



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Regulación del gen PEIG-1/GPRC5A
por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato***

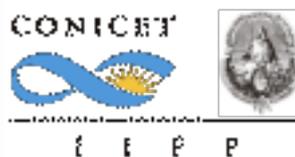
Tesista: Consuelo Mori

Director: Tomás A. Santa Coloma

Codirectora: Cecilia I. Muglia

Año 2020

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas Área Ciencias Biológicas, fue realizado en su mayor parte en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UCA-CONICET), y parcialmente en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP-UNLP-CONICET). El trabajo fue hecho bajo la Dirección del Dr. Tomás A. Santa Coloma y la Codirección de la Dra. Cecilia I. Muglia.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mi apoyo incondicional

A mis hermanas, mi otra mitad

A mi abuela, mi mejor recuerdo

AGRADECIMIENTOS

A mi Director, el Dr. Tomás A. Santa Coloma por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por brindarme sus conocimientos, sus consejos y su dedicación. Por su esfuerzo en la formación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, CONICET- UCA) que me permitió trabajar con tantas comodidades.

A mi Co-directora, la Dra. Cecilia Muglia por aceptar la codirección y dedicarme sus conocimientos y tiempo.

A los organismos que hicieron posible este trabajo de investigación:

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), por los subsidios otorgados (PICT 2012-1278, PICT-2015-1031 y PICT-2016-0648).

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por mi Beca de Doctorado, y por los subsidios (PIP-2016-112201-501002-27 y PUE-2016 22920160100129CO).

A la Pontificia Universidad Católica Argentina, por cedernos su espacio y por su apoyo económico.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme ampliar mi formación y realizar el Doctorado en la misma universidad en la que inicié mi formación obteniendo el título de licenciatura.

A mis compañeros del laboratorio:

Al Dr. Gabriel Valdivieso, por el tiempo que dedicó en mi formación, los conocimientos que me transmitió, por su compañerismo y por su apoyo en esta etapa.

A la Dra. Mariángeles Clauzure, María Aguilar y Romina De´Agostino por su colaboración en el proyecto, apoyo, compañerismo y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros Edgardo Kolkowski, Diego Battiato, Macarena Massip Copiz y Cristian Asensio con quienes compartí estos años de trabajo, por su colaboración y por su compañerismo.

A los que dejaron el laboratorio, Carla Cancio y Verónica Stomayor por el tiempo compartido y su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A mis papas y mis hermanas por apoyarme siempre en todo y estar en los momentos buenos y también en los difíciles de esta carrera.

Al resto de mi familia y a mis amigos de la vida que a pesar de no entender mucho de que se trata este mundo de la ciencia estuvieron siempre acompañándome.

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	iv
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. RECEPTORES GPCRs	2
1.1. Estructura y Función.....	2
1.2. Mecanismos de señalización	4
1.3. Clasificación	8
1.4. Implicancia de los GPCRs en enfermedades y su importancia como blancos terapéuticos	12
2. RECEPTOR GPRC5A	18
2.1. Regulación.....	20
2.1.1. Regulación transcripcional	20
2.1.2. Regulación postranscripcional	22
2.1.3. Modificaciones postraduccionales.....	23
2.2. Vías de señalización reguladas por GPRC5A.....	24
3. GPRC5A Y SU ROL EN EL CÁNCER HUMANO	25
3.1. El cáncer.....	25
3.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	31
3.1.1.1. Fuentes celulares de ROS	35
3.1.1.2. Antioxidantes celulares	37
3.1.2. Muerte celular programada, apoptosis.....	39
3.1.2.1. Las Capasas	43
3.2. Expresión diferencial de GPRC5A en cáncer.....	45
3.2.1. GPRC5A como supresor de tumores	45
3.2.1.1. Cáncer de pulmón	45
3.2.1.2. Cáncer de cabeza y cuello.....	46
3.2.2. GPRC5A como promotor de tumores	46
3.2.2.1. Cáncer de colon.....	47
3.2.2.2. Cáncer gástrico	47
3.2.2.3. Cáncer de páncreas	48
3.2.2.4. Cáncer de próstata	48

3.2.3. Investigaciones contrapuestas en cáncer.....	49
3.2.3.1. Carcinoma hepatocelular.....	49
3.2.3.2. Cáncer de mama.....	49
4. GPRC5A Y SU IMPLICANCIA EN OTRAS ENFERMEDADES	51
5. 12-O-TETRADECANOILFORBOL-13-ACETATO (TPA) Y PROTEÍNA QUINASA C (PKC)	51
.....	51
5.1. El TPA en cáncer	55
5.2. TPA y la producción de ROS.....	59
HIPÓTESIS.....	61
OBJETIVOS.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. MATERIALES	66
2. CULTIVOS CELULARES	67
2.1. Células T84.....	67
2.2. Células Caco-2	67
2.3. Condiciones de cultivo.....	67
3. CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS.....	67
3.1. Descongelamiento.....	67
3.2. Congelamiento	68
4. TRATAMIENTOS.....	68
4.1. Curva de concentración de TPA	69
4.2. Curva de tiempo con TPA	69
4.3. Inhibición de vías señalización	69
4.4. Bloqueo del calcio intracelular con BAPTA-AM	69
4.5. Tratamiento con IL-1 β , IL1RN y C Γ	70
4.6. Inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS)	71
5. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	71
6. RT-PCR EN TIEMPO REAL	72
6.1. Transcripción Reversa	72
6.2. Cuantificación del nivel de expresión de <i>GPRC5A</i> por PCR cuantitativa en tiempo real	73
6.3. Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real	74

7. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1β MEDIANTE EL MÉTODO ELISA	74
8. BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE <i>GPRC5A</i> POR LA TÉCNICA DE CRISPR/Cas9	74
8.1. Preparación de bacterias competentes por “heat-shock”	79
8.2. Transformación de bacterias competentes con plásmidos CRISPR/Cas9 específicos de <i>PEIG-1/GRPC5A</i>	79
8.3. Extracción de ADN Plasmídico Bacteriano por <i>Lisis Alcalina</i>	81
8.4. Selección de bacterias recombinantes por digestión enzimática.....	81
8.5. Transfección por electroporación	82
8.6. Selección de células <i>knock out GPRC5A</i>	83
9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOTS	83
9.1. Extracción de proteínas	83
9.2. Electroforesis y transferencia de proteínas.....	83
9.3. Inmunodetección, Western blots	84
10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA GPRC5A POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	85
11. INMUNOFLUORESCENCIA	85
12. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	86
12.1. Medición de ROS celular.....	86
12.1.1. Medición por espectrofluorimetría.....	86
12.1.2. Medición por citometría de flujo	87
12.2. Medición de ROS mitocondriales.....	87
12.2.1. Medición por espectrofluorimetría.....	87
12.2.2. Medición por citometría de flujo	88
13. MEDICIÓN DE APOPTOSIS	88
13.1. Citometría con Anexina V y 7-aminoactinomicin D (7-AAD)	88
13.2. Evaluación del potencial mitocondrial	89
13.3. Medición de la actividad de caspasas mediante ensayos fluorimétricos	90
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
RESULTADOS	92
I. RESULTADOS PREVIOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR	93
II. RESULTADOS DE ESTA TESIS	94
1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR TPA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Y EL ARNm DE GPRC5A	94

2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE <i>GPRC5A</i> POR TPA.	99
2.1. Efecto de la inhibición de PKC, Ca ²⁺ , PKA y MEK1 / 2 sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA.	100
2.2. Efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA.	103
2.3. Efecto de la inhibición de AKT, p38 e IKK1/2 sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA.....	104
2.4. Efecto de IL-1β, ion Cl ⁻ y la inhibición de SGK1 sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA.	108
3. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE ROS POR TPA	111
3.1 Efecto del TPA en la producción de ROS celular	112
3.2. Efecto del TPA en la producción de ROS mitocondrial	113
4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE <i>GPRC5A</i> POR ROS	114
5. SILENCIAMIENTO GÉNICO DE <i>GPRC5A</i> POR LA TÉCNICA CRISPR/Cas9	116
5.1. Validación del silenciamiento del ARNm de <i>GPRC5A</i>	117
5.2. Silenciamiento de la expresión proteica de <i>GPRC5A</i>	119
6. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LOS NIVELES DE ROS INDUCIDOS POR TPA	122
6.1. Medición de los niveles de ROS celular en células T84/pARNg3.....	122
6.2. Medición de los niveles de ROS mitocondriales en células T84/pARNg3 ..	124
7. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LA APOPTOSIS CELULAR	126
7.1. Evaluación de la apoptosis con anexina V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD)	126
7.2. Medición del potencial de membrana mitocondrial	129
7.3. Medición de la actividad caspasa 3, 8 y 9 mediante ensayos fluorimétricos	131
8. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LOS NIVELES DE IL-1β	133
DISCUSIÓN	136
1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA Y ARNm DE <i>GPRC5A</i> POR TPA ..	137
2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE <i>GPRC5A</i> POR TPA	139
2.1. Efecto de la inhibición de PKC, Ca ²⁺ , MEK1 / 2 y PKA sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA	139

