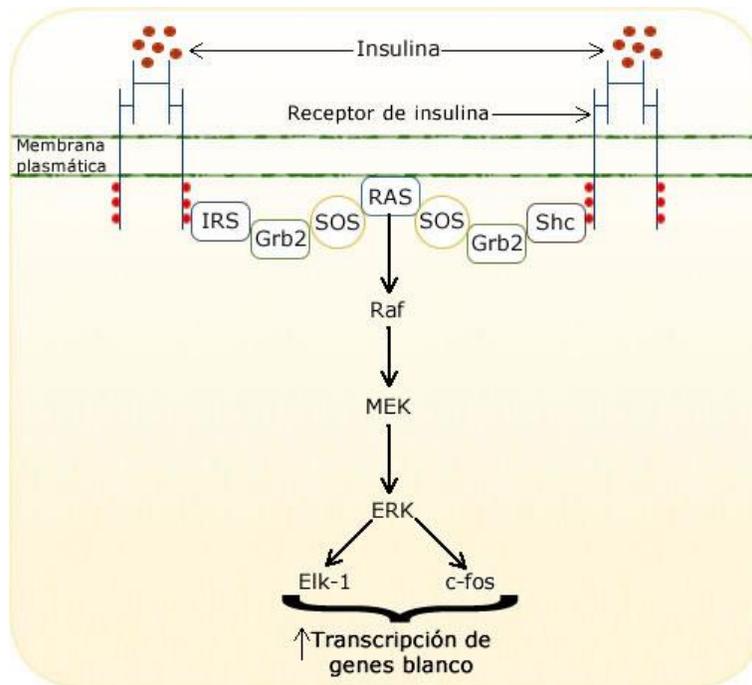
Akt es una cinasa de Serina/Treonina que presenta 3 isoformas, siendo Akt2 la isoforma más abundante en tejidos sensibles a insulina. Akt es reclutada hacia la membrana por su dominio PH, el cual se une a PIP3. Para la activación de Akt es necesario que sea fosforilada en Thr 308 por PKD1 y en la Ser 473 por mTORC2, también llamado PDK2. Akt fosforila a varios blancos proteicos, entre ellos están [14]:

- TSC2, es un GAP que al ser fosforilado provoca la disociación del complejo TSC2/TSC1, esto promueve la activación del complejo mTORC1 y la subsecuente síntesis de proteínas.
- AS160, es una proteína con actividad GAP (proteína activadora de actividad GTPasa) para Rab, se encuentra en las vesículas que contienen Glut 4; su fosforilación induce su inactivación, por lo cual Rab permanece más tiempo activa promoviendo la translocación de Glut4 y la incorporación de glucosa.

- GSK3, es una cinasa que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa. La fosforilación de GSK3 induce su inactivación, promoviendo la activación de glucógeno sintasa y la síntesis de glucógeno.
- FoxO, es un factor de transcripción que controla la expresión de genes gluconeogénicos y lipogénicos, al ser fosforilado previene su translocación al núcleo y disminuye la transcripción de sus genes blanco.
- Bax, Bad y caspasa 9, son reguladores apoptóticos, al ser fosforilados provoca la inactividad de los mismos y esto promueve la supervivencia celular.

### **Vía de señalización de MAPK**

La vía de las MAPK es independiente de PI3K/Akt. El receptor e IRS fosforilados en residuos de tirosina reclutan proteínas adaptadoras que contienen dominio SH2. La vía inicia con la proteína de andamiaje Shc, la cual se asocia con el receptor de insulina y es fosforilado en residuos de tirosina que son reconocidos por Grb2. Este último forma un complejo con SOS que tiene actividad de un GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina); este complejo Grb2/SOS se encuentra en citoplasmas, pero es reclutado hacia la membrana, permitiendo que SOS active a Ras. Ras es una GTPasa pequeña localizada en la membrana plasmática, que al ser activada provoca una cascada de fosforilaciones iniciada por la activación de Raf, la cual fosforila a MEK y esta a su vez a ERK. Entre los blancos de ERK1/2 se encuentran la p90RSK (cinasa de la proteína ribosomal S6) que promueve la síntesis de proteínas y de factores de transcripción como son Elk-1 y c-Fos (esquema 4) [4, 9, 10].



Esquema 4. Vía de señalización del MAPK, Sandoval L.

Existe una vía alterna para la activación de las MAPK, la cual es independiente de Shc; ya que el complejo Grb2/SOS se asocia con las fosfotirosinas de IRS, permitiendo que SOS active a Ras y se inicia la cascada de MAPK [11, 13].

## Mecanismos de regulación de la señal de insulina

El control de las acciones de la insulina se lleva a cabo por varios mecanismos que involucran fosfatasa, fosforilaciones en serinas (Ser) en el receptor e IRS, además de la endocitosis del receptor.

Las fosfatasa están involucradas en la regulación en varios puntos de la cascada de señalización de la insulina. Entre las fosfatasa encargadas de desfosforilaciones en tirosina del receptor de insulina, Shc e IRS se encuentran PTP-1B y SHP-2. Otro punto de regulación son los fosfolípidos generados por PI3K, donde participan las fosfatasa de lípidos como son SHIP2 y PTEN que

inducen la desfosforilación de PIP3. PP2A, PP2B, PHLPP1 y PHLPP2 son las encargadas de la desfosforilación de Akt [1, 9].

La fosforilación en tirosina es esencial para la activación de IR e IRS, pero las fosforilaciones en serina y treonina está involucrado en la disminución en la señal de insulina, ya que provocan el desacople con sus proteínas efectoras; las cinasas involucradas en la retroalimentación negativa de la vía son: Akt, mTORC1, S6K, GSK3 y ERK1/2 [10, 13].

La insulina al unirse con su receptor provoca la internalización del complejo ligando–receptor por medio de vesículas cubiertas de clatrina llevándolo a endosomas tempranos, en donde el cambio a pH ácido induce la disociación del complejo, la insulina es degradada por la enzima insulinasa endosomal; mientras que el receptor es reciclado, regresando a la membrana, o es llevado a lisosomas para su degradación; de este modo se regula el número de receptores disponibles en la membrana [10].

La cascada de señalización de la insulina puede ser alterada por diversos factores; esto puede provocar una mayor actividad en las acciones de la insulina, es decir causa sensibilidad a la insulina, o una disminución en ella causando resistencia.

## **Resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina es la incapacidad de la insulina de ser reconocida y/o de generar una respuesta intracelular adecuada por fallas en su cascada de señalización. Se caracteriza por una disminución en el transporte de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético, incremento en la producción de glucosa hepática y alteración en metabolismo de lípidos tanto en tejido adiposo como en el hígado [5, 13, 15].

Los factores que se han implicado en promover la resistencia a la insulina son: ácidos grasos libres y sus metabolitos, citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1), angiotensina II y diversas adipocinas (resistina, leptina) [4, 5, 8, 16].

En estados de resistencia a la insulina se ha observado un incremento en los niveles de fosforilación en Ser de IR e IRS, esto altera su asociación con proteínas efectoras ya que bloquea sitios de fosforilación en Tyr, además las fosforilaciones en Ser de IR e IRS provoca la disminución de su actividad e induce su degradación. Las citocinas proinflamatorias incrementan la fosforilación en Ser de IRS por medio de PKC atípicas y clásicas, JNK, S6K, también promueven una disminución en la expresión de IRS, Glut4 y PPAR $\gamma$ ; mientras que las altas concentraciones de ácidos grasos ocasiona acumulación intracelular de metabolitos lipídicos que activan IKK y PKC atípicas, estas cinasas fosforilan a IRS evitando su asociación con PI3K; además de fosforilar a Akt en Thr34 evitando su reclutamiento a la membrana plasmática [5, 13, 15].

## **Sensibilidad a la insulina**

Existen diversos factores que incrementan los efectos de la insulina, entre ellos se encuentran, ácidos grasos polinsaturados, adiponectina y algunos fármacos, como son los TZDs (tiazolidinedionas). El incremento en las acciones de la insulina, es debido a un aumento en la vía de señalización de la insulina, lo anterior es causado por un incremento en los niveles proteicos del receptor de insulina, IRS y Glut4; por otro lado, también se ha observado un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina del receptor de insulina e IRS, incremento en la actividad de la vía PI3K/Akt y un decremento en la actividad de fosfatasa (PP2A) bajo estímulo de insulina; esto conlleva a un incremento en los efectos de insulina como es la translocación de Glut4 a la membrana y la subsecuente incorporación de glucosa [16-19].

La extensa distribución de los receptores de CRF y los péptidos de la familia de CRF en tejidos periféricos, junto con los efectos multifacéticos en los sistemas inmune, gastrointestinal y cardiorrespiratorio así como en la homeostasis energética y de glucosa, es factible que el sistema de CRF pueda modificar la vía de señalización de la insulina.

## Receptor para el CRF tipo 1

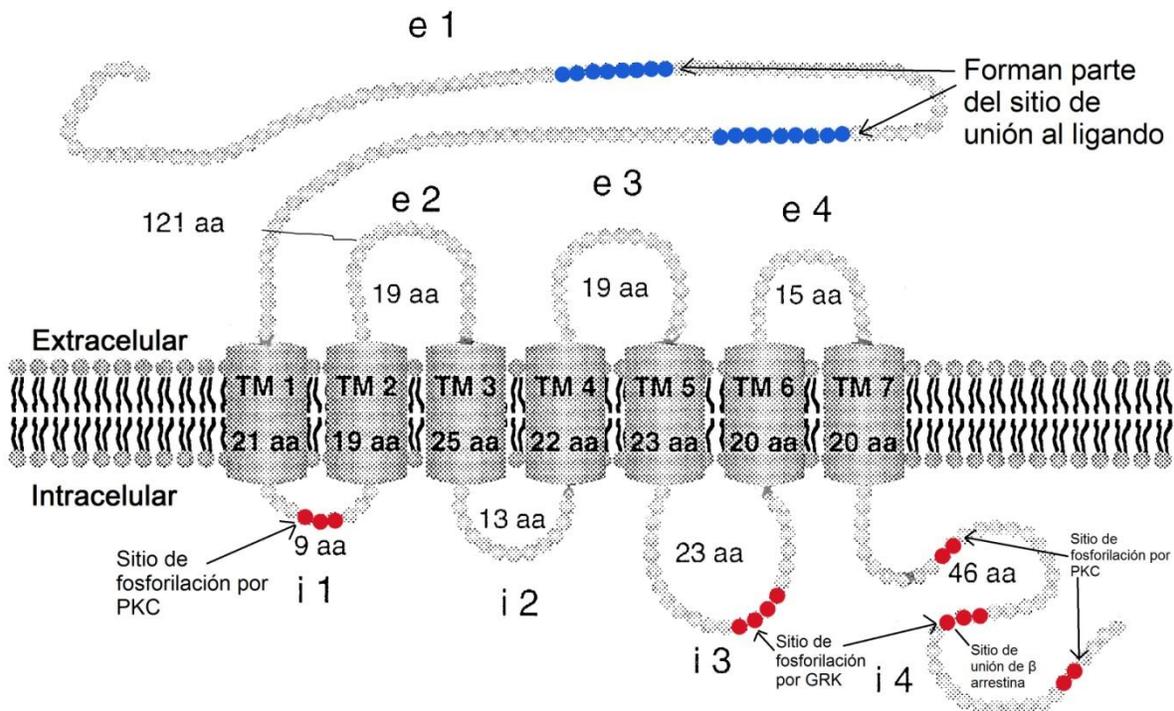
### Generalidades

El receptor para el factor liberador de corticotropina (CRF) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), de la clase B, en los que se encuentran: el receptor del factor liberador de hormona de crecimiento, glucagón y secretina, presentando un 30% de homología entre ellos. El receptor de CRF presenta dos tipos, receptores CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub>, los cuales tienen un 70% de identidad, mostrando un alto grado en la conservación de la secuencia, aunque solo presenta un 40% de identidad en su N-terminal, por lo contrario las asas intracelulares y el C-terminal presentan 80% de homología y la tercera asa intracelular es completamente idéntica. Ambos receptores de CRF están asociados a la proteína G $\alpha$ s [20-24].

El receptor CRF<sub>1</sub> mantiene un 80% de identidad entre las especies, es un polipéptido de 415–420 aminoácidos, el cual presenta cuatro sitios de glucosilación en el N-terminal, y ocho residuos de cisteínas en la primera y segunda asa extracelular, importantes para el correcto plegamiento del receptor; además de presentar en la segunda y tercera asa intracelular así como en el C-terminal varios sitios consenso para fosforilación por proteínas cinasas, como son PKA, PKC y GRK, que pueden estar involucradas en la regulación de la función del receptor [23-26].

## Estructura

El receptor de CRF<sub>1</sub> está conformado por un dominio N-terminal largo, el cual presenta dos regiones importantes para conformar el sitio de unión para el ligando, la primera región abarca los residuos 43–50, mientras la segunda región abarca los residuos 76–84; en estas regiones se une con gran afinidad la porción C-terminal del ligando, teniendo una segunda interacción en el dominio J (juxtamembranal) del receptor con extremo N-terminal del ligando (esquema 5) [26-28].

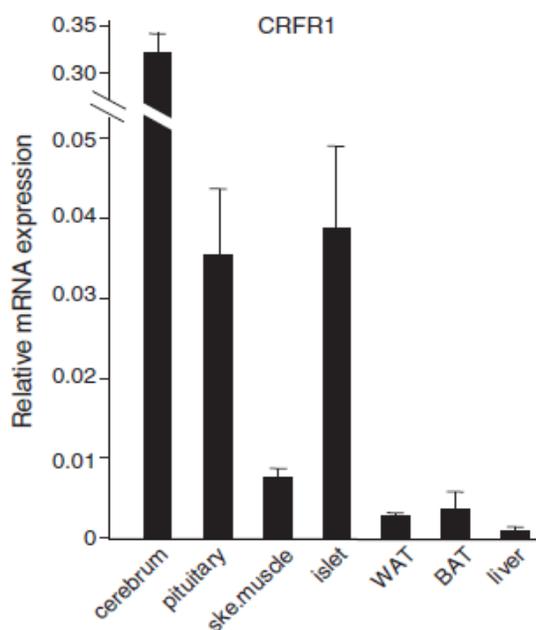


Esquema 5. Estructura del receptor CRF<sub>1</sub>. Modificado de Sydow et al (1997),

El C-terminal del receptor CRF<sub>1</sub> presenta siete serinas y tres treoninas que pueden ser fosforiladas por GRK; además de presentar el motivo TPST para la unión de  $\beta$ -arrestina. La tercera asa intracelular se acopla la proteína G $\alpha$ s, además de presentar el dominio STTSET, que es reconocido por GRK para ser fosforilado [20, 29, 30].

## Distribución del receptor CRF<sub>1</sub>

El receptor de CRF<sub>1</sub> se expresa abundantemente en el sistema nervioso, se encuentra en regiones involucradas en la función cognitiva (corteza cerebral), áreas límbicas involucradas en las respuestas emocionales y el estrés (amígdala, núcleo accumbens e hipocampo) y en el tallo cerebral regulando funciones autónomas (locus coeruleus y núcleos del tracto solitario), además de la pituitaria anterior, bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo, tálamo y médula espinal [20, 22, 31, 32].



Gráfica 1. Expresión de ARNm de receptor de CRF<sub>1</sub> en diversos tejidos. Tomado de Sakamoto et al (2013), Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice, *Metabolism*.

La expresión del receptor CRF<sub>1</sub> no se limita al sistema nervioso, también se expresa en tejidos periféricos, como son la piel, bazo, testículos, ovarios, placenta, glándulas suprarrenales y colon. En un análisis de la expresión de ARNm del receptor CRF<sub>1</sub> en tejidos periféricos encargados de la homeostasis de glucosa se observó principalmente en los islotes  $\beta$ -pancreáticos y en menor medida en músculo esquelético, tejido adiposo pardo y blanco ( grafica 1) [23-25, 33].

## Agonistas

Los principales agonistas del receptor de CRF<sub>1</sub> son CRF y UCN1, los cuales pertenecen a la familia de proteínas parecidas a CRF, en las cuales se incluye UCN2, UCN3, que presentan alta afinidad para el receptor CRF<sub>2</sub>, urotensina1 que deriva de la urofisis del pez, sauvagina que se encuentra en la piel de las ranas que muestran afinidades similares para ambos receptores, al igual que UCN1 [31, 34, 35].

### **Factor liberador de corticotropina (CRF)**

El CRF (factor liberador de corticotropina) se aisló por primera vez en 1981, es sintetizado como un precursor llamado pre-pro-CRF, de 196 aminoácidos, el cual sufre una serie de proteólisis para generar el péptido maduro de 41 aminoácidos de cadena simple; además de sufrir amidación en el C-terminal, la cual es una característica de los péptidos de la familia de CRF; además está altamente conservado entre las especies y es el principal regulador fisiológico del eje HPA (hipófisis/pituitaria/glandula suprarrenal), ya que estimula la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotropa) de la pituitaria anterior [23-26, 36].

Además de regular el eje HPA, el CRF está involucrado en una amplia gama de respuestas fisiológicas, incluyendo el control del apetito, regulación cardiovascular, metabolismo de la glucosa, funciones inmune y de comportamiento, estimula el sistema nervioso simpático e inhibe el sistema nervioso parasimpático. También, en estado gestacional avanzado se observa un marcado incremento en los niveles de CRF, debido a que la placenta sintetiza y secreta CRF [29, 30, 37].

El CRF se expresa ampliamente en el sistema nervioso, principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo, aunque se encuentra en otros núcleos hipotalámicos como son el área preóptica medial, núcleo dorsomedial, núcleo arcuato, además en el núcleo central de la amígdala, núcleo del lecho de la estría

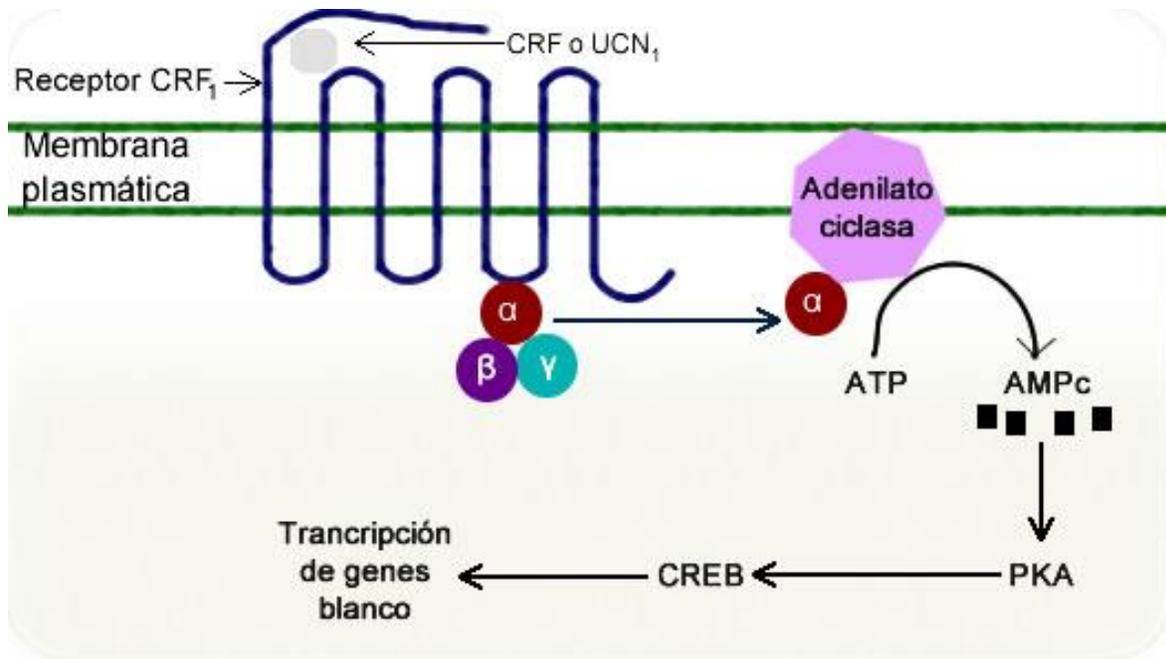
terminalis, locus coeruleus, hipocampo, corteza prefrontal y cingulada, tallo cerebral y médula espinal. También se expresa a nivel periférico, en diferentes órganos como son piel, timo, bazo, páncreas, estomago, intestino, glándula suprarrenal, testículos, ovarios y placenta [26, 36, 38].

### **Urocortina 1 (UCN1)**

La urocortina es un péptido de cadena simple conformada por 40 aminoácidos, al igual que CRF, el C-terminal está amidado. Se encuentra altamente expresado en el núcleo de Edinger–Westphal, oliva superior lateral, núcleo supraquiasmático, en neuronas neurosecretoras del núcleo supraóptico, hipocampo, además se encuentra en la lamina plexiforme del bulbo olfatorio e hipotálamo lateral, en el núcleo motor facial, hipoglosal y ambiguo. En la periferia se expresa en el tracto gastrointestinal, testículos, cardiomiocitos, timo, bazo y placenta [31, 39-41].

### **Vía de señalización**

El CRF o UCN1 se unen al dominio de unión al ligando del receptor induciendo un cambio conformacional, que permite el intercambio de GDP a GTP en la proteína G, lo cual causa la disociación del trímero en la subunidad  $\alpha$  y subunidad  $\beta\gamma$ , G $\alpha$ s activa a la adenilato ciclasa; esta ocasiona la generación del segundo mensajero AMPc. El incremento de AMPc induce la activación de PKA, debido a que PKA está conformada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras; la unión de AMPc a las subunidades reguladoras liberan a las subunidades catalíticas de PKA. La PKA activa provoca la fosforilación de varias proteínas blanco, entre ellos se encuentra el factor transcripcional CREB, el cual regula la transcripción de sus genes blanco (esquema 6) [24, 31, 42, 43].



Esquema 6. Vía de señalización de PKA, Sandoval L.

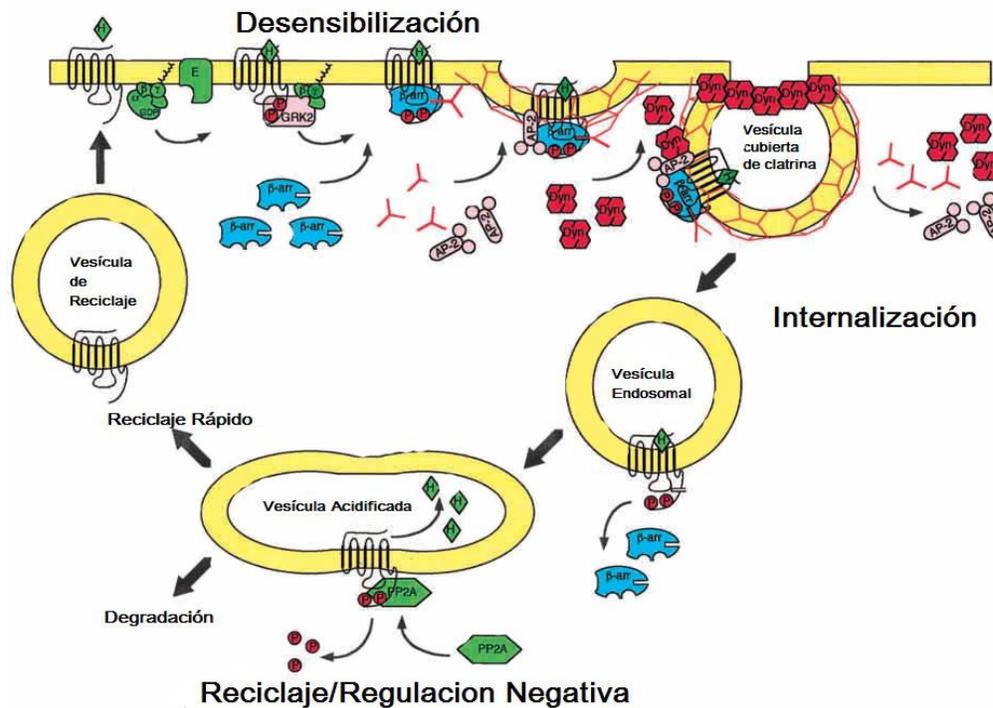
También se ha reportado que la activación del receptor puede promover la vía de PLC/PKC, debido a su posible acople con la proteína Gαq, la cual genera el incremento en la generación de DAG, IP<sub>3</sub> y Ca<sup>2+</sup> intracelular [20, 23].

## Desensibilización

La desensibilización es el proceso por el cual los receptores son regulados para prevenir los efectos que puedan alterar la homeostasis celular por una actividad prolongada y sin control. En la desensibilización se activan cinasas citosólicas específicas de los GPCRs, las GRKs, así como cinasas reguladas por segundos mensajeros como son PKC y PKA; estas cinasas fosforilan residuos de serina y treonina localizados en la tercera asa intracelular y la cola carboxílica [21, 43].

La señalización mediada por el receptor de CRF<sub>1</sub> es rápidamente finalizada por un mecanismo de sensibilización homóloga. En la cola carboxílica del receptor de CRF<sub>1</sub> presenta siete serinas y tres treoninas, además en la tercera asa

intracelular se encuentra un cluster de serina/treonina que son sitios potenciales para ser fosforilados por GRKs [41, 45, 46].



Esquema 7. Proceso de desensibilización del receptor CRF<sub>1</sub>.Luttrell y Lefkowitz (2002),

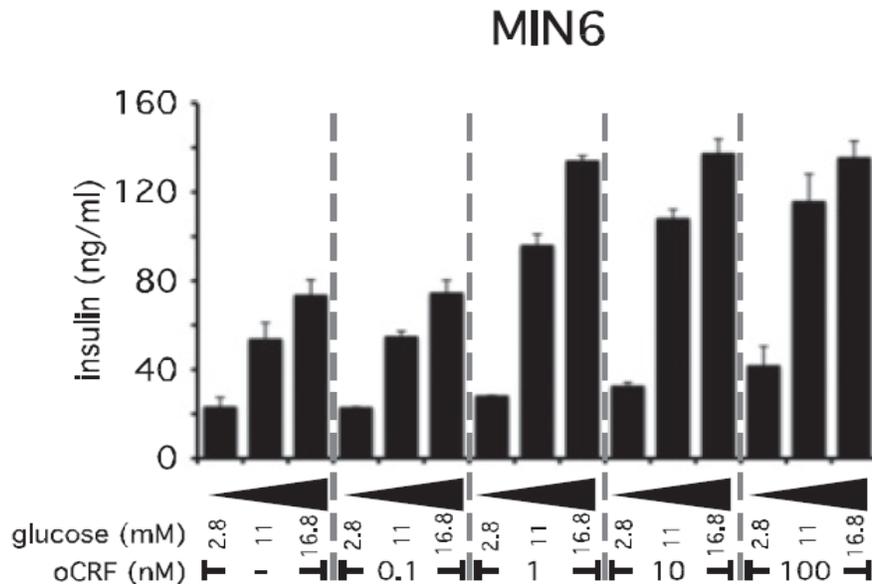
La cinasa involucrada en la desensibilización del receptor de CRF<sub>1</sub> son GRK3 y GRK6. GRK3 presenta un dominio de unión a la subunidad βγ, por lo cual es reclutado hacia la membrana cuando se disocia la proteína G, donde fosforila la tercera asa intracelular y el C-terminal del receptor. La fosforilación del receptor incrementa la afinidad con la β-arrestina 2, la cual es reclutada a la membrana para unirse al C-terminal del receptor, provocando el desacople estérico del la proteína G con el receptor, resultando en la terminación de la traducción de señal del receptor activado por su agonista [35, 44, 47, 48].

La β-arrestina 2 del complejo receptor-β-arrestina, funciona como proteína adaptadora, la cual recluta componentes de la maquinaria endocítica de clatrina que incluye la clatrina y β2-adaptina (AP-2). El secuestro del receptor depende de dinamina mediada por vesículas de clatrina; al internalizarse el receptor, la β-arrestina se disocia rápidamente debido que la interacción receptor-β-arrestina 2

es transitoria. Los receptores son dirigidos a un compartimento endosomal ácido en el cual se disocia el ligando y el receptor es defosforilado por la fosfatasa PP2A, posteriormente se reciclan a la membrana plasmática o es degradado por vía lisosomal (esquema 7) [17, 23, 24, 49, 50].