2.2. Efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA	142
2.3. Efecto de la inhibición de AKT, p38 e IKK2 sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA.....	143
2.4. Efecto de IL-1 β , ion Cl ⁻ y la inhibición de SGK1 sobre la expresión de <i>GPRC5A</i> inducida por TPA	144
3. MODULACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR TPA	147
4. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE <i>GPRC5A</i> POR ROS	148
5. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LOS NIVELES DE ROS INDUCIDOS POR TPA	149
5.1. Medición de los niveles de ROS celular en células T84/pARNg3.....	149
5.2. Medición de los niveles de ROS mitocondriales en células T84/pARNg3 ..	150
6. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LA APOPTOSIS CELULAR	152
7. ROL DE <i>GPRC5A</i> EN LOS NIVELES DE IL-1β	154
CONCLUSIONES	157
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
ANEXOS	191
Abreviaturas	192
Autorizaciones	194

RESUMEN

Los receptores acoplados a proteínas G (“G protein-coupled receptors”, GPCRs), son proteínas integrales de membrana en la superficie celular y pertenecen a una de las superfamilias más grandes y diversas de receptores. Más del 30 % de las drogas farmacéuticas disponibles comercialmente ejercen su efecto por medio de esta clase de receptores. *GPRC5A*, también conocido como proteína 3 inducible por ácido retinoico (*RAI3*) o gen 1 inducible por ácido retinoico (*RAIG1*), fue clonado por primera vez en nuestro laboratorio con el nombre de gen 1 inducible por éster de forbol (“phorbol ester induced gene 1” o *PEG-1*), ya que fue encontrado por ser un gen inducible por 12 - O - tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA/PMA). Comúnmente, TPA es empleado como agente promotor de tumores, aunque también se ha observado una disminución en la capacidad proliferativa en células de linfoma tratadas con TPA. La desregulación de *GPRC5A*, ha sido relacionada con el desarrollo de distintos tipos de cáncer en humanos y con su capacidad supresora de tumores, dependiendo del tejido. En este trabajo, se demostró que la inducción de *GPRC5A* por TPA, en células T84 de cáncer de colon, es regulada positivamente por las vías de señalización PKC/Ca²⁺, PKA, MEK y SGK1; mientras que es regulada negativamente por JNK. Las vías de señalización AKT, p38, NF-κB, IL-1β, Cl⁻ y las ROS no se encuentran involucradas en su regulación por TPA. Por otro lado, TPA produjo un aumento en la producción de ROS celular y mitocondrial, efecto que fue reducido en células silenciadas en la expresión de *GPRC5A* mediante transfección con el plásmido CRISPR/Cas9 para este gen (T84/pARNg3); esto sugiere que la señalización de *GPRC5A* reduce la producción de ROS mediada por TPA→PKC. Además, se observó que TPA redujo la apoptosis celular, mientras que las células T84/pARNg3 tratadas con TPA la aumentaron. La apoptosis fue mediada por caspasa 3, pero no por caspasa 8 y 9. Los resultados sugieren que *GPRC5A* participa en la regulación de la apoptosis mediada por caspasa en células T84 de cáncer de colon.

Palabras clave: *GPRC5A*; cáncer; 12 -o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA); especies reactivas de oxígeno (ROS); apoptosis.

INTRODUCCIÓN

En el año 2017, el Instituto Nacional del Cáncer (INC, Argentina) reveló que el cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país, sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares. Sólo en 2017, se produjeron 62.618 defunciones por tumores malignos, siendo la primera causa el cáncer de pulmón (15,1 %), seguido por el cáncer de colon (12 %).

El receptor GPRC5A ha surgido como un tema de investigación interesante en los últimos años, debido a que su desregulación ha sido asociada con el desarrollo de distintos tipos de cáncer en humanos y, por el contrario, por tener un rol supresor de tumores. Este rol ambiguo de GPRC5A es dependiente del tejido donde se desarrolle el cáncer y su mecanismo es desconocido.

1. RECEPTORES GPCRs

1.1. Estructura y Función

Los receptores acoplados a proteínas G (G-protein-coupled receptors, GPCRs) son proteínas transmembrana que modulan la fisiología celular y tisular, un efecto que es ejercido mediante la señalización a través de proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) y/o la proteína β -arrestina [15-18]. Debido que algunos GPCRs pueden usar otras proteínas, además de las proteínas G, como transductores de señalización, algunos autores utilizan nombres alternativos para esta super familia de receptores. A estos receptores también se les suele llamar receptores transmembrana de 7 dominios (“7-transmembrane receptors”), receptores de tipo serpiente (“serpentine-like receptors”) o receptores heptahelicoidales (“heptahelical receptors”) [17].

Los GPCRs son la familia más grande de receptores de señalización en eucariotas. Actualmente, se conocen 827 receptores acoplados a proteínas G en humanos, de los cuales 406 son no olfativos [2].

A través de diversos mecanismos de señalización, los GPCRs regulan una amplia gama de procesos biológicos, incluidos el desarrollo y la remodelación ósea [19, 20], la visión [21], el sabor [22], el olfato [23], la señalización de neurotransmisores [24], la inflamación y la respuesta inmune [25], la regulación del sistema nervioso autónomo [26], el mantenimiento de la homeostasis celular [27] y el crecimiento tumoral y la metástasis [28].

La super familia de GPCRs comprende receptores para una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y neuromoduladores con importantes funciones fisiológicas. Los ligandos de estos receptores pueden ser endógenos, como por ejemplo, aminas, péptidos, aminoácidos, glucoproteínas, prostanoïdes, fosfolípidos, ácidos grasos, nucleótidos, nucleósidos, ión Ca^{2+} ; como también ligandos exógenos, como odorantes, sabor amargo y dulce, feromonas y fotones de luz. Se ha estimado que el 80 % de las hormonas conocidas y neurotransmisores activan los mecanismos de transducción de señales celulares mediante la activación de los GPCRs [29], estimándose que estos receptores representan entre un 30-45 % de los blancos de las drogas actuales [30, 31]. La disfunción de esta clase de receptores es causante de numerosas enfermedades humanas, por lo que varios GPCRs son utilizados como blancos de drogas farmacéuticas [32].

Los estudios bioquímicos, biofísicos e inmunológicos han logrado determinar una estructura consenso de los miembros de la familia de GPCRs. Estos receptores poseen un dominio N-terminal extracelular, un dominio C-terminal citoplasmático y una porción transmembrana con siete dominios helicoidales conectados por bucles intra y extra citoplasmáticos (“loops”), razón por la cual se los suele denominar “serpentina” (Figura 1) [33].

Las estructuras más variables en la familia de GPCRs son el dominio carboxilo terminal (C-terminal), el bucle intracelular entre los dominios transmembrana (TM) TM5 y TM6, y el dominio amino terminal (N-terminal). La mayor diversidad se observa en el dominio N-terminal, donde esta secuencia es relativamente corta (10–50 aminoácidos) para los receptores de monoaminas y péptidos, y mucho más grande (350 – 600 aminoácidos) para los receptores de las hormonas glicoproteicas y los receptores de la familia de los glutamatos. Los dominios N-terminales más grandes se observan en los receptores de la familia de adhesión.

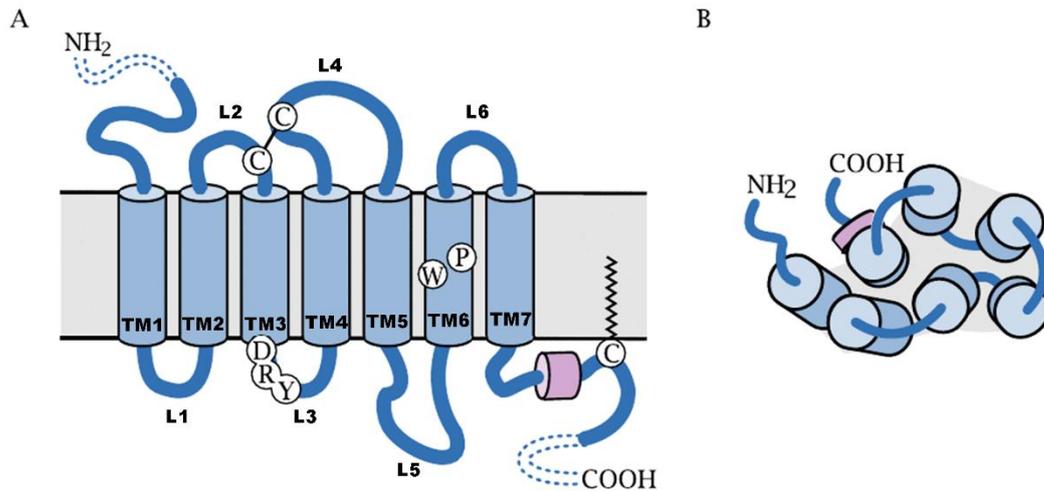


Figura 1: Estructura de los GPCRs. A: Diagrama de las siete hélices transmembrana (TM1, TM2, etc), el dominio N-terminal del lado externo de la membrana y el dominio C-terminal localizado dentro de la célula y los diferentes loop (L1, L2, etc). El diagrama también indica la localización de los residuos de aminoácidos que están conservados a lo largo de la familia de los GPCRs y que juegan un rol en la activación del receptor. **B:** Vista del receptor desde el lado extracelular. Imagen tomada de <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/GPCRs.html>.