## Antecedentes

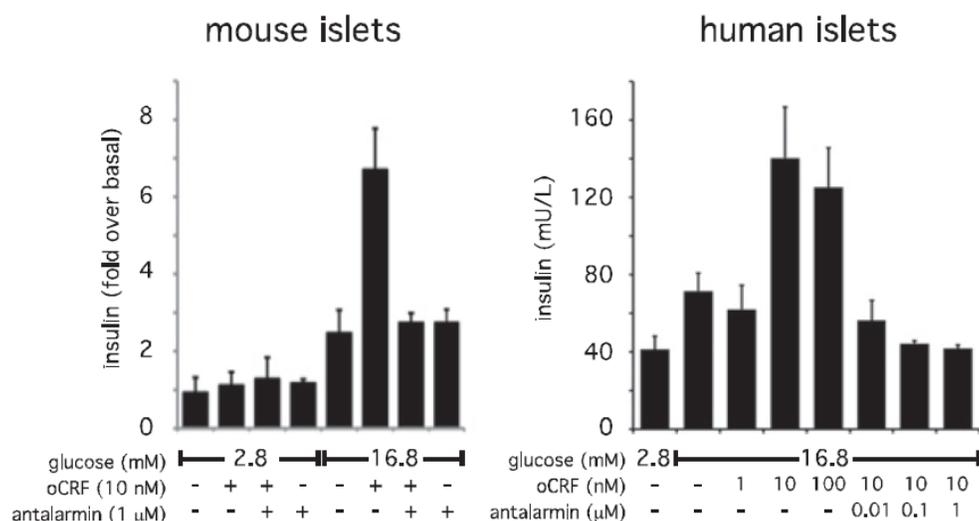
En uno de los trabajos de Vale et al (2009) evaluaron en una línea celular de islotes  $\beta$ -pancreáticos (MIN6) si la activación del receptor  $CRF_1$  por uno de sus ligandos, oCRF (CRF ovino), puede incrementar la secreción de insulina. La estimulación del receptor  $CRF_1$  a partir de 1 nM de oCRF incrementó la liberación de insulina inducida por concentraciones elevadas de glucosa (11 mM y 16.8 mM), sin embargo no se encontraron efectos utilizando concentraciones bajas de glucosa (2.8 mM), como se muestra en la gráfica 2 [51].



Gráfica 2. La estimulación de las células MIN6 con una dosis baja (1 nM) de oCRF es suficiente para incrementar la secreción de insulina en presencia de concentraciones intermedias (11 mM) y altas (16.8 mM) de glucosa. Tomado de Vale et al (2009)

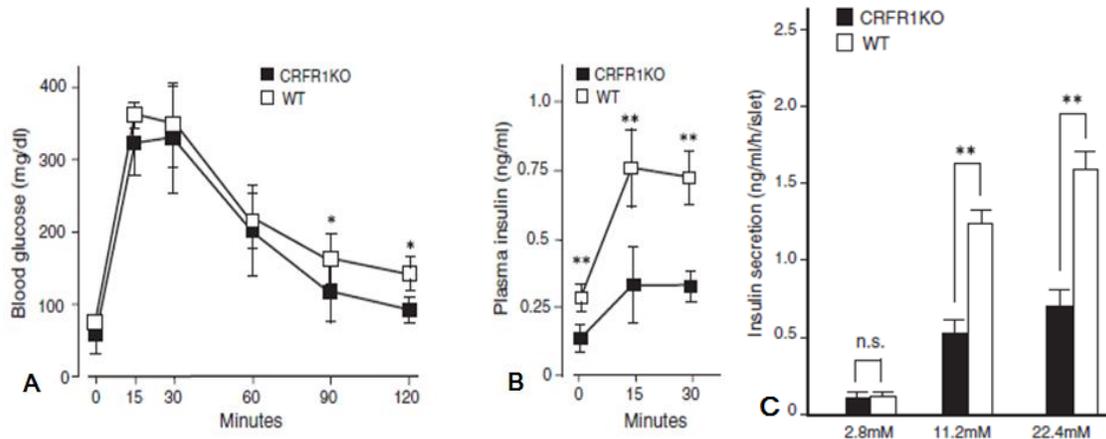
El efecto potenciador en liberación de insulina estimulada por glucosa (GSIS) por la activación del receptor de  $CRF_1$  inducida por su ligando oCRF, también se observa en cultivo primario de islotes  $\beta$ -pancreáticos de humano y ratón; en el cual 10 nM de oCRF provoca un incremento en la liberación de insulina en altas concentraciones de glucosa (16.8 mM) y no en concentraciones basales de glucosa (2.8 mM). Este incremento en GSIS es prevenido por la

coadministración de antalarmina, un antagonista del receptor CRF<sub>1</sub>, corroborando que el efecto observado es mediado por el receptor de CRF tipo 1 (Véase gráfica 3) [51].



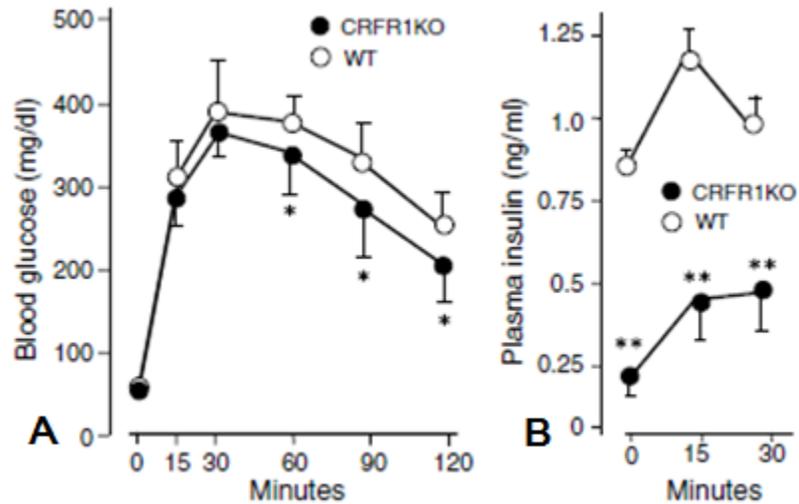
Gráfica 3. La estimulación con oCRF potencia la liberación de insulina estimulada por glucosa en cultivos primarios de isletos  $\beta$  pancreáticos de humano y ratón en una manera dependiente del receptor de CRF<sub>1</sub>, debido a que la coadministración de antalarmina bloquea por completo el efecto de oCRF. Tomado de Vale et al (2009).

En un test de tolerancia a la glucosa con ratones knockout (KO) del receptor de CRF<sub>1</sub> y ratones wild type (WT), se observó un comportamiento semejante en los niveles de glucosa plasmática en los primeros minutos. Los ratones KO del receptor muestran una disminución en los niveles de glucosa a los 90 y 120 minutos, por lo cual hay una mejora en la tolerancia a la glucosa; sin embargo, los niveles de insulina plasmática fueron considerablemente disminuidos en ratones KO del receptor, mostrando un incremento en la sensibilidad a la insulina, este incremento se puede deber, en parte, a la disminución de los niveles de corticoesterona. También evaluaron el funcionamiento de las células  $\beta$ -pancreáticas en la liberación de insulina estimulada por glucosa, en la cual hay una clara deficiencia en la liberación de insulina inducida por altas concentraciones de glucosa (11.2 mM y 22.4 mM) en los ratone KO del receptor de CRF<sub>1</sub> (Gráfica 4) [33].



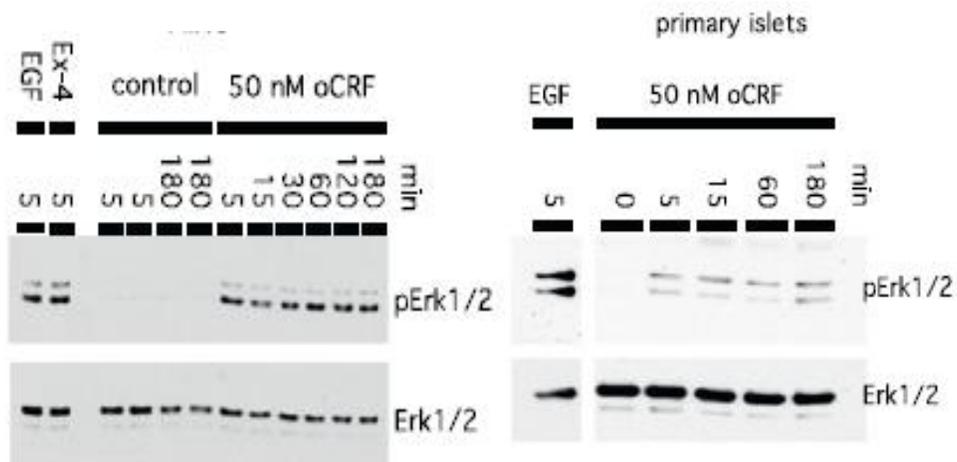
Gráfica 4. A y B. Se midieron los niveles de glucosa en sangre e insulina sérica en los ratones WT y KO del receptor de CRF1 después de la inyección de glucosa (1mg/g de peso corporal). C. Se evaluó GSIS en concentraciones bajas (2.8 mM) y altas (11.2 mM y 22.4 mM) de glucosa en islotes  $\beta$  – pancreáticos aislado de ambos ratones, WT y KO del receptor CRF1. Tomado de Sakamoto et al (2013).

Sakamoto et al (2013) evaluaron el efecto de una dieta alta en grasas en ratones KO del receptor de CRF<sub>1</sub> y WT, la cual ocasionó resistencia a la insulina y una menor tolerancia a la glucosa, ya que en el test de tolerancia, se observan altas concentraciones de glucosa, aunque en menor medida en los ratones KO, además de no presentar cambios en el nivel de insulina sérica, ya que se mantuvieron semejantes a los obtenidos en una dieta normal. Por lo contrario, en los ratones WT se incremento la insulina sérica, este aumento se debe a la alta concentración de glucosa presente en la sangre; por lo cual los ratones KO presentan un defecto en la secreción de insulina estimulada por alta concentración de glucosa. Por lo anterior, estos estudios muestran que el receptor CRF<sub>1</sub> tiene participación en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Véase gráfica 5)[33].



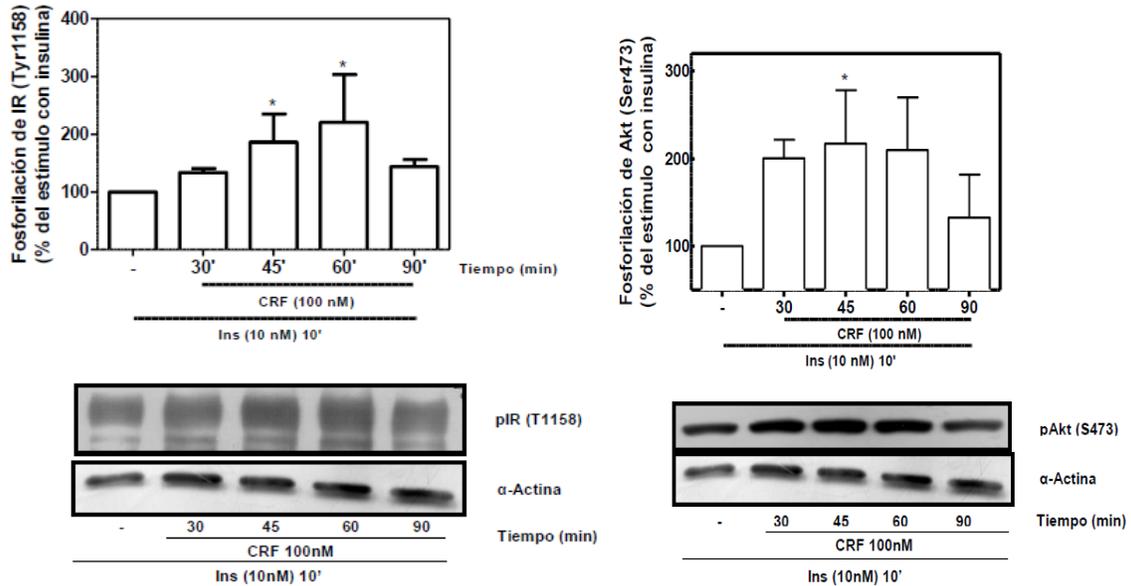
Gráfica 5. En los ratones WT y KO del receptor de CRF1 bajo una dieta alta en grasas por 12 semanas, se evaluó los niveles de glucosa e insulina en sangre después de la inyección de glucosa (1mg/g de peso corporal). Tomado de Sakamoto et al (2013).

Otro efecto reportado en las células MIN6 es un incremento en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 inducido por 50 nM de oCRF, que inicia a los 5 minutos y se mantiene hasta los 180 minutos; este resultado también se observa en cultivo primario de islotes  $\beta$ -pancreáticos de rata, siendo duradero el incremento en los niveles de fosforilación de ERK1/2 provocado por 50 nM de oCRF, como se muestra en la siguiente gráfica [51].



Gráfica 6. La estimulación con 50 nM oCRF en la línea celular MIN6 y cultivo primario de islotes  $\beta$ -pancreáticos de rata, induce un incremento de los niveles de fosforilación de ERK 1/2 a partir de los 5 min y persiste hasta las 3 horas. Tomado de Vale et al (2009).

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que en células COS-7, transfectadas con el receptor de CRF<sub>1</sub>, el pretratamiento con 100 nM de CRF por 30 a 90 min causo un incremento en los niveles de fosforilación en el receptor de insulina y Akt inducido por insulina (Gráfica 7) [52].



Gráfica 7. En células COS-7 transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> se pre-estimularon con 100 nM de CRF (30 – 90 min), seguido del estímulo de 10 nM de insulina (10 min), se evaluaron los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) y del receptor de insulina (Tyr 1158). Tomado de María de la Luz Huidobro Gálvez (2013).

Lo anteriormente expuesto sugiere que la activación del receptor CRF<sub>1</sub>, por CRF, participa en la activación de la vía de señalización de insulina, así como en la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa.

# Justificación

La expresión del Receptor Tipo 1 de CRF no solo se limita al SNC; si no que se expresa en tejidos periféricos que están involucrados en mantener la homeostasis de la glucosa; sin embargo, es desconocido el papel que juega el receptor CRF<sub>1</sub> en estos tejidos y en la señalización de la insulina, así como los mecanismos moleculares implicados en ello.