1.2. Mecanismos de señalización

Las proteínas G, acoplándose a los receptores GPCR, transducen las señales de sus ligandos y regulan así la actividad de enzimas y canales que alteran los niveles celulares de segundos mensajeros y, a su vez, las actividades funcionales de las células a través de vías que incluyen proteínas quinasas, actividad de canales iónicos, proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular, y cambios en la expresión génica. Las proteínas G son heterotriméricas y se componen de tres subunidades, α , β y γ . Estas proteínas pueden encontrarse en dos conformaciones espaciales diferentes: una forma inactivada, cuando la subunidad α de la proteína G ($G\alpha$) se une al nucleótido difosfato de guanósina (GDP), el cual está preparado para la interacción con un receptor activado, y otra forma activada capaz de unirse con otras proteínas celulares denominadas efectoras, cuando se une a trifosfato de guanósina (GTP) (Figura 2). Las subunidades β y γ están estrechamente asociadas y pueden considerarse como una unidad funcional. Pero esta activación es transitoria ya que la subunidad α tiene un dominio GTPasa, es decir, hidroliza al cabo de un breve tiempo el GTP

transformándolo de nuevo en GDP, volviendo así a su estado basal [17, 34, 35]. Las proteínas RGS (“regulators of G protein signaling” o proteínas reguladoras de la señalización por la proteína G) actúan como proteínas activadoras de GTPasa para controlar negativamente la señalización de la proteína $G\alpha$. Las proteínas RGS aceleran la actividad de GTPasa de las proteínas $G\alpha$ al unirse al estado de transición durante la hidrólisis de GTP [36].

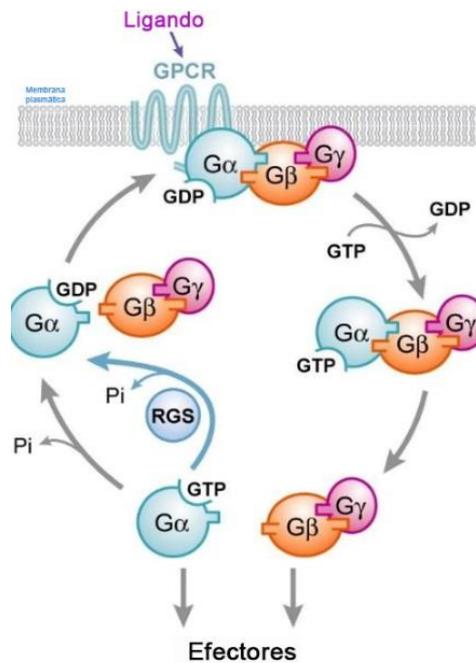


Figura 2: El ciclo de la proteína G. La unión del ligando al receptor acoplado a la proteína G (GPCR) conduce al intercambio de GDP-GTP en la proteína $G\alpha$ y a la disociación del dímero $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Tanto $G\alpha$ -GTP como $G\beta\gamma$ pueden regular a los efectores río abajo. La hidrólisis de GTP por la subunidad $G\alpha$ da como resultado la reasociación de $G\alpha$ unido a GDP con el dímero $G\beta\gamma$ y el GPCR, completando así el ciclo. Las proteínas RGS (regulador de la señalización de la proteína G) aceleran la tasa de hidrólisis de GTP por las proteínas $G\alpha$ (flecha azul). Imagen modificada de [13].

La subunidad $G\alpha$ se divide en cuatro familias según la similitud de las subunidades α : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$. Las familias $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$ activan o inhiben respectivamente la actividad de la adenilato ciclasa, dando como resultado un aumento o disminución de la producción de AMP cíclico (AMPC) (Figura 3) [37]. La familia $G\alpha_{q/11}$ estimula la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza los fosfatos de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), generando los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trisfosfato (PIP₃) y diacilglicerol (DAG) [38], que

conducen a la movilización intracelular de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE) y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Figura 3). Finalmente, la familia $\text{G}\alpha_{12/13}$ activa pequeñas GTPasas, incluida la familia Rho (por ejemplo, RhoA). Estos segundos mensajeros activan varias vías intracelulares para modular la función celular [39, 40]. Además de las proteínas $\text{G}\alpha$, $\text{G}\beta\gamma$ también puede enviar señales a los efectores corriente abajo. $\text{G}\beta\gamma$ puede regular algunas isoformas de las adenilil ciclasas y de las fosfoinositol 3-quinisas (PI3K), la fosfolipasa C β y canales iónicos como canales de K^+ y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje [41]. Recientemente se han identificado nuevas proteínas que interactúan con $\text{G}\beta\gamma$ en otros compartimentos subcelulares como endosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico (receptores IP3), aparato de Golgi (quinasa Raf, PKD), citosol (HDAC5, “histone deacetylase 5”), núcleo (AP-1, “activating protein-1”) y citoesqueleto (tubulina). Queda por determinar si todas estas interacciones intracelulares requieren GPCRs o subunidades $\text{G}\alpha$ [41].

Por otra parte, la activación de los GPCRs desencadena no solo la activación de proteínas G, sino también otros eventos celulares que conducen a una atenuación rápida de la capacidad de respuesta del receptor, un proceso llamado desensibilización, para evitar la señalización descontrolada. El primer paso en la desensibilización es la fosforilación del receptor [42, 43], principalmente por una familia de quinisas llamada GPCR quinisas (GRK) [44, 45]. Las GRK desempeñan un papel central en la desensibilización de muchos GPCRs [46]. Otros estudios identificaron otra familia de proteínas que solo es capaz de unirse a GPCRs fosforilados, llamadas arrestinas, las cuales juegan un papel clave en la desensibilización de muchos GPCRs. Dichas arrestinas inducen el desacoplamiento del GPCR de las proteínas G, lo que produce el final de la señalización dependiente de proteínas G iniciada en la superficie celular [47]. Además de la terminación de la señalización, las β -arrestinas también facilitan la internalización de los GPCRs, reclutando proteínas de señalización para GPCRs que fueron internalizados en los endosomas para activar las cascadas de señalización independientes de la proteína G [48-51]. Después de la internalización, el destino de los GPCRs depende tanto del tipo de célula como del tipo de receptor. Típicamente, después de la internalización inducida por el agonista, los GPCRs se reciclan eficientemente de regreso a la superficie celular.

Sin embargo, muchos GPCRs son dirigidos a una ruta degradativa y destruidos proteolíticamente en el lisosoma [50, 51].

Si bien la señalización de los GPCRs generalmente está regulada por la desensibilización y la endocitosis mediada por la fosforilación y las β -arrestinas, también se puede modular por ubiquitinación. Actualmente, la ubiquitinación se considera un proceso regulatorio importante que puede tener roles únicos en el tráfico y señalización de los GPCRs. Recientemente, han sugerido un vínculo entre la fosforilación de los GPCRs, las β -arrestinas y la ubiquitinación que puede ser aplicable a algunos GPCRs pero no a otros. Si bien se cree que la ubiquitinación promueve la endocitosis del receptor y la clasificación endosómica, estudios recientes han revelado que la ubiquitinación también juega un papel importante en la regulación positiva de la señalización de los GPCRs [52].