# Hipótesis

La activación del receptor CRF<sub>1</sub>, por sus diversos ligandos, estimula la vía de señalización de Insulina.

# Objetivos

## Objetivo General

Conocer el mecanismo molecular por el cual el receptor CRF<sub>1</sub> al ser activado por sus ligandos (CRF y UCN1) puede estimular las vías de señalización de la insulina.

## Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de la insulina en su vía de señalización, por medio de los niveles de fosforilación de Akt, ERK e IR
- Evaluar si el CRF modifica los niveles de fosforilación de Akt, ERK e IR
- Determinar si UCN1 modifica los niveles de fosforilación de Akt, ERK e IR
- Determinar la concentración a utilizar de los inhibidores del receptor de insulina (AG1024) y de Src (PP2), mediante la determinación de sus efectos en la vía de señalización de la insulina

# Materiales y Métodos

## Cultivo Celular y Transfección

En este proyecto se utilizó como modelo de estudio la línea celular COS-7, procedente del tejido renal de mono, obtenidos de ATCC. Las células se utilizaron a partir del pasaje 4 hasta el pasaje 20, fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino y 2% de penicilina y estreptomicina, a 37° C con una atmosfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>.

Debido a que la línea células COS-7 carece del receptor 1 para CRF, se transfectaron transitoriamente con el plásmido pcDNA-3/HA-hCRFR1, donado por el Dr. Richard Hauger. La transfección se realizó cuando la confluencia alcanzó el 75%, las células se incubaron por 6 horas con una mezcla de medio sin suero, 5 µl /ml de lipofectamina y 1µg/ml del plásmido; al término de la incubación se remplazo la mezcla por medio completo. Para los experimentos, las células transfectadas se sembraron en cajas de 6 pozos; alrededor de 200,000 células por pozo con medio completo; después de 8 horas se remplazó el medio por medio bajo en suero (2% FBS) que se mantuvo por 12 horas; al cabo de este tiempo se sustituye por medio sin suero por 6 horas antes de iniciar los estímulos.

Para la realización de los experimentos, las células COS-7 transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub>, las cuales se sembraron en cajas de 6 pozos a una confluencia del 80% y se estimularon con insulina 10 nM, CRF 100 nM o UCN1 100 nM a diferentes tiempos, sin o con incubación previa de inhibidores (AG1024 100 µM, PP2 20 µM). Al término de los estímulos, se detuvo la reacción en frío y se lavaron los pozos con buffer de fosfato (PBS) frío (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7.4); por último las células se lisaron con buffer Laemmli 1x (SDS 20%, β-mercaptoetanol 10% y agua).

## Western Blot

Las muestras obtenidas se sonicaron dando pulsos a 40 Khz durante 30 seg (Sonios Vibra Cell, Ultrasonic Processor), se calentaron a 99° C durante 5 min, con agitación de 950 rpm o a 48° por una hora con intervalos de agitación de 30 seg a 950 rpm por un minuto sin agitación (Thermomixer Comfort Eppendorf); posteriormente se centrifugaron a 14500 rpm por 5 min (MiniSpinPLUS Eppendorf). Para la detección de las proteínas de interés, se cargaron 20 µg (10 µL) de muestra en geles de poliacrilamida de 6% o 12% para pAkt, pERK y actina y 60 µg (30 µL) de muestra para pIR; se realizó la electroforesis en un sistema Miniprotean 3 cell, con buffer de corrida Tris- Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%, durante los primeros 20 min a 80 V y por una hora y media a 120 V.

En el caso de la detección de pAkt, pERK y actina se realizó transferencia semiseca (Trans Blot SD, Transfer Cell, BIO-RAD) a membranas de PVDF durante 1 hora a 15 V; posteriormente, las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBST 0.1% ((Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween 20 0.1%, pH 7.5) por una hora, después se incubo con el anticuerpo primario en TBST 0.1% leche 5% durante toda noche a 4° C; al termino de la incubación las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBST 0.1%. Finalmente las membranas se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente seguida de un ciclo de 3 lavados con TBST 0.1% por 10 min.

Para la detección de pIR se realizó la transferencia húmeda (Trans Blot SD, Transfer Cell, BIO-RAD) a membranas de PVDF durante una hora y media a 400 mA, este proceso se realizó en frío y las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en TBST 0.1% durante toda la noche, posteriormente se hizo una serie de 3 lavados con TBST 0.1% por 10 min y se incubo con el anticuerpo primario en TBST 0.1% con leche al 5% durante 2 horas, al término de la incubación se realizaron 3 lavados con TBST 0.1% por 10 min y 2 lavados con TBS por 15 min.

## **Detección con anticuerpos**

### **Detección de pAkt 1/2/3 Ser 473**

Para la detección de los niveles de fosforilación de Akt 1/2/3 en el residuo de serina 473 se utilizó un anticuerpo policlonal de Santa Cruz Biotechnology a una dilución de 1:5000 en TBST 0.1% leche al 5% incubado durante toda la noche a 4° C, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, en este caso anti-conejo conjugado con HRP de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1:5000 en TBST 0.1% leche al 5% por una hora a temperatura ambiente.

### **Detección de pERK 1/2 Thr 202 Tyr 204**

En la detección del estado de fosforilación de ERK en los residuos de treonina 202 y tirosina 204, se utilizó un anticuerpo policlonal de Santa Cruz Biotechnology a una dilución de 1:5000 en TBST 0.1% leche al 5% incubado durante toda la noche a 4° C, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con HRP de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1:5000 en TBST 0.1%, leche al 5% por una hora a temperatura ambiente.

### **Detección de pIR Tyr 1158**

Para la realización de la detección del estado de fosforilación de IR en el residuo de tirosina 1158, se utilizó un anticuerpo de Invitrogen a una dilución de 1:1500 en TBST 0.1%, leche al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con HRP de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1:5000 en TBST 0.1%, leche al 5% por 2 horas a temperatura ambiente.

### **Detección de Actina**

Con la finalidad de contar con un control de carga, se utilizó un anticuerpo contra actina, el cual se usó con una dilución de 1:8000 en TBST 0.1%, leche al 5% incubado durante toda la noche a 4° C, posteriormente se incubó con el

anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP a una dilución de 1:15000 en TBST 0.1%, leche al 5% por 2 horas a temperatura ambiente.

La detección de las proteínas antes mencionadas, es evaluada por medio de detección quimioluminiscente; para ello es requerida la incubación de las membranas con un reactivo de detección de quimioluminiscencia Immobilon™ Western (Millipore), en el cual la enzima HRP que está unido al anticuerpo secundario oxida al luminol en presencia de peróxido de hidrogeno; la luz emitida en esta reacción es captada por una placa fotográfica. Las placas fotográficas fueron escaneadas para su posterior análisis.

## **Análisis de Datos**

Se cuantificó la densidad de las bandas utilizando el programa Image J. Los datos obtenidos se analizaron y graficaron en el programa de estadística GradPad Prism 6.0 y se le realizó la prueba estadística de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por un análisis post hoc de Dunnett.

# Resultados

## EL EFECTO DE LA INSULINA EN SU VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Para el presente trabajo primero examinamos la cascada de señalización de insulina en las células COS-7, esto nos permite avalar nuestro modelo experimental, por lo cual se incubaron con 100 nM de insulina a diferentes tiempos. Para evaluar la actividad del receptor de insulina se determinó el nivel de fosforilación en el residuo de tirosina 1158. En la Figura 1 se puede observar que desde los 5 min se ve un incremento del 50% ( $154.6 \pm 9.06$ ) comparado con el estado basal, este incremento se mantiene hasta los 15 min de estímulo de insulina ( $155.4 \pm 19.45$ ); mientras que a los 60 min del estímulo se observa una disminución en los niveles de fosforilación del receptor por debajo del nivel basal de fosforilación ( $51.83 \pm 11.75$ ).

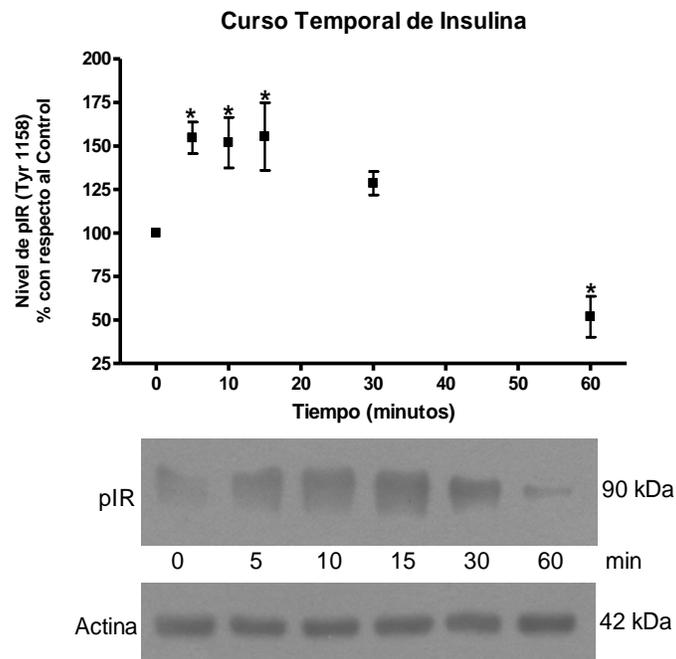


Figura 1. Curso temporal del efecto de insulina en los niveles de fosforilación del receptor de insulina en tirosina 1158. Las células COS - 7 se incubaron con 100 nM de insulina a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  con respecto al control.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Las acciones de insulina se llevan a cabo por medio de la activación de dos vías, una de ellas es la vía de PI3K/Akt, por lo cual determinamos la activación de Akt por medio de los niveles de fosforilación en el residuo de serina 473. En la Figura 2 se observa un incremento de 184% a los 5 min del estímulo con 100 nM de insulina ( $284.4 \pm 24.9$ ), con el efecto máximo a los 15 min ( $369.2 \pm 31.52$ ) seguido de un disminución, sin llegar al estado basal a los 60 minutos ( $176.8 \pm 22.12$ ).

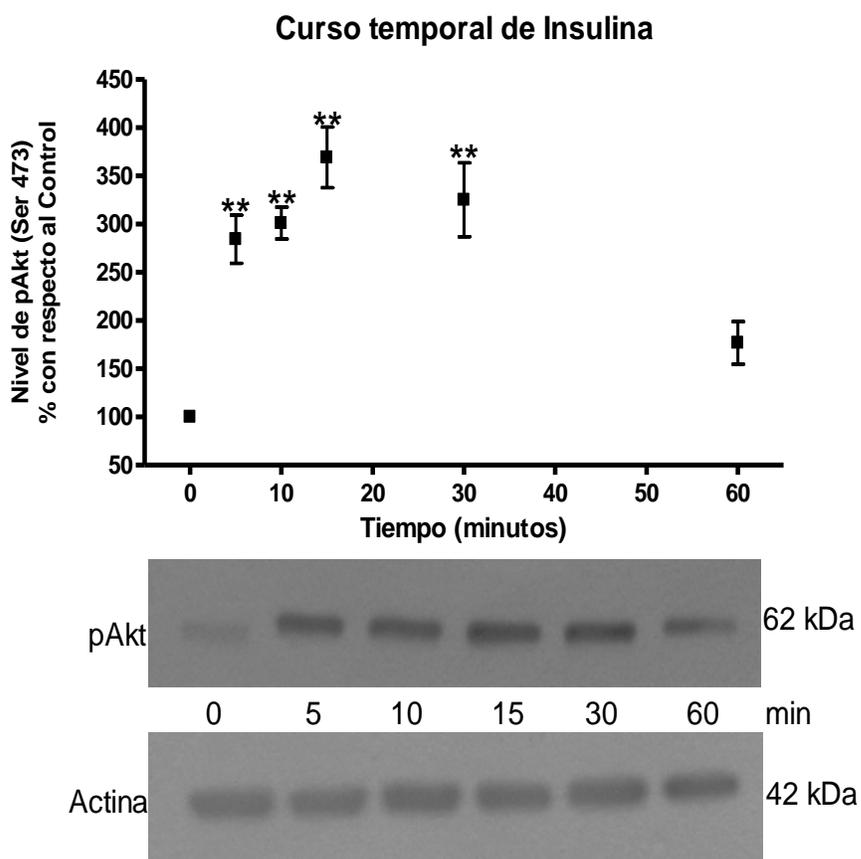


Figura 2. Curso temporal del efecto de insulina en los niveles de fosforilación de Akt en la serina 473. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de insulina a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

La otra vía de señalización que es activada por la insulina es la de las MAPKs, la cual se evaluó por medio de los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los residuos de treonina 202 y tirosina 204 (Figura 3). El estímulo de 100 nM de insulina induce un incremento de los niveles de fosforilación de ERK1/2, observando un efecto máximo a las 5 min ( $626 \pm 27.74$ ), seguido de una disminución, siendo aún significativo, ya que hay un aumento, de al menos de 3 veces más a los 30 min del estímulo ( $377.7 \pm 67.29$ ).