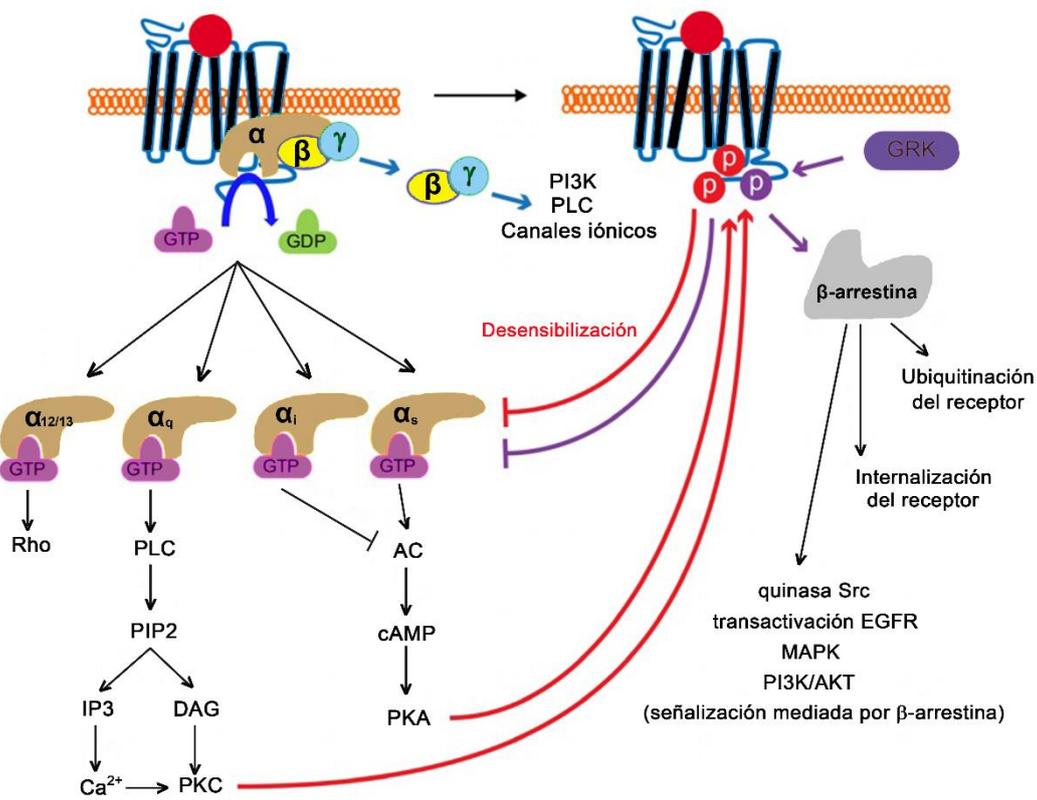


Figura 3: Esquema de señalización de GPCRs. Cuando el ligando se une a un GPCR, éste interactúa, en la mayoría de los casos, con proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G experimentan un intercambio de GDP-GTP en la subunidad α , lo que conduce a la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$ y la posterior activación de los efectores de señalización río abajo. La PKC (proteína quinasa C) y la PKA (proteína quinasa A) activadas por la proteína G a su vez fosforilan el receptor y desactivan la señalización de la proteína G (desensibilización heteróloga, línea roja). La fosforilación de GPCR mediada por GRK (GPCR quinasa) conduce al reclutamiento de β -arrestinas, lo que da como resultado la desensibilización mediante interacción con la proteína G (desensibilización homóloga, línea púrpura) y posterior internalización y ubiquitinación del receptor. La activación de β -arrestina por el receptor también inicia la activación de la señalización mediada por β -arrestina. AC indica adenilato ciclasa; AKT, serina / treonina quinasa también conocida como proteína quinasa B; DAG, diacilglicerol; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; IP3, inositol-1,4,5-trisfosfato; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; PI3K, fosfoinositida 3-quinasa; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; y PLC, fosfolipasa C.

En resumen, la activación de los GPCRs no sólo depende de un ligando que interactúa con el receptor para acoplar a una proteína G y así iniciar la señalización. Ahora se sabe que diferentes ligandos pueden interactuar con el mismo GPCR para estabilizar diferentes conformaciones del receptor [53, 54], lo que permite la posibilidad de seleccionar o diseñar nuevos ligandos que activan determinadas funciones de un solo receptor, optimizando así la acción terapéutica. Los GPCRs interactúan con muchas proteínas y estas interacciones son importantes para regular los GPCRs y mantener el equilibrio correcto entre señalización y desensibilización [55].

Finalmente, es importante tener en cuenta que no todos los receptores que activan la proteína G son miembros de la superfamilia de los GPCRs. La activación de proteínas G también se encuentra implicada en la transducción de señales mediada por varios receptores de tirosina quinasa, como por ejemplo el receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (“insulin-like growth factor-1”) [56].

1.3. Clasificación

La homología de secuencia entre todos los GPCRs es relativamente baja [57, 58], pero todos cuentan con siete dominios transmembrana helicoidales, con un

dominio extracelular N-terminal y un dominio intracelular C-terminal [15]. Los GPCRs han sido divididos según dos sistemas de clasificación, uno según su secuencia homóloga, dividido en seis clases de la A hasta la F [57, 59] y el otro, según análisis filogenético con los siguientes miembros prototípicos: glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled y secretina (GRAFS) (Tabla 1) [60]. La familia rodopsina (A), secretina (B), glutamato (C) y frizzled (F) se corresponde con el sistema de clasificación A-F, mientras que los miembros de la familia de adhesión no están incluidos en esta clasificación. Los receptores “Taste”, se colocaron recientemente como una sexta clase que ha surgido de la clase A [61].

Clase	Familia GRAFS
A	Rodopsina
B	Secretina Adhesión
C	Glutamato
D	...
E	...
F	Frizzled
T	Taste
O	Otros

Tabla 1: Sistemas de clasificación de los GPCRs. Los GPCRs han sido divididos según dos sistemas de clasificación, uno según su secuencia homóloga, el cual se divide en seis clases de la A a la F y el otro, según análisis filogenético con los siguientes miembros prototípicos: glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled y secretina (GRAFS).

En la Figura 4, se muestran los motivos estructurales comunes de las clases A, B y C.

La *clase A*, también llamados “receptores tipo rodopsina” es el grupo más abundante, cerca del 80 % de los GPCRs, que incluyen receptores de hormonas (receptores adrenérgicos), neurotransmisores (receptores muscarínicos, de dopamina, histamina y serotonina) y receptores de la luz (rodopsina). Los GPCRs de clase A muestran una diversidad considerable en el tamaño y la arquitectura de sus dominios extracelulares N-terminales. Estructuralmente

poseen una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal [62]. Este tipo de receptores, comparten además que la cara extracelular del receptor sufre una contracción al unirse al agonista, y esta contracción está ligada alostéricamente a la apertura del sitio de unión al transductor. Este mecanismo alostérico es recíproco y también funciona en la dirección opuesta, lo que permite la interacción con subdominios de la subunidad $G\alpha$ y favorece el cierre del sitio de unión al ligando [63, 64].

La *clase B* está integrada por dos subfamilias, clase B1 llamada familia de receptores similares a secretina y B2 llamada receptores de adhesión. La clase B está compuesta por cerca de 70 receptores para varias hormonas (receptor de secretina, glucagón, calcitonina, hormona paratiroidea) [60, 65, 66], y se caracterizan por tener un dominio N-terminal extenso de alrededor de 120 residuos estabilizados por enlaces disulfuro. La unión del ligando involucra tanto el dominio N-terminal como los bucles extracelulares del receptor. El modelo general actual para la activación de los GPCRs de clase B se puede resumir de la siguiente manera: después de la unión inicial de los agonistas peptídicos, hay una reorganización de los bucles extracelulares del receptor que acomoda la unión del péptido al núcleo del receptor y contribuye a la propagación del cambio conformacional [67]. Hay pruebas de que los GPCRs de clase B1 sufren homodimerización y heterodimerización [68]. Los datos sugieren que los receptores son diméricos tras la interacción inicial con el ligando, lo que contribuye a la unión de alta afinidad, pero que estos dímeros se desestabilizan tras la activación y la interacción con la proteína G, lo que puede favorecer el aislamiento del complejo monomérico receptor-proteína G en estudios estructurales [68].

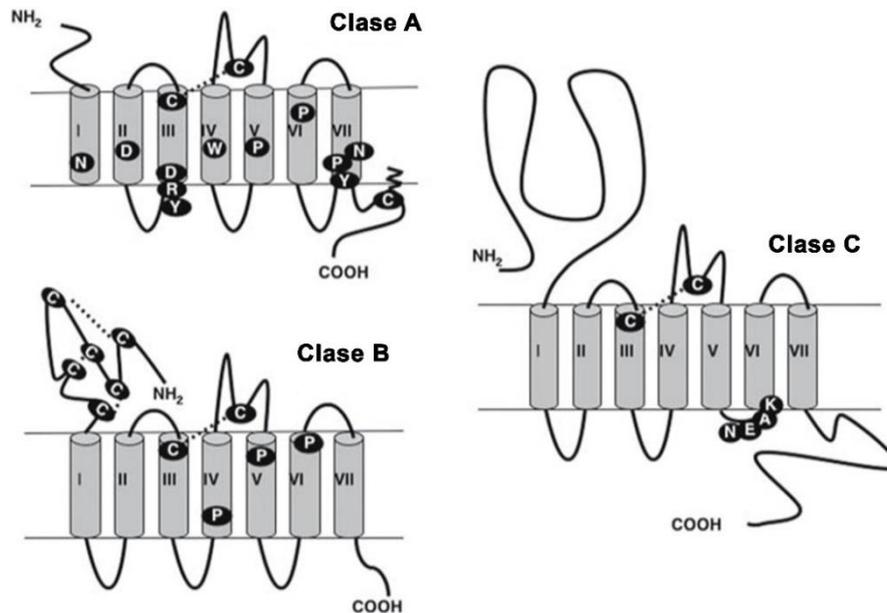


Figura 4: Representación esquemática de las clases A, B y C de receptores GPCRs. Se muestran los motivos estructurales comunes a cada familia. El único motivo común para los GPCRs de clase A, B o C es un residuo de cisteína conservado en la hélice III y otro en el segundo bucle extracelular. Se cree que estas cisteínas están conectadas a través de un puente disulfuro. Para los receptores de clase A (familia similar a la rodopsina), se indica el aminoácido más conservado de cada hélice. Un sitio de palmitoilación está representado en la parte proximal del C-terminal. El motivo DRY en la hélice III y el motivo NPXXY (siendo X cualquier aminoácido) en la hélice VII se conservan entre los GPCRs de clase A. Los GPCRs de clase B (familia similar a la secretina) comparten un gran N-terminal con residuos de cisteína conservados y puentes disulfuro. Algunos residuos de prolina también se conservan dentro del haz helicoidal, pero esos residuos son diferentes a las prolinas conservadas de clase A. Los receptores de clase C (familia de glutamato metabotrópico) se caracterizan por un dominio extracelular muy grande que se une a los ligandos. Se indica el motivo NEAK altamente conservado. Imagen modificada de [9].

En receptores de *clase C*, también conocidos como receptores metabotrópicos de glutamato, el reconocimiento del ligando se logra a través de su gran dominio extracelular (300-600 residuos) [69]. A diferencia de muchas otras familias de GPCRs, los de esta clase son dímeros y esto está críticamente relacionado con su activación [70, 71]. La unión del agonista al dominio de unión al ligando genera un cambio conformacional de un estado abierto a cerrado, lo que a su vez proporciona una alteración en la posición y orientación de los dominios transmembrana dentro del dímero receptor que desencadena en la unión del transductor [72]. Algunos receptores que integran esta clase son,

receptores GABA (“gamma-aminobutyric acid”) [73], receptores sensibles al calcio y receptores gustativos.

La *clase D* incluye receptores presentes en hongos, la *clase E* incluye receptores de AMPc y la *clase F* incluye receptores “frizzled” [74]. Las secuencias de aminoácidos de los GPCRs en las clases D-F también contienen siete dominios hidrofóbicos que se consideran hélices transmembrana.

1.4. Implicancia de los GPCRs en enfermedades y su importancia como blancos terapéuticos

Los GPCRs, como otras proteínas de membrana, pasan por un estricto mecanismo de control de calidad en el retículo endoplásmico (RE), que garantiza que sólo las proteínas plegadas correctamente entren en la vía secretora. Debido a este sistema de control de calidad, las mutaciones puntuales que resultan en variaciones de la secuencia proteica pueden dar lugar a la producción de proteínas mal plegadas. Estas alteraciones pueden ser causantes de enfermedades debido a que los receptores no pueden alcanzar sus destinos funcionales en la célula.

El número promedio de enfermedades asociadas con GPCRs es de 198 y 413 para ligandos endógenos que tienen como blanco a estos receptores, mientras que el número promedio de enfermedades asociadas para todos los demás genes es 119, un número significativamente menor [2]. Por ejemplo, hay evidencias que sugieren que la galanina, un ligando endógeno para el receptor GPCR de galanina tipo 2 (GALR2), juega un papel importante en la epilepsia, uno de los trastornos neurológicos más comunes. De hecho, la galanina ha surgido como un blanco potencial para tratar la epilepsia [75]. Por otro lado, la familia de receptores de glutamato se expresan predominantemente en células neuronales y gliales [76] y transmiten la excitación postsináptica mediada por glutamato en las células neurales, regulando así la comunicación neuronal, la formación de la memoria y el aprendizaje. Varias enfermedades en humanos se asocian con mutaciones en los genes de esta familia de receptores, incluida la enfermedad de Parkinson [77], la enfermedad de Huntington [78], trastorno por déficit de atención con hiperactividad [79], la adicción [80] y el autismo [81].

En cáncer, esta clase de receptores participan del crecimiento y desarrollo del tumor mediante la regulación de la proliferación celular, invasión, migración, angiogénesis y supervivencia en sitios metastásicos [82-84]. Además, se sabe que los GPCRs funcionan en la metástasis [83, 84], habiendo limitados tratamientos contra el cáncer metastásico. La actividad de los GPCRs puede encontrarse alterada en cáncer por una sobreexpresión aberrante, mutaciones en los efectores de señalización de la proteína G corriente abajo y una mayor producción y secreción de ligandos activadores de GPCRs, tanto por las células tumorales como por las células del estroma circundante [85, 86]. Por ejemplo, el ácido lisofosfatídico (LPA) tiene no menos de seis receptores (LPA1-LPA6) pertenecientes a la familia GPCR. Inducir LPA y/o una expresión aberrante de sus receptores puede inducir el inicio y progresión del cáncer [87, 88]. Esto se ha demostrado en el cáncer de mama [89] y en cáncer de ovario [90], donde LPA actúa mediante la activación de la vía de transducción dependiente de Rho para provocar la migración y la formación de tumores.

A los GPCRs también se los relaciona con osteopatologías, ya que la mayoría de las familias de GPCRs tienen roles críticos en el desarrollo y remodelación ósea (reabsorción de tejido óseo maduro) [91]. Múltiples mutaciones humanas de GPCRs afectan el desarrollo óseo o el metabolismo de los huesos. Hasta la fecha, 92 receptores se han asociado con enfermedades óseas y disfunciones [92].

En enfermedades del corazón los GPCRs también tienen un rol importante. En la década de 1930, el laboratorio de fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, dirigido por B. Houssay, llevó a cabo estudios sobre la hipertensión [93, 94], lo que condujo al descubrimiento del factor renal involucrado en la hipertensión, llamado "hipertensina" [93, 95, 96]. Paralelamente en EE.UU se descubrió el mismo factor hipertenso en el Laboratorio Lilly de Investigación Clínica, allí llamado "angiotonina" [97]. Finalmente, ambos laboratorios acordaron nombrar al factor como "angiotensina" [98, 99]. Tiempo después la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se caracterizó y se encontró que es activada por Cl^- [100, 101], aunque los sitios de acción del Cl^- en ECA aún son tema de debate [102, 103]. Hoy en día se cree que el Cl^- , y no solo Na^+ , puede tener un rol importante en la hipertensión [104]. La activación crónica de receptores β -adrenérgicos y

receptores de angiotensina II mediante sus ligandos endógenos (noradrenalina y angiotensina II (Ang II) respectivamente), aumentan el trabajo del corazón, y producen efectos perjudiciales como la muerte de los miocitos [105]. Por esta razón, los medicamentos que bloquean la activación de dichos receptores, como los bloqueadores β , los bloqueadores de los receptores de Ang II y los inhibidores de la ECA, se usan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca [6].

En la Tabla 2, se muestran más ejemplos de receptores GPCRs y ligandos endógenos relacionados con patologías en humanos.

Enfermedad	Nombre del receptor GPCR	Nombre del ligando endógeno
Epilepsia	GALR2	galanina (GAL)
Obesidad	MC1R	proopiomelanocortina (POMC)
Alzheimer	FPR2	proteína precursora amiloidea (APP)
Enfermedad inflamatoria intestinal	CCR3	quimiocina (CCL7)
Hipertensión	AGTR2	angiotensina II (AGT)
Artritis reumatoide	CCR6	quimiocina (CCL20)
Degeneración macular	CX3CR1	quimiocina (CX3CL1)
Osteoporosis	CALCR	adrenomedulina (ADM)
Enfermedad vascular	EDNRA	endotelina-2 (EDN2)

Tabla 2: Ejemplos de ligandos endógenos de GPCR y receptores relacionados con diversas enfermedades. Tabla modificada de [2].

De este modo, resulta evidente que los GPCRs representen un importante foco de investigación debido a su papel central en áreas históricamente populares como hipertensión, alergia, analgesia, esquizofrenia y depresión; y en áreas novedosas como la enfermedad de alzheimer y obesidad. En los últimos 5 años, los estudios sobre los GPCRs se han enfocado en nuevas enfermedades, como esclerosis múltiple (EM), cesación tabáquica, síndrome del intestino corto e hipocalcemia [3]. Las principales tendencias de las áreas dirigidas a GPCRs se muestran la Figura 5.

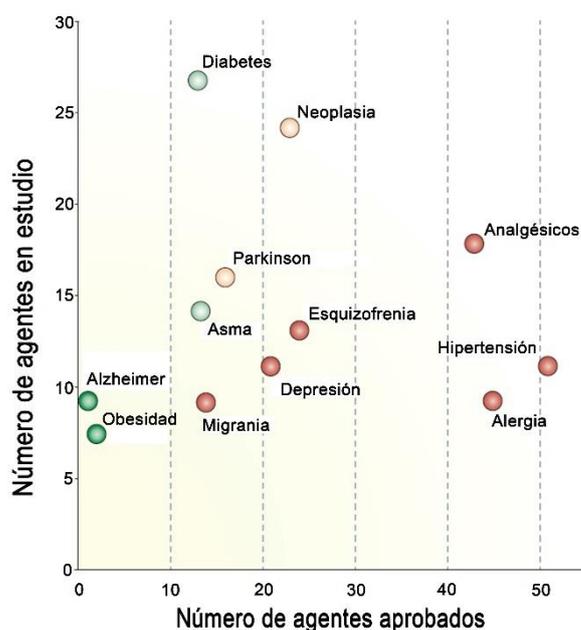


Figura 5: Tendencias de drogas aprobadas vs agentes en prueba, dirigidos a GPCRs.