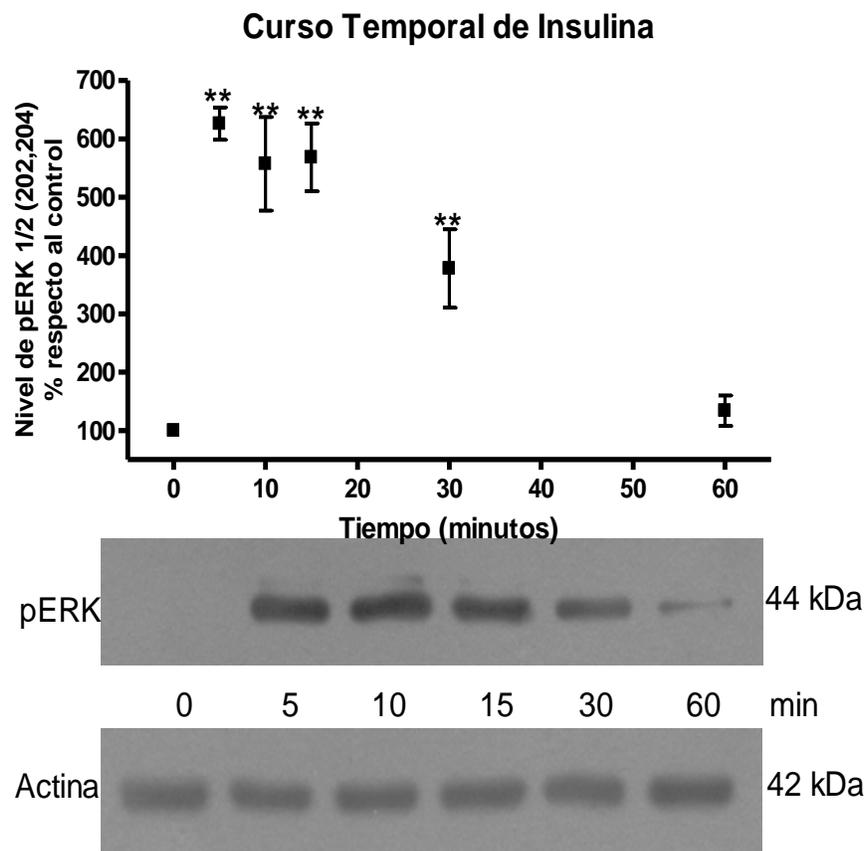


Figura 3. Curso temporal del efecto de insulina en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de insulina a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

# EFECTO DE CRF POR MEDIO DEL RECEPTOR TIPO 1 DE CRF EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Evaluamos el efecto de CRF a través del receptor de CRF tipo 1 en la vía de las MAPK, ya que se ha reportado que induce el incremento en los niveles de fosforilación de ERK1/2. En la figura 4 se observa un aumento en los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducido por el estímulo de 100 nM de CRF, teniendo un comportamiento bifásico; una primera fase en tiempo cortos (5–30 min), con un incremento de al menos tres veces más comparada con el estado basal, teniendo un efecto máximo a los 10 min ( $435.3 \pm 34.69$ ); la segunda fase se obtiene un incremento más discreto, apenas siendo del doble, a los 150 min ( $214.1 \pm 29.46$ ).

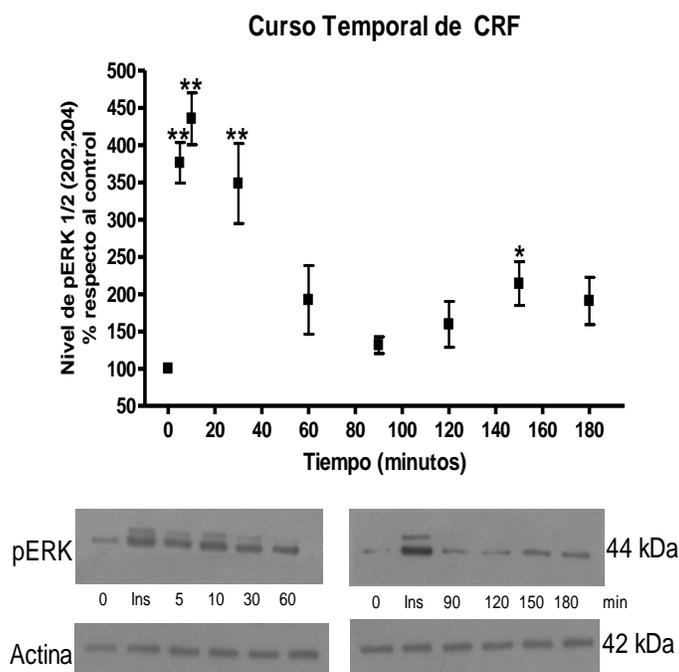


Figura 4. Curso temporal del efecto de CRF en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de CRF a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 5$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Dado que CRF provoca la activación de una de las vías que estimula la insulina, la cascada de MAPK, decidimos evaluar la activación de la vía de PI3K/Akt, por medio de los niveles de fosforilación de Akt (Figura 5). En la gráfica se observa un incremento en los niveles de fosforilación de Akt estimulados con 100 nM de CRF, este efecto comienza a los 10 min, llegando a ser significativo a los 30 min ( $197 \pm 13.21$ ), con un aumento del doble comparado con la condición basal, permaneciendo este efecto hasta los 150 min ( $207.5 \pm 41.76$ ).

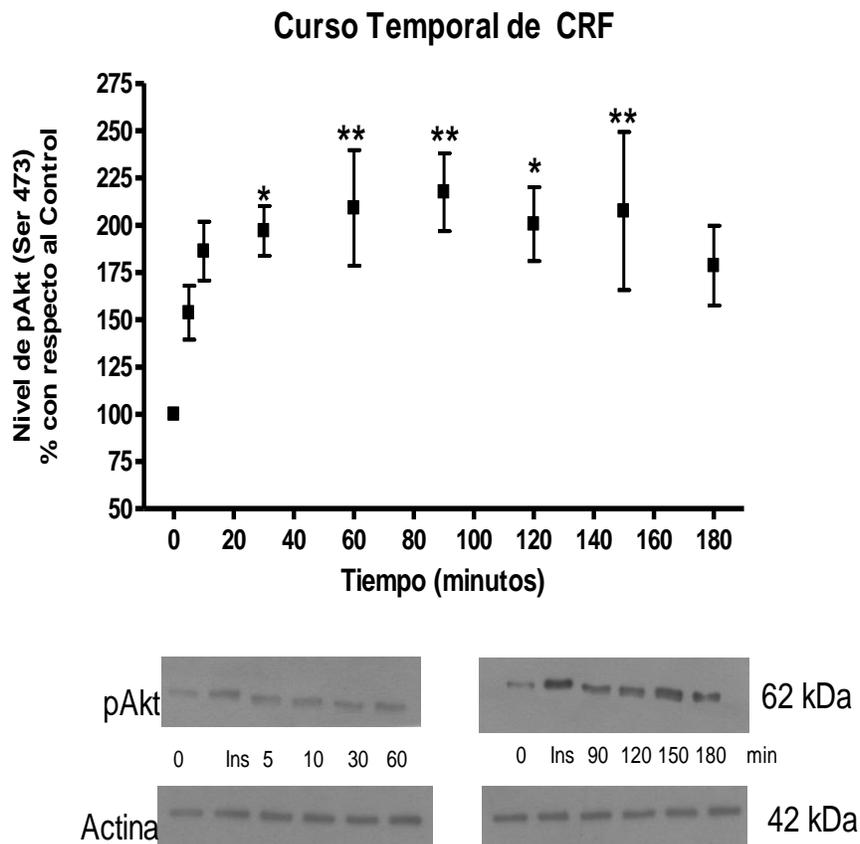


Figura 5. Curso temporal del efecto de CRF en los niveles de fosforilación de Akt en la serina 473. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de CRF a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 6$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Debido a que el CRF es capaz de activar tanto la vía de MAPK y la de PI3K, de una forma independiente de la presencia de insulina, decidimos evaluar si el estímulo de 100 nM de CRF induce la activación del receptor de insulina (Figura 6). Se obtuvo un incremento aproximadamente del 50% a partir de los 10 min ( $144 \pm 16.83$ ), comparado con la condición sin estímulo, permaneciendo este efecto hasta los 150 min ( $150.2 \pm 13.58$ ), con el efecto máximo del 64% a los 90 minutos ( $164.8 \pm 6.3$ ), teniendo un comportamiento parecido al observado en los niveles de fosforilación de Akt.

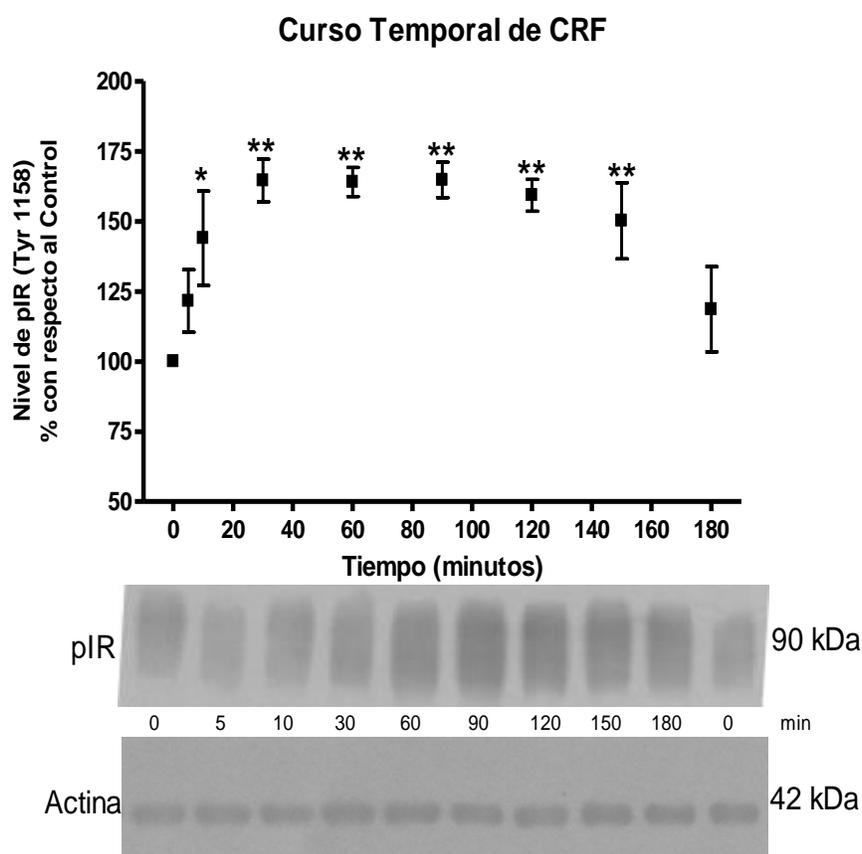


Figura 6. Curso temporal del efecto de CRF en los niveles de fosforilación del receptor de insulina en tirosina 1158. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de CRF a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 5$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

# EFECTO DE UCN 1 POR MEDIO DEL RECEPTOR TIPO 1 DE CRF EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

De acuerdo con los resultados anteriores, decidimos averiguar si la activación del receptor de CRF tipo 1 con otro ligando induce el mismo efecto provocado por estímulos de CRF, por lo cual utilizamos UCN 1, el cual presenta mayor afinidad por el receptor (Figura 7). Al igual que lo obtenido con CRF, el estímulo con 100 nM de UCN1 induce un incremento bifásico en los niveles de fosforilación de ERK1/2, presentando una primera fase en tiempos cortos (5–30 min), con un aumento al menos de 3 veces más, alcanzando el efecto máximo a las 10 min ( $567.8 \pm 121.7$ ); la segunda fase inicia a los 90 min ( $229.6 \pm 18.09$ ) y se observa un incremento de 4 veces más a los 180 min ( $396.7 \pm 26.99$ ).

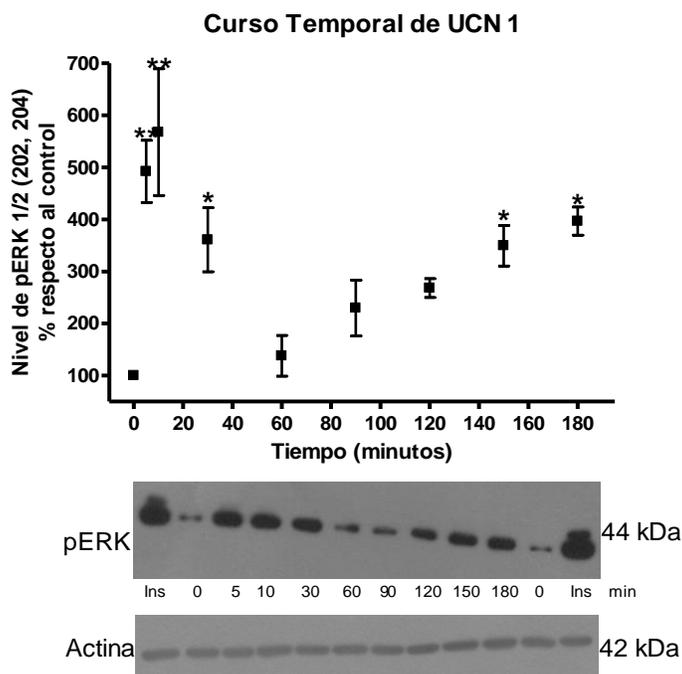


Figura 7. Curso temporal del efecto de UCN1 en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de UCN1 a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Debido a que UCN 1 es capaz de inducir el mismo efecto que CRF en la vía de las MAPK, evaluamos si también provoca la activación de la cascada de PI3K/Akt (Figura 8). El estímulo de UCN1 genera un comportamiento diferente al observado con el estímulo de CRF, ya que el tratamiento con 100 nM de UCN 1 induce un incremento en los niveles de fosforilación de Akt desde los 5 min ( $200.1 \pm 18.41$ ), manteniendo el efecto hasta los 90 min ( $179.1 \pm 9.26$ ), con el aumento máximo de 125%, comparado con el estado basal, a los 10 min ( $225.4 \pm 24.05$ ).