Los números más grandes (> 40) de agentes aprobados (Eje x) se observan para analgésicos, alergias e hipertensión, mientras que entre los agentes en ensayos clínicos (Eje y) los números más altos (> 20) son para agentes para diabetes y neoplasias. Imagen modificada de [3].

El 34 % de los medicamentos aprobados por la FDA (“Food and Drug Administration”) son dirigidos hacia estos receptores, equivalente en el año 2017 a 475 medicamentos que median sus efectos a través de 108 GPCRs. De estos receptores, el 27 % de los GPCRs humanos no olfativos, el 17 % de GPCRs actualmente en proceso de estudio y el 56 % son receptores huérfanos [3]. Dentro del 27 % de los GPCRs blancos de drogas ya aprobadas, la histamina (HRH1), la serotonina, la dopamina, los opioides y los receptores adrenérgicos, son los GPCRs dirigidos con mayor frecuencia, en términos de la cantidad de medicamentos disponibles. El gran número de antagonistas de HRH1 refleja su uso frecuente en el tratamiento de respuestas alérgicas [106]. Los receptores aminérgicos (receptores clase A), son el objetivo de 314 de los medicamentos aprobados. Esta clase de receptores son los mayormente estudiados estructuralmente [107] (Figura 6).

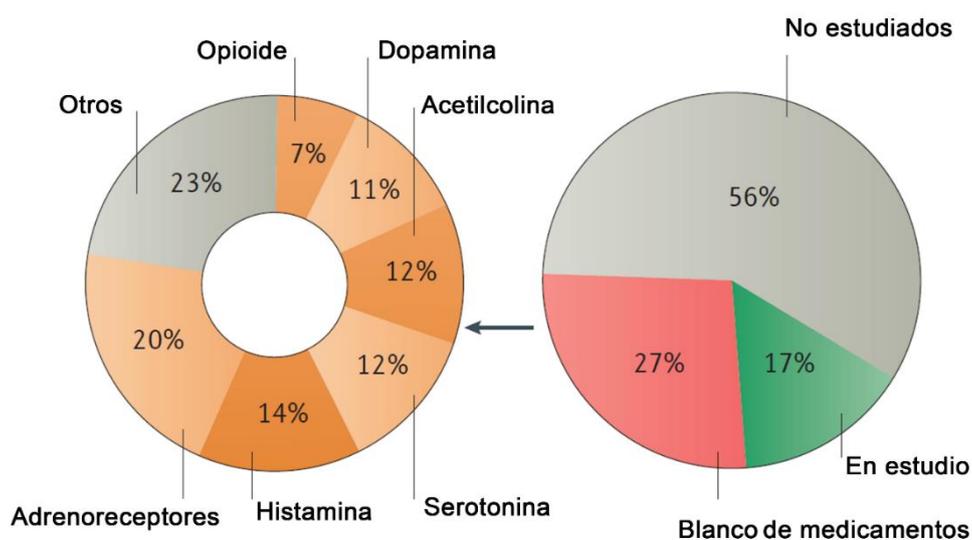


Figura 6: Principales familias GPCR que son objetivos farmacológicos aprobados y objetivos de agentes en ensayos clínicos. Hay 398 receptores GPCR no olfatorios, de los cuales 108 tienen medicamentos aprobados (rojo), 66 tienen agentes que han alcanzado ensayos clínicos pero que aún no han sido aprobados (verde) y 224 aún no se han dirigido por agentes en ensayos clínicos (gris). Los 108 objetivos farmacológicos GPCR establecidos (lado izquierdo) son principalmente receptores aminérgicos (receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos) y opioides. Imagen modificada de [3].

Sólo el 15 % de los 800 GPCRs conocidos en humanos son blancos de drogas [108], por lo tanto, es probable que existan nuevas oportunidades para que más GPCRs sean nuevos blancos farmacológicos [108, 109]. Los factores que contribuyen a esta limitación de los GPCRs en la industria farmacológica son los más de 100 GPCRs huérfanos (GPCRs) para los que se desconoce sus roles funcionales, sus mecanismos de señalización y el estado de su expresión en células sanas y enfermas. Con la excepción de los genes *SMO* ("Smoothened receptor", receptor de la clase frizzled, integrante de la vía de señalización de Hedgehog (Hh)) y *ADGRG3* (receptor de la clase adhesión, participante en el reordenamiento del citoesqueleto, la adhesión y migración celular [110]), los GPCRs huérfanos (sin agonistas fisiológicos conocidos) no son actualmente objetivos farmacológicos [108].

Ciertos GPCRs huérfanos tienen patrones de expresión o actividad altamente selectivos en tejidos normales y en tejidos enfermos. Los ejemplos incluyen a

GPRC5A en cáncer de colon [111], páncreas [112], pulmón [113], GPR22 en enfermedad cardíaca [114], SMO en varios tipos de cáncer [115], GPR3 en enfermedad de Alzheimer [116] y GPR119 en el tratamiento de la diabetes [117]. Estos GPCR huérfanos sirven como objetivos potencialmente novedosos para futuros tratamientos.

Aproximadamente dos tercios de los GPCRs que son actualmente blancos farmacológicos regulan el AMPc y numerosos blancos farmacológicos relacionados con los GPCRs influyen en la señalización del AMPc (Ej. fosfodiesterasas o proteínas asociadas con la síntesis o transporte de ligandos cuyos receptores regulan la síntesis del AMPc). Por lo tanto, la vía de AMPc es probablemente la vía de señalización elegida con más frecuencia por las terapias aprobadas actualmente [108]. La modulación de los GPCRs a través de sitios alostéricos, que son distintos de los sitios de unión para ligandos endógenos, puede alterar la estructura, la dinámica y la función del receptor para lograr una ventaja terapéutica potencial, como una mayor selectividad espacial y temporal [118]. Además, el conocimiento de la activación del receptor ha aumentado con el concepto de selectividad funcional [119], activando la vía de señalización intracelular deseada y minimizando los efectos secundarios no deseados debido a la activación de otras vías. Para utilizar la técnica quimioinformática en el diseño de fármacos GPCR, es esencial comprender la naturaleza de los ligandos, las complejidades estructurales del receptor, las interacciones ligando-receptor y la interacción de los receptores con las vías de señalización [120].

Las tasas de éxito de los agentes dirigidos a GPCRs en los últimos 5 años fueron 78 % (fase I), 39 % (fase II) y 29 % (fase III) [3]. Unos de los últimos fármacos dirigido a GPCR aprobados por la FDA fue Zilretta, un agonista del receptor de glucocorticoides que se usa para el tratamiento del dolor de la osteoartritis de rodilla (<https://www.drugs.com/history/zilretta.html>). También se encuentra aprobado el fármaco Abaloparatida, un agonista del receptor de la hormona paratiroidea (PTH1) que se usa para tratar a las mujeres posmenopáusicas con osteoporosis [121].

2. RECEPTOR GPRC5A

En nuestro laboratorio, mediante la técnica de “Differential Display” (DD) para estudiar expresión diferencial de genes, logramos visualizar varios genes que aumentaban su expresión en células de cáncer de colon T84 tratadas con el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Después del aislamiento y la clonación de uno de estos genes, se encontró que correspondía a un nuevo gen humano [122]. La secuencia de este fragmento de ADNc fue ingresada en Genbank como EST-TIG1 (TIG1 por sus siglas en inglés “TPA-induced gene 1”, GenBank: BE519991.1). TIG1 no debe confundirse con el “Acid Receptor Responder 1”, que también tenía el símbolo TIG1 (U27185), y ahora tiene el símbolo HUGO RARRES1 (NM_206963). Mediante Northern Blots (NB) se observaron dos bandas de distinto tamaño correspondientes al ARNm de este gen, 2,3 y 7 kbp, siendo el ARNm de 2,3 el más abundante [122, 123].

Dos años después de nuestros reportes iniciales [122, 124], mientras estábamos extendiendo su secuencia parcial de ADNc, Cheng & Lotan [125] encontraron el mismo producto génico, también mediante el uso de DD, pero en células UM-SCC-22B (línea celular de carcinoma escamoso de cabeza y cuello) tratadas con ácido all-trans-retinoico (ATRA) en lugar de TPA; al que llamaron *RAIG-1* (gen inducible por ácido retinoico 1) [125]. Como su secuencia primaria sugería que era un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), la Organización del Genoma Humano finalmente lo nombró GPRC5A, receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro A. GPRC y no GPCR ya que todavía es un receptor huérfano. Otros dos miembros de la familia, GPRC5B y GPRC5C, se caracterizaron más tarde por Robbins et al. [126] y un tercero, GPRC5D, por Brauner-Osborne et al. [127, 128]. Todos ellos son receptores huérfanos. GPRC5A, GPRC5B y GPRC5C pueden ser inducidos por el ácido retinoico (AR) de manera dependiente de la concentración y el tiempo, mientras que GPRC5D no [60]. La estructura proteica de los cuatro GPRC5 se muestra en la Figura 7, donde se detalla la longitud del dominio N-terminal, los siete dominios transmembrana (7TM) y el dominio C-terminal. Se puede observar una longitud similar de los 7 TM y una secuencia corta N-terminal de 20 a 53 aminoácidos [10].