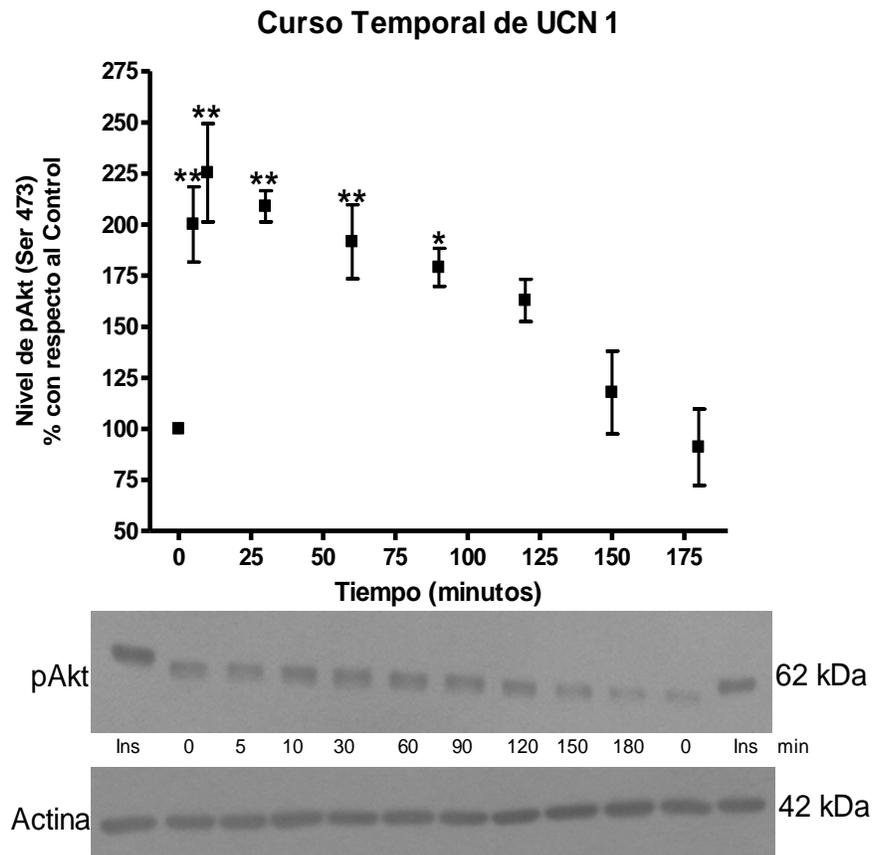


Figura 8. Curso temporal del efecto UCN1 en los niveles de fosforilación de Akt en serina 473. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de UCN1 a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 5$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Al igual que el CRF, UCN 1 activa las dos vías implicadas en las acciones de la insulina, por lo cual nos interesó si estos efectos observados, se deben a la activación del receptor de insulina (Figura 9). El estímulo con 100 nM de UCN 1 induce el aumento de los niveles de fosforilación del receptor a partir de los 10 min ( $143.3 \pm 7.32$ ), siguiendo el incremento hasta llegar al 80% por arriba del estado basal a las 180 min ( $183.3 \pm 14.22$ ), teniendo un comportamiento parecido al obtenido con el estímulo con CRF.

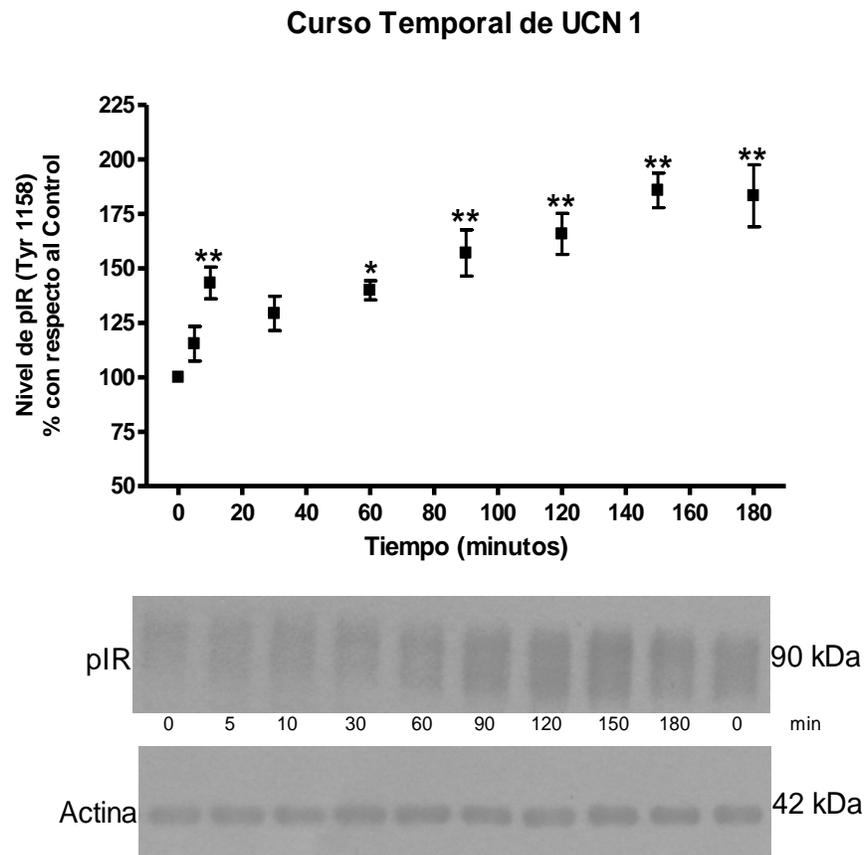


Figura 9. Curso temporal del efecto de UCN 1 en los niveles de fosforilación del receptor de insulina en tirosina 1158. Las células COS-7 se incubaron con 100 nM de UCN1 a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos), se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.  $n = 5$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

# EFECTO DE LOS INHIBIDORES AG1024 Y PP2 EN LA VÍA DE INSULINA

Los efectos inducidos por CRF y UNC1, al activar el receptor de CRF<sub>1</sub> en la activación de MAPK y PI3K/Akt se pueda deber a la transactivación del receptor de insulina, por lo cual evaluamos el efecto del inhibidor del receptor de insulina y del receptor de IGF, AG1024, en la vía de señalización de insulina estimulada por insulina, aunque se ha reportado que la IC<sub>50</sub> es de 80  $\mu$ M. Realizamos un ensayo de dosis-respuesta del AG1024, el cual se incubó por una hora previo al estímulo de 10 nM de insulina (Figura 10). En la vía de PI3K/Akt, la insulina induce un incremento de 5 veces más comparado con el estado basal ( $21.02 \pm 6.76$ ); el incremento de la dosis de AG1024 induce la reducción en los niveles de fosforilación de Akt inducidos por insulina, siendo significativo a la concentración de 100  $\mu$ M de AG1024 ( $36.33 \pm 10.81$ ).

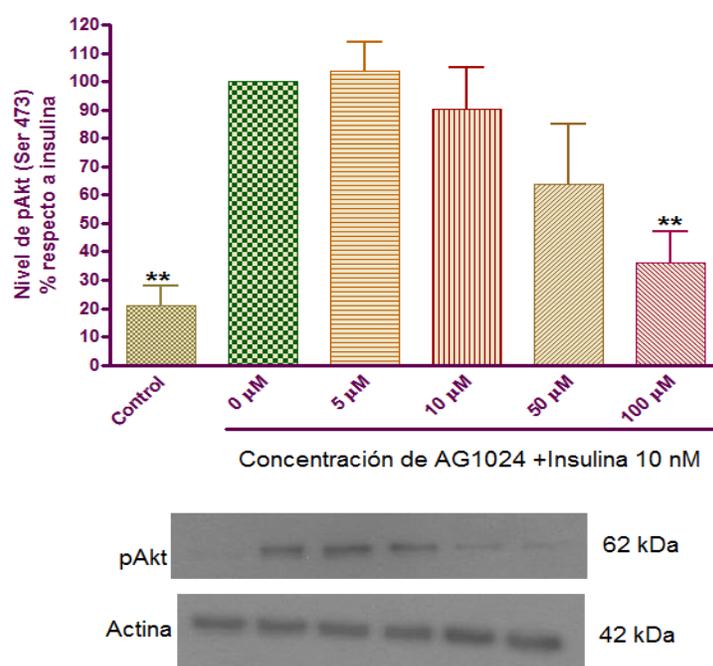


Figura 10. Dosis respuesta del efecto de AG1024 previo al estímulo de insulina en los niveles de fosforilación de Akt en la serina 473. Las células COS-7 se incubaron con AG1024 a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100  $\mu$ M) por una hora previo al estímulo de 10 nM de insulina por 10 minutos, se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*\*  $p < 0.01$  con respecto al estímulo de insulina.  $n = 3$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

También se evaluó el efecto de AG1024 en la vía de MAPK. Al igual que Akt, se observa en la figura 11 un incremento de 5 veces más en los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducidos por insulina, comparando con la condición control ( $23.14 \pm 3.73$ ), la preincubación de las células con AG1024 evita este incremento provocado por 10 nM de insulina, siendo significativo a partir de los 50  $\mu\text{M}$  ( $60.21 \pm 14.51$ ), con una mayor efecto a los 100  $\mu\text{M}$  ( $41.77 \pm 7.1$ ), disminuyendo alrededor de un 80% los niveles de fosforilación de ERK 1/2 estimulado por insulina.

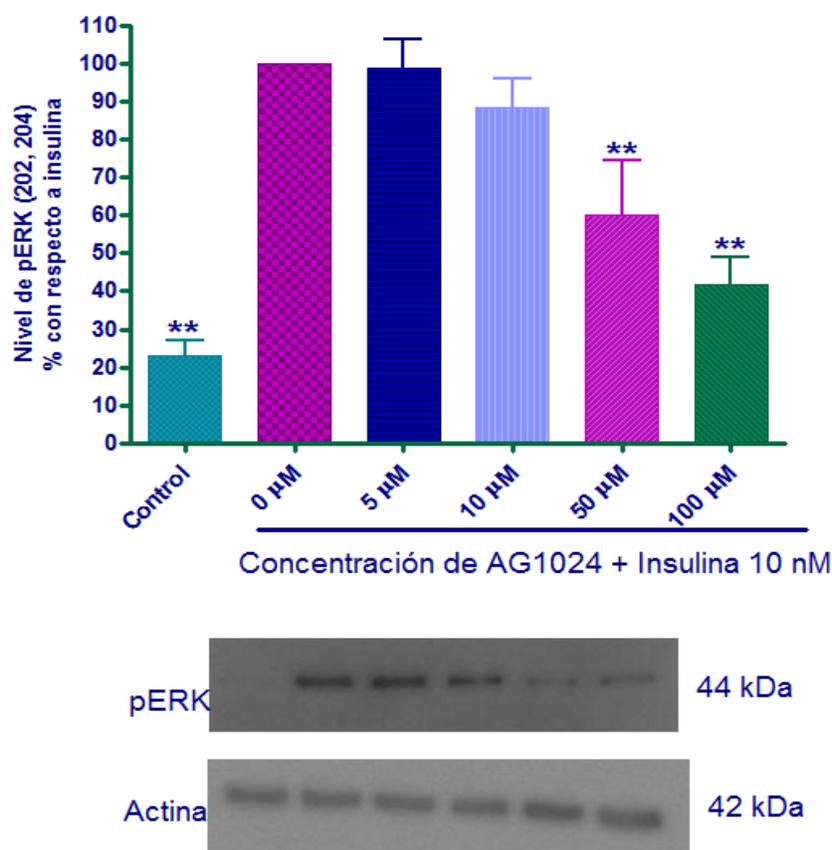


Figura 11. Dosis respuesta del efecto de AG1024 previo al estímulo de insulina en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 en treonina 202 y tirosina 204. Las células COS-7 se incubaron con AG1024 a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) por una hora previo al estímulo de 10 nM de insulina por 10 minutos, se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*\*  $p < 0.01$  con respecto al estímulo de insulina.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga

Otra proteína que puede estar implicada en los efectos observados por la activación del receptor de CRF<sub>1</sub>, en los incrementos en los niveles de fosforilación de Akt y ERK, es la cinasa de tirosinas Src; para ello utilizamos un inhibidor de Src, PP2, para lo cual es necesario conocer la dosis a utilizar (Figuras 12 y 13). Realizamos una dosis respuesta de PP2, para lo cual el inhibidor se incubó por 30 minutos antes del estímulo de 10 nM de insulina; la insulina induce un aumento del doble en los niveles de fosforilación de Akt, comparada con la condición sin estímulo ( $46.78 \pm 6.1$ ), mientras que el inhibidor a 20  $\mu\text{M}$  ( $58.24 \pm 5.12$ ) disminuye el 80% del efecto de insulina en la fosforilación de Akt (Figura 12).

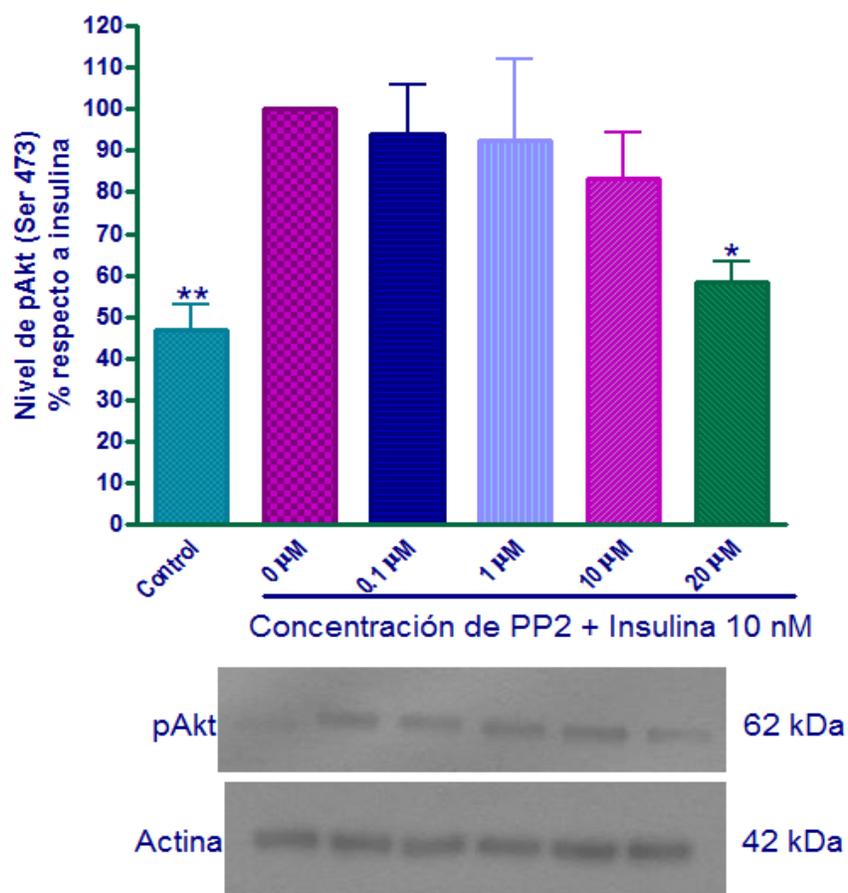


Figura 12. Dosis respuesta del efecto de una aplicación de PP2 previa al estímulo de insulina en los niveles de fosforilación de Akt en serina 473. Las células COS-7 se incubaron con PP2 a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) por media hora previo al estímulo de 10 nM de insulina por 10 minutos, se hizo un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al estímulo de insulina.  $n = 4$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga.

En el caso de ERK, el inhibidor Src indujo la disminución del efecto provocado por insulina a partir de 1  $\mu\text{M}$  de PP2 ( $69.03 \pm 9.05$ ), una reducción del 40%; a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de PP2 ( $46.81 \pm 10.61$ ) disminuyendo un 70%, en tanto que la concentración de 20  $\mu\text{M}$  de PP2 ( $11.23 \pm 1.9$ ) eliminando por completo el efecto de insulina, llevándolo por debajo de la condición basal (Figura 13).

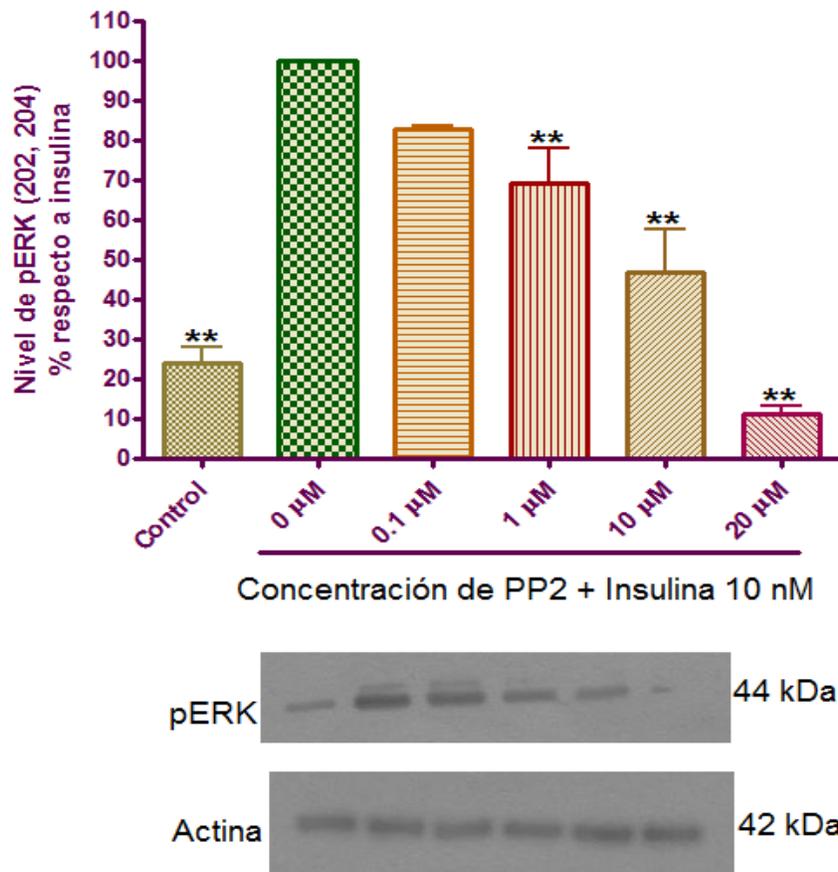


Figura 13. Dosis respuesta del efecto de una aplicación PP2 previa al estímulo de insulina en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204. Las células COS-7 se incubaron con PP2 a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) por media hora previo al estímulo de 10 nM de insulina por 10 minutos, se realizó un análisis de ANOVA post-hoc test Dunnett. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  con respecto al estímulo de insulina.  $n = 3$ , se muestra un blot representativo de la proteína de interés con el control de carga.

## Discusión

El receptor CRF<sub>1</sub> es ampliamente expresado en sistema nervioso, participando en la regulación del eje HPA. Sin embargo es expresado en varios tejidos periféricos como son piel, bazo, testículos, ovarios, placenta, colon, glándula suprarrenal y tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa, en los que se incluye las células  $\beta$ -pancreáticas, músculo esquelético, tejido adiposo pardo y blanco; sin embargo, existen pocos trabajos que aborden el efecto de la activación del receptor CRF<sub>1</sub> en la vía de señalización de la insulina en tejidos periféricos, que están involucrados en la homeostasis de la glucosa. Con la finalidad de explorar el efecto de la activación del receptor CRF<sub>1</sub> por sus ligandos, CRF y UCN1, en las vías activadas por insulina, decidimos utilizar la línea celular COS-7, la cual no expresa ninguno de los receptores de CRF, fue transfectada con el receptor CRF<sub>1</sub>; este modelo nos sirve para evaluar solamente el efecto del receptor CRF<sub>1</sub>, sin la interferencia de activar al receptor CRF<sub>2</sub>.

Como primer objetivo, evaluamos la activación de la vía de señalización de insulina en nuestro modelo, las células COS-7 se estimularon con 100 nM de insulina a diferentes tiempos (5-60 min), observando un incremento en los niveles de fosforilación en tirosina en el receptor de insulina a partir de los 5 min, que se mantiene hasta los 15 min, indicando la activación del receptor, por lo cual evaluamos la vía de PI3K/Akt midiendo los niveles de fosforilación de Akt y la vía de MAPK por medio de los niveles de fosforilación de ERK1/2, observando un incremento en ambas vías a partir de los 5 min hasta los 30 min, datos parecidos a trabajos anteriores del laboratorio [52]. A los 60 min de estimulación con insulina se observa que los niveles de fosforilación en el receptor de insulina, Akt y ERK1/2 regresan a las condiciones basales, indicando el apagado de la vía de señalización de insulina por mecanismos de retroalimentación negativa, en los que se encuentran las fosfatasas de tirosina como son PTP-1B y SHP-2, al igual que fosfatasas de treonina/serina como es PP2A. Por los datos anteriores, en las

células COS-7 la insulina es capaz de activar las vías de PI3K/Akt y MAPK, por lo cual es un buen modelo para realizar nuestro estudio.

Se ha reportado que diversos GPCRs, como el receptor AT<sub>1</sub> y el receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico, provocan un incremento en los niveles de fosforilación de ERK1/2, por dos mecanismos diferentes, uno asociado a la proteína G y cinasas activadas por segundos mensajeros, mientras que el segundo mecanismo involucra la señal mediada por β-arrestina [53,54]. Al igual que estos receptores, la activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por CRF o UCN1 induce un incremento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 de forma bifásica.

La primera fase observada en tiempos cortos (5–30 min), el incremento máximo en los niveles de fosforilación de ERK1/2 son de 4 a 5 veces por arriba del basal a los 10 min. Este efecto podría ser mediado por una vía dependiente de la proteína G. En este sentido, se ha reportado que el receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico, el cual también está acoplado a una proteína Gas, el incremento que ocasiona en la fosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos es debido a un incremento en los niveles de AMPc, el cual activa a la GTPasa pequeña Rap-1 que, a su vez, activa a B-Raf, esta última activa la vía MEK/ERK [55-57]. Este mecanismo también se ha reportado que en una línea celular derivada de hipófisis de ratón, la cual expresa endógenamente el receptor de CRF<sub>1</sub>, estímulos de CRF y UCN1 provocan un incremento transitorio en los niveles de ERK1/2 fosforilado, este efecto es dependiente de AMPc, en la cual participa EPAC que es un GEF activado por incremento de los niveles de AMPc, la activación de EPAC ocasiona el intercambio de nucleótidos de guanina en las GTPasa pequeñas, Ras y Rap-1, las cuales son activadas e inducen una cascada de fosforilaciones iniciada por la activación de Raf y la subsecuente activación de la vía MAPK [58]. Por otro lado en la línea celular HL-1, cardiomiocitos auriculares de ratón, un tratamiento de 10 nM de UCN1 también incrementa los niveles de ERK fosforilado por un mecanismo dependiente de Src, Yuan et al (2010) sugieren que Src presenta una interacción directa con el receptor de CRF<sub>1</sub> activado por UCN1, la interacción

receptor activado/Src ocasiona la fosforilación/activación de Src [59]. Se ha reportado que la activación de Src por GPCRs puede ser mediada por la subunidades  $\beta\gamma$ , al estar Src activa puede fosforilar a Shc, la cual recluta a Grb2/SOS para activar a la GTPasa Ras e iniciar la activación de la vía MAPK [57, 60]. También se ha reportado que la activación de Src puede mediar la transactivación de receptores RTKs, como son el receptor de EGF, BDNF e IGF, estimulado por GPCRs, ya que Src fosforila en residuos de tirosina a los RTK, lo cual induce su activación y el encendido de la vía de señalización, MAPK [60,61]. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, en células COS-7 transfectadas con el receptor de CRF<sub>1</sub>, el incremento en tiempos cortos de los niveles de fosforilación de ERK1/2 es mediado por la transactivación del receptor de EGF, por mecanismos que dependen de la activación de la cinasa Src.

En el trabajo de Bonfiglio et al (2013), en células HT22 de hipocampo, reportan que la activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por sus ligandos incrementa de forma bifásica los niveles ERK1/2 fosforilado, en donde la fase temprana es dependiente de AMPc y B-Raf, un mecanismo ya antes mencionado; mientras que la segunda fase es dependiente de  $\beta$ -arrestina 2 [62]. En ese mismo trabajo se demostró que la  $\beta$ -arrestina 2 juega un rol importante en la desensibilización e internalización del receptor de CRF<sub>1</sub>, ya que funciona como una proteína de andamiaje, que además de reclutar proteínas involucradas en el proceso de endocitosis, es capaz de reclutar a proteínas involucradas en la vía MAPK; proponiendo la formación de un complejo con la  $\beta$ -arrestina 2 unida al receptor de CRF<sub>1</sub> endocitado, en donde se reclutan Raf, MEK y ERK, facilitando la fosforilación/activación de la vía MAPK [49, 62]. Hay que tener en consideración que el receptor de CRF<sub>1</sub> no se internaliza junto con la  $\beta$ -arrestina, ya que su interacción es transitoria, y que por otra parte, la  $\beta$ -arrestina 2 presenta un dominio de unión a Src, la cual al ser activada puede fosforilar a Shc o transactivar receptores RTK [49, 55, 57, 61].

La activación del receptor CRF<sub>1</sub>, además de incrementar los niveles de fosforilación de ERK1/2, también incrementa los niveles de Akt fosforilado, aunque hay pocos reportes. En el trabajo de Vale et al (2014), se observa un incremento en los niveles de fosforilación de Akt bajo estimulación a tiempos largos con CRF o UCN1 (4-24 horas) en células β–pancreáticas de rata, INS–1. El incremento de Akt fosforilado es mediado por PI3K, observándose previamente un aumento en los niveles proteicos de IRS2 inducidos por CREB [63]. El incremento en los niveles de Akt fosforilado obtenidos en este trabajo es en tiempos largos (30-150 min; figura 5 y 8), que coinciden temporalmente con el incremento en los niveles de fosforilación del receptor de insulina (10–150 minutos figura 6 y 9), lo que sugiere una transactivación del receptor de insulina y la activación de su vía de señalización, la cual incluye PI3K/Akt y MAPK, por medio de un mecanismo dependiente de β–arrestina 2 y Src, explicando la segunda fase de ERK1/2 fosforilado y la fosforilación de Akt a tiempos largos. [49, 55, 61]. Por otro lado, el estímulo con UCN1 causa incremento en Akt fosforilado, también en tiempo cortos (5–10 minutos), en los cuales no se presenta un incremento en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, sugiriendo un mecanismo diferente. En este sentido se ha reportado que la activación del receptor CRF<sub>1</sub> en células HEK293, las cuales se transfectaron con el receptor CRF<sub>1</sub>, el estímulo de UCN1 causa un incremento transitorio en los niveles de fosforilación de Akt (5–10 min) dependiente de PI3K por un mecanismo que involucra las subunidades βγ [64]; también se ha reportado que el incremento de AMPc induce la activación de AMPc–GEF, como es EPAC, el cual activa a Rap, está a su vez activa a Src que es capaz de inducir la activación de PI3K y el subsecuente incremento de los niveles de Akt fosforilado [65]; estos mecanismos podrían explicar el incremento en los niveles fosforilados de Akt inducidos por la activación del receptor de CRF1 por CRF en tiempos largos, o UCN1 tanto en tiempos largos como en tiempos cortos.

Analizamos el efecto del inhibidor del receptor de insulina AG1024 en las vías de señalización activadas por insulina. El AG1024 inhiben la autofosforilación

del receptor y la actividad tirosin cinasa, evitando así la activación del receptor; realizamos una curva dosis respuesta, en la cual la dosis de 100  $\mu\text{M}$  de AG1024 causa un decremento del 80% en los niveles de fosforilación de Akt y ERK1/2 inducidos por insulina, esta dosis esta dentro del rango del la  $\text{IC}_{50}$  reportada, que es de 80  $\mu\text{M}$  [66].

En los mecanismos propuestos, una de las proteínas implicada en varios de ellos es Src, por lo cual decidimos evaluar su participación en el incremento en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, Akt y ERK1/2 por insulina. Realizamos una curva dosis respuesta del inhibidor PP2, en la cual, la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de PP2 induce un decremento del 80% en los niveles de fosforilación de Akt inducidos por insulina; se ha reportado que Src se asocia con el receptor de insulina, además Src es fosforilado/activado y participa en la vía de señalización de la insulina; debido a que causa un incremento en la fosforilación del receptor de insulina [67]. Por otra parte, a partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de PP2 ocasiona un decremento del 40% en los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducidos por insulina, y la concentración de 20  $\mu\text{M}$  de PP2 decrementó los niveles de ERK1/2 fosforilado por debajo del basal, los resultados sugieren que Src además de fosforilar el receptor de insulina, actúa directamente en la vía de MAPK, se ha reportado que Src fosforila directamente a Shc, que forma parte de esta vía [68].

En conclusión la activación del receptor  $\text{CRF}_1$  por CRF o UCN1 induce un incremento en los niveles de fosforilación de ERK1/2 de forma bifásica, la cual implica dos mecanismos diferentes, basándonos en nuestros resultados y el análisis anterior, podemos inferir que la primera fase es dependiente de proteína G, mientras la segunda fase implica una vía dependiente de la transactivación del receptor de insulina. Al igual el incremento de Akt fosforilado es mediada por la transactivación del receptor de insulina.

## Conclusiones

- La Insulina es capaz de promover la activación de su vía de señalización en células COS – 7.
- La activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por CRF o UCN1 inducen un incremento bifásico en los niveles de fosforilación de ERK1/2.
- La activación del receptor CRF<sub>1</sub> por CRF promueve el incremento en los niveles de fosforilación de Akt, mostrando un efecto sostenido hasta los 150 min.
- La activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por UCN1 induce un incremento en los niveles de fosforilación de Akt, mostrando un efecto máximo a los 10 min, el cual disminuye a partir de los 30 min del estímulo.
- La activación del receptor de CRF<sub>1</sub> por CRF o UCN1 provocan un incremento en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, sugiriendo un posible transactivación del IR.
- Src participa en la vía de señalización de la insulina, principalmente en la vía MAKP en las células COS–7.
- La dosis a utilizar del inhibidor AG1024, un inhibidor del receptor de insulina es de 100  $\mu$ M

# Perspectivas

- Verificar la transactivación del receptor de insulina por CRF y UCN1, por medio de la utilización del inhibidor AG1024.
- Probar la participación de Src en el efecto ocasionado por CRF y UCN1 en el incremento en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, Akt y ERK1/2
- Probar la participación de la  $\beta$ -arrestina 2 en la transactivación del receptor de insulina.
- Averiguar si AMPc-GEF participan en la fosforilación de ERK y Akt en tiempos cortos.
- Averiguar si la transactivación del receptor de insulina por CRF o UCN1 induce la translocación de Glut4 a la membrana plasmática.

# Bibliografía

[1] Jitrapakdee S, Forbes B (2011), *Insulin Secretion and Actions, Medical Complications of Type 2 Diabetes*, ISBN: 978-953-307-363-7.

[2] Newsholme P, Cruzat V, Arfuso Fand Keane K (2014), Nutrient regulation of insulin secretion and action, *Journal of Endocrinology*, 221, 105–120.

[3] Ward C Lawrence M, (2011), Landmarks in insulin research, *Frontiers in Endocrinology*, 2, 4 -11.

[4] Szablewski L (2011), glucose homeostasis and insulin resistance, editorial Betham Book, 46 – 56.

[5] Cruz M, Velasco E, Kumate J (2001), Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa, *Gaceta Médica de México* 137, 135 – 146.

[6] Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y (2013), Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective, *Journal of Diabetes Investigation*, 4, 511 – 516.

[7] Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, Galvanovskis J (2008), Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion, *Journal Physiology*, 586.14, 3313–3324.

[8] Malaisse W (2014), Insulin release: the receptor hypothesis, *Diabetologia*, 57, 1287–1290.

[9] Boucher J, Kleinridders A Kahn R (2014), Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 – 23.

[10] Olivares J, Arellano A (2008), bases moleculares de las acciones de la insulina, *Revista Educativa de Bioquímica de la UNAM*, 27, 9 – 18.

[11] Avruch J (1998), Insulin signal transduction through protein kinase cascades, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 31–48.

[12] Youngren J (2007), Regulation of insulin receptor function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 873 – 891.

[13] Ciaraldi T (2010), Cellular Mechanisms of Insulin Action, Poretsky L (ed.), *Principles of Diabetes Mellitus*, 75 – 87.

[14] Lawlor M, Alessi D (2001), PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?, *Journal of Cell Science*, 114, 2903 -2910.

[15] Olivares J, (2008), Bases moleculares del síndrome metabólico y resistencia a la insulina, 185 – 214.

[16] Iwata M, Haruta T, Usui I, Takata Y, Takano A, Uno T, Kawahara J, Ueno E, Sasaoka T, Ishibashi O, Kobayashi M (2001), Pioglitazone Ameliorates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Insulin Resistance by a Mechanism Independent of Adipogenic Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ , *Diabetes*, 50, 1083 – 1092.

[17] Hu S, Di Shi L, Wang J, Wang Y, Lou Q, Xue C (2013), Eicosapentaenoic acid-enriched phosphatidylcholine isolated from *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects via activating phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signal pathway, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 457-463.

[18] Nardi F, Lipina C, Magill D, Hassan R, Hajduch E, Gray A, Hundal H (2014), Enhanced Insulin Sensitivity Associated with Provision of Mono and

Polyunsaturated Fatty Acids in Skeletal Muscle Cells Involves Counter Modulation of PP2A, PLOS ONE, 9, e92255.

[19] Munir K, Quon M (2013), Distinct Mechanisms for Globular Adiponectin That Integrate Vascular and Metabolic Actions of Insulin to Help Maintain Coordinated Cardiovascular and Glucose Homeostasis, *Circulation Research*, 112, 1205 – 1207.

[20] Souza E, Grigoriadis D (2002), Releasing Factor: physiology, pharmacology, and role in central nervous system disorders, *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, Chapter 7: Corticotropin Releasing Factor 91-107.

[21] Olivares J, Hauger R (2012), Señalización y Estrés: Mecanismos de acción y regulación del Factor Liberador de Corticotropina, 7° Congreso de Biología Oral, UNAM, 11 – 21.

[22] Turnbull A, Rivier C (1997), Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Endocrine Responses to Stress: CRF Receptors, Binding Protein, and Related Peptides, *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 215, 1- 10.

[23] Hauger R, Risbrough V, Oakley R, Olivares J, Dautzenberge F (2009), Role of CRF Receptor Signaling in Stress Vulnerability, Anxiety, and Depression, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179, 120–143.

[24] Hauger R, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg F (2006), Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets, *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 5, 453–479.

[25] Sztainberg Y, Chen A. (2012), Neuropeptide Regulation of Stress- Induced Behavior: Insights from the CRF/Urocortin Family, Fink G, Pfaff DW, Levine JE, eds. *Handbook of Neuroendocrinology*, Elsevier, 355-376

[26] Arzt E, Holsboer F (2006), CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 27, 531 – 538.

[27] Sydow S, Radulovic J, Dautzenberg F, Spiess J (1997), Structure–function relationship of different domains of the rat corticotrophin releasing factor receptor, *Molecular Brain Research* , 52, 182–193.

[28] Dautzenberg F, Dietrich K, Paichaudhuri M, Spiess J (1997), Identification of Two Corticotropin-Releasing Factor Receptors from *Xenopus laevis* with High Ligand Selectivity: Unusual Pharmacology of the Type 1, *Journal of Neurochemistry*, 69, 1640 – 1649.

[29] Wille S, Sydow S, Palchoudhuri M, Spiess J, Dautzenberg F (1999), Identification of Amino Acids in the N Terminal Domain of Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 that Are Important Determinants of High-Affinity Ligand Binding, *Journal of Neurochemistry*, 72, 388 – 395.

[30] Hollenstein K, Kean J, Bortolato A, Cheng R, Dore A, Jazayeri A, Cooke R, Weir M, Marshall F (2013), Structure of class B GPCR corticotropinreleasing factor receptor 1, *Nature*, 449, 438-443.

[31] Dautzenberg F, Hauger R (2002), The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 23, 71 – 77.

[32] Dautzenberga F, Kilpatrick G, Hauger R, Moreau J (2001), Molecular biology of the CRH receptors— in the mood, *Peptides*, 22, 753–760.

[33] Sakamoto R, Matsubarab E, Nomuraa M, Wangan L, Kawaharaa Y, Yanaseb T, Nawataa H, Takayanagi R (2013), Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice, *Metabolism*, 62, 1739-1748.

[34] Hoare S, Sullivan S, Schwarz D, Ling N, Vale W, Crowe P, Grigoriadis D (2014), Ligand Affinity for Amino Terminal and Juxtamembrane Domains of the Corticotropin Releasing Factor Type I Receptor: Regulation by G-Protein and Nonpeptide Antagonists, *Biochemistry*, 43, 3996-4011.

[35] Salim S, Hite B, Eikenburg D (2007), Activation of the CRF1 receptor causes ERK1/2 mediated increase in GRK3 expression in CATH.a cells, *FEBS Letters*, 581, 3204–3210.

[36] Schulkin J, Gold P, McEwen B (1998), Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load, *Psychoneuroendocrinology*, 23, 219–243.

[37] Palchadhuri M, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg F (1998), Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri* Cloning, functional expression and tissue distribution, *European Journal Biochemistry*, 258, 78 – 84.

[38] Hoare S, Sullivan S, Pahuja A, Ling N, Crowe P, Grigoriadis D (2003), Conformational states of the corticotropin releasing factor 1 (CRF1) receptor: detection, and pharmacological evaluation by peptide ligands, *Peptides*, 24, 1881–1897.

[39] Richard D, Lin Q, Timofeeva E (2002), The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance, *European Journal of Pharmacology*, 440, 189– 197.

[40] Ruhmann A, Bonk I, Kopke A (1999), High-affinity binding of urocortin and astressin but not CRF to G protein-uncoupled CRFR1, *Peptides*, 20, 1311–1319.

[41] Kasckow J, Mulchahey J, Aguilera G (2003), Corticotropin – Releasing Hormone (CRH) expression, and protein kinase A mediated CRH Receptor Signalling in a immortalized hipotalamic cell line, *Journal of Neuroendocrinology*, 15, 521 – 529.

[42] Reul J, Holsboer F (2002), Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression, *Neurosciences*, 2, 23–33.

[43] Dautzenberg F, Higelin J, Teichert U (2000), Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells, *European Journal of Pharmacology* , 390, 51–59.

[44] Perry S, Junger S, Kohout T, Hoar S, Struthers R, Grigoriadis D, Mak R (2005) Distinct Conformations of the Corticotropin Releasing Factor Type 1 Receptor Adopted following Agonist and Antagonist Binding Are Differentially Regulated, *The Journal of Biological Chemistry*, 280,11560–11568

[45] Hauger R, Dautzenberg F, Flaccus A, Liepold T, Spiess J (1997), Regulation of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Function in Human Y-79 Retinoblastoma Cells: Rapid and Reversible Homologous Desensitization but Prolonged Recovery, *Journal of Neurochemistry*, 68, 2308—2316.

[46] Dautzenberg F, Wille S, Braun S, Hauger R (2002), GRK3 regulation during CRF- and urocortin-induced CRF1 receptor desensitization, *Biochemical And Biophysical Research Communications* , 298, 303–308.

[47] Dautzenberg F, Braun S, Hauger R (2001), GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation, *The American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280, 935–946.

[48] Hauger R, Smith R, Braun S, Dautzenberg F, Catt K (2000), Rapid Agonist-Induced Phosphorylation of the Human CRF Receptor, Type 1: A Potential Mechanism for Homologous Desensitization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, 572–576.

[49] Luttrell L, Lefkowitz R (2002), The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals, *Journal of Cell Science*, 115, 455-465.

[50] Oakley R, Olivares J, Hudson C, Flores F, Dautzenberg F, Hauger R (2006), Carboxyl-terminal and intracellular loop sites for CRF1 receptor phosphorylation and  $\beta$ -arrestin-2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses, *The American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 293, 209–222.

[51] Huising M, Meulen T, Vaughan J, Matsumoto M, Donaldson C, Park H, Billestrup N, Vale W (2009), CRFR1 is expressed on pancreatic  $\beta$  cells, promotes  $\beta$  cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner, *PNAS*, 107, 912 – 917.

[52] María de la Luz Huidobro Gálvez (2013), Efecto del Factor Liberador de Corticotropina en la Señalización de Insulina, a través del Receptor CRF1, Tesis del CINVESTAV.

[53] Shenoy S, Lefkowitz R (2005), Angiotensin II–Stimulated Signaling Through G Proteins and b-Arrestin, *Science's STK*, 2005, 311-312.

[54] Wu Y, Zhao Y, Ma X, Zhu Y, Patel J, Nie Z (2013), The Arf GAP AGAP2 interacts with  $\beta$ -arrestin2 and regulates  $\beta$ 2- adrenergic receptor recycling and ERK activation, *Biochemical Journal*, 452, 411–421.

[55] DeFea K (2008),  $\beta$ -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction, *British Journal of Pharmacology*, 153, 298–309.

[56] Dumaz N, Marais R (2005), Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways, *FEBS Journal*, 272, 3491–3504.

[57] Picatoste F, Claro E (2000), Rutas de fosforilación tras la activación de receptores: vía de las MAP quinasas, 373-387.

[58] Van Kolen K, Verstraeten K, Royaux I, De Hoogt R, Gutknecht E, Peeters P (2010), Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2, *Neuropharmacology*, 58, 135–144.

[59] Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, Barry S, Knight R, Saravolatz S, Saravolatz L, Ulgen B, Scarabelli G, Faggian G, Mazzucco A, Saravolatz L, Scarabelli T (2010), Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 325, pág. 1–7.

[60] Luttrell L, Della Rocca G, Biesen T, Luttrelli D, Lefkowitz R (1997), G $\beta$  Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor, *The Journal Of Biological Chemistry*, 272, 4637–4644.

[61] Sánchez E, Arias J (2004), Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G, *Revista Biomedica*, 15, 33-48.

[62] Bonfiglio J, Inda C, Senin S, Maccarrone G, Refojo D, Giacomini D, Turck C, Holsboer F, Arzt E, Silberstein S (2013), B-Raf and CRHR1 Internalization Mediate

Biphasic ERK1/2 Activation by CRH in Hippocampal HT22 Cells, *Molecular Endocrinology*, 27, 491–510.

[63] Blaabjerg L, Christensen G, Matsumoto M, van der Meulen T, Huising M, Billestrup N, Vale W (2014), CRFR1 activation protects against cytokine-induced beta cell death, *Journal of Molecular Endocrinology*, 53, 417-427.

[64] Punn A, Levine M, Grammatopoulos D (2006), Identification of Signaling Molecules Mediating Corticotropin-Releasing Hormone-R1-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Interactions: The Critical Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Regulating ERK1/2 But Not p38 MAPK Activation, *Molecular Endocrinology*, 20, 3179–3195.

[65] Gates A, Hohenester S, Sawkat M, Webster C (2009), cAMP-GEF cytoprotection by Src tyrosine kinase activation of phosphoinositide-3-kinase p110 b/g in rat hepatocytes, *The American Journal Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, 764–774.

[66] Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, Leroith D (1997), Specific Inhibition of Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity and Biological Function by Tyrphostins, *Endocrinology*, 138, 1427-1433.

[67] Rosenzweig T, Aga-Mizrachi S, Bak A, Sampson S (2004), Src tyrosine kinase regulates insulin-induced activation of protein kinase C (PKC)  $\gamma$  in skeletal muscle, *Cellular Signalling*, 16, 1299–1308.

[68] Boney C, Sekimoto H, Gruppuso P, Frackelton A (2001), Src Family Tyrosine Kinases Participate in Insulin-like Growth Factor I Mitogenic Signaling in 3T3-L1 Cells, *Cell Growth and Differentiation*, 12, 379–386.