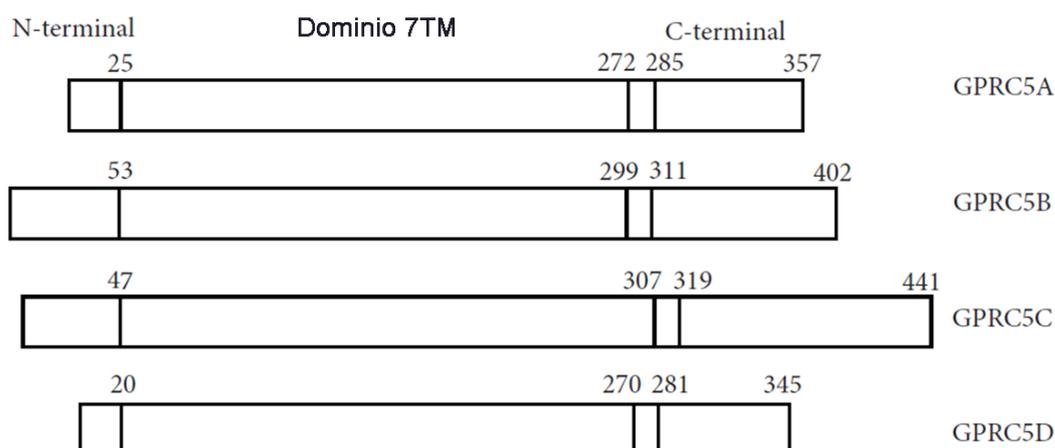


Figura 7: Estructura de la proteína de GPRC5A–D. Los aminoácidos de las cuatro proteínas están detalladamente numerados. Tienen una longitud similar de los siete dominios transmembrana (7TM) y tienen un N-terminal corto de 20-53 aminoácidos como se detalla en el texto. Imagen modificada de [10].

Curiosamente, GPRC5A–D se expresan de manera específica dependiendo del tejido, con GPRC5A expresándose preferentemente en tejidos pulmonares y gastrointestinales, GPRC5B en los tejidos del sistema nervioso central y GPRC5C y GPRC5D se observan en una variedad de tejidos (Figura 8) [126, 127, 129].

Más tarde, nuestro laboratorio completó la secuencia del ARNm de *GPRC5A* (depositada en GenBank como receptor PEIG-1 Homo sapiens huérfano acoplado a proteína G, base de datos de nucleótidos AF506289.1 y base de datos de proteínas AAM77594). *PEIG-1* significa “Phorbol Esther Induced Gene 1” y realizamos algunos estudios preliminares sobre su regulación [7]. En células derivadas de un paciente con fibrosis quística (células CFDE) se observó una disminución en la expresión del gen, y un aumento de su expresión, en la línea celular CFDE corregida (CFDE / 6RepCFTR). También se observó una disminución de su expresión en tejido pulmonar CF y en tejido de coloncarcinoma [123]. Esos resultados y algunos resultados descritos en esta Tesis han sido recientemente publicados [130].

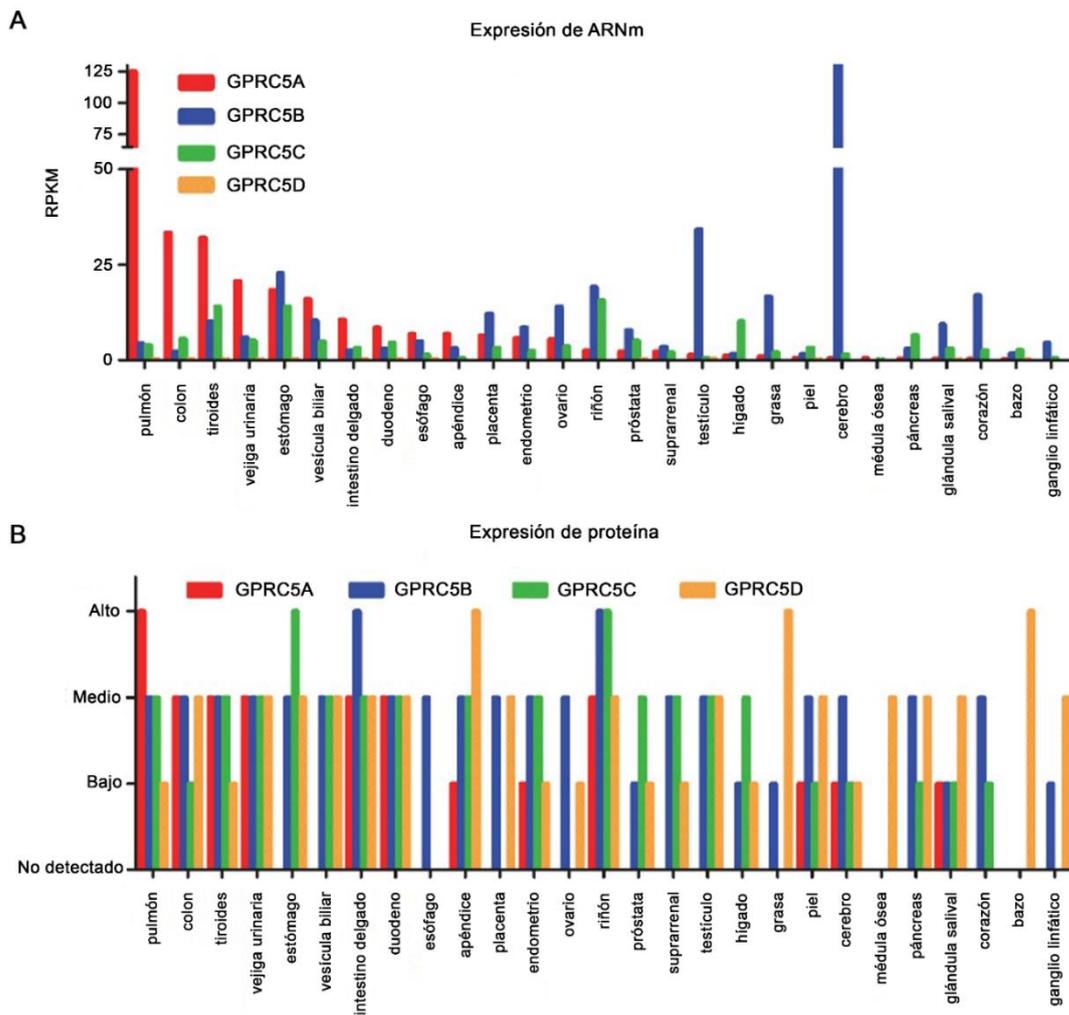


Figura 8: Perfil de expresión de GPRC5A-D. **A:** Perfil de expresión del ARNm de *GPRC5A* – D en diferentes órganos. **B:** Niveles de expresión de proteína *GPRC5A*–D en diferentes órganos. RPKM: “Reads Per Kilobase Million”. Imágenes modificadas de [10].

2.1. Regulación

A continuación se describen algunos aspectos relevantes de la regulación del gen *GPRC5A*. Un excelente review sobre el tema ha sido publicado por Jiang X. et al. [10].

2.1.1. Regulación transcripcional

El gen *GPRC5A* tiene diversos sitios de unión a factores de transcripción, entre estos, el factor de transcripción que responde a ácido retinoico (AR). El AR es un metabolito de la vitamina A1, que tiene efectos fisiológicos sobre el desarrollo embrionario, diferenciación epitelial, supresión de la carcinogénesis

[131-133] y acciones antivirales [134-136]. El AR se transporta al núcleo donde se une al receptor de ácido retinoico (RAR) que forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR). Tras la unión a AR, el heterodímero RAR-RXR actúa como factor de transcripción, a través de la unión del heterodímero a elementos de respuesta de AR específicos (RARE) ubicados en los promotores de genes diana, reclutando coactivadores y activando la transcripción de genes diana [137]. *GPRC5A* tiene un elemento de respuesta a AR (RARE) en su región 5' río arriba, que se une al heterodímero RAR/RXR. En presencia de AR, se activa el heterodímero RAR-RXR el cual activa la transcripción de *GPRC5A* [138, 139]. Los RAR también tienen efectos no genómicos y activan vías de señalización que regulan la transcripción de los genes objetivo del AR [140]. Se cree que la interrupción de las vías de señalización del AR genera patologías como leucemias, cáncer de piel, cáncer de cabeza / cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, glioblastoma y neuroblastoma. Cabe destacar que el AR y sus derivados (retinoides), se utilizan como agentes potencialmente quimioterapéuticos debido a sus efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antioxidantes [141, 142]. En humanos, los retinoides revierten las lesiones epiteliales premalignas, inducen la diferenciación de las células mieloides normales y leucémicas y previenen el cáncer de pulmón, hígado y mama. También se han visto efectos antivirales del AR, como por ejemplo, mejorar la respuesta inmune luego de la aplicación de vacunas nasales contra el virus de la influenza en modelos deficientes de vitamina A [136] y aumentar la producción de interferón- α (IFN- α), una de las citocinas antivirales más importantes, en células infectadas con enterovirus 71 (EV71). También ha tenido resultados positivos en el tratamiento contra la hepatitis C en pacientes [135].

El monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), un segundo mensajero, induce la expresión de *GPRC5A*. Cerca del sitio de inicio de la transcripción de *GPRC5A*, existen elementos de respuesta a AMPc (CRE); a través del aumento de los niveles de AMPc, inducidos por el compuesto forskolina, se indujo la transcripción de *GPRC5A* [143].

Se ha reportado que la proteína p53, supresora de tumores, en cáncer de mama inhibe la expresión de *GPRC5A* a través de la unión directa a su promotor [144]. Contrariamente, en modelos celulares de cáncer de pulmón ("Non-small-

cell lung carcinoma”, NSCLC), se vio que *GPRC5A* estaría implicado en el efecto antitumoral de p53 [145].

Además, la expresión de *GPRC5A* también está relacionada con el gen *BRCA1* (“breast cancer 1”), cuyas variaciones del gen provoca un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama y de ovario [146]. Los investigadores han identificado más de 600 mutaciones en el gen *BRCA1*, muchas de las cuales están asociadas con un mayor riesgo de cáncer. En los tumores de mama que expresan *BRCA1*, la expresión de *GPRC5A* es mayor que en los tumores *knock out (KO)* de *BRCA1* [147].

2.1.2. Regulación postranscripcional

Los microARN (miARN), son pequeñas moléculas de ARN monocatenarias no codificantes, de 21 a 23 nucleótidos, que regulan la expresión de genes diana a través de interacciones específicas de apareamiento de bases entre miARN y regiones del ARNm. Son importantes reguladores postranscripcionales [148, 149].

Un análisis computacional indicó que hay muchos ARN que tienen como gen diana a *GPRC5A*, específicamente 343 en la región 5' no traducida (UTR), 595 en la secuencia de codificación (CDS) y 1170 en el 3' UTR [150]. El miARN llamado miR-103a-3p, tiene dos sitios de unión en la región 5' UTR de *GPRC5A* y en estudios *in vitro*, en modelos celulares de cáncer pancreático y en células epiteliales normales, se ha observado que suprime la expresión del ARNm y de la proteína de *GPRC5A* [151]. Los niveles de expresión aumentaron al disminuir los niveles de miR-103a-3p [151]. Además, se ha identificado el miARN miR-204 que es capaz de inhibir la expresión de *GPRC5A* mediante la unión a su 3' UTR en cáncer gástrico [152].

Las proteínas de unión a ARN (RBP), también participan en la regulación postranscripcional de *GPRC5A*. HuR, una RBP, aumenta la expresión de *GPRC5A* a través de la estabilización del ARNm mediante la unión a su región 3' UTR [153, 154].

2.1.3. Modificaciones postraduccionales

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce la fosforilación de GPRC5A por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que interactúa y lo fosforila en el extremo C-terminal. GPRC5A es fosforilado en dos motivos conservados de doble tirosina (TYR), TYR-317 / TYR-320 y TYR347 / TYR-350, inactivando su función supresora de tumores en cáncer de pulmón. Estudios demostraron que GPRC5A no estaba fosforilada en el tejido pulmonar normal, mientras que estaba altamente fosforilado en tirosinas en tejidos de cáncer de pulmón [155].

Estudios recientes muestran que GPRC5A también podría ser ubiquitinado, pero se desconoce su función y los mecanismos [150]. La proteína GPRC5A también presenta diferentes grados de glicosilación posiblemente en el residuo 158 del péptido GPRC5A en un “loop” extracelular entre los dominios transmembrana IV y V [125].

En la Figura 9 se resume la regulación del gen *GPRC5A*.

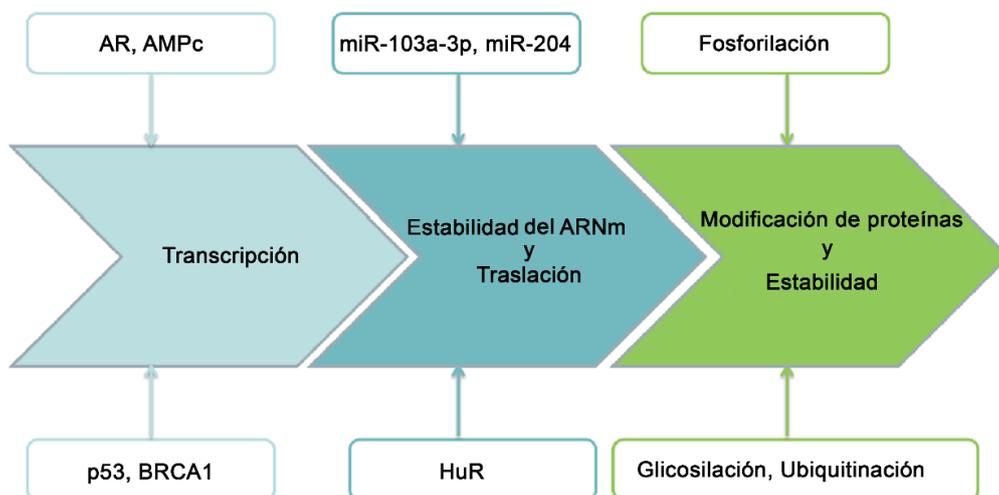


Figura 9: Resumen de la regulación de la expresión *GPRC5A* en cáncer. Imagen modificada de [10].

2.2. Vías de señalización reguladas por GPRC5A

Vía de señalización de AMPc. En la línea celular epitelial folicular tiroidea (Nhy), la sobreexpresión de GPRC5A disminuyó tanto la concentración de AMPc intracelular como la expresión del gen $G\alpha$ (subunidad de la proteína G). Por otro lado, un ARNi de GPRC5A aumentó los niveles de ARNm de $G\alpha$ y AMPc intracelular, redujo el número de células y la apoptosis inducida. Por el contrario, el número de células aumentó por la sobreexpresión de GPRC5A [143].

Vía de señalización del factor nuclear (NF- κ B). NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de genes involucrados en la inflamación, la respuesta inmune, el ciclo celular, la apoptosis y la angiogénesis en una variedad de células [156, 157]. La vía de señalización de NF- κ B es activada por LPS, que además estimula la secreción de TNF α en macrófagos [158]. Por lo tanto, la activación de NF- κ B se lo vincula a la inflamación y al cáncer.

Estudios *in vivo* han demostrado que en ratones *KO* de *GPRC5A* hay mayor activación de la vía de señalización de NF- κ B inducida por el tratamiento con LPS (lipopolisacárido bacteriano) y la citoquina inflamatoria TNF α comparado con ratones *wild type* de *GPRC5A*, donde además se observaron niveles más altos de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Estos factores aumentan la proliferación, supervivencia e inflamación de las células epiteliales [159]. Además, se encontró que la inhibición de NF- κ B, a través de la expresión de I κ B α en los ratones *KO* *GPRC5A*, disminuyó significativamente la respuesta a la inflamación y la lesión pulmonar en ratones, inducida por el tratamiento con LPS [160]. Por lo tanto, *GPRC5A* es crítico para la homeostasis pulmonar, y la deficiencia de *GPRC5A* confiere susceptibilidad a lesiones pulmonares, principalmente a través de la señalización por NF- κ B en el epitelio bronquioalveolar.

Vía de señalización del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). Los STAT son factores de transcripción que regulan el crecimiento celular, la diferenciación, la supervivencia y el desarrollo, a través de la regulación de genes diana [161]. La sobreexpresión de STAT3 se ha identificado en varios cánceres humanos y se relaciona con el desarrollo de cáncer gástrico, de mama y de pulmón [162-168].

Estudios contrapuestos indican que GPRC5A puede desempeñar un papel oncogénico activando la señalización STAT3, y otros que tiene un rol supresor de tumores a través de la inhibición de la fosforilación de STAT3. Se ha reportado que el silenciamiento de GPRC5A se relaciona con la activación de STAT3 en cánceres como el cáncer de pulmón [169] y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) [170], lo que indicaría que GPRC5A tiene un rol supresor de tumores. En comparación con las células *wild type*, las células *KO* de GPRC5A tienen niveles más altos de genes anti apoptóticos regulados por STAT3 y de STAT3 activado, independientemente de la presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo que resulta en un aumento de la progresión del tumor [169, 170]. Por el contrario, otro estudio indica que GPRC5A se correlaciona positivamente con STAT3, y que el silenciamiento de GPRC5A está asociado con la supresión de la fosforilación de STAT3 en TYR705 en líneas celulares pancreáticas humanas [112].

Vía de señalización de la quinasa de adhesión focal (FAK)/Src. La regulación de la adhesión célula-célula y matriz-célula juega un papel fundamental en la integridad y la homeostasis del tejido epitelial [171, 172] y la modificación de este proceso puede contribuir a la progresión del tumor. La función más importante de la vía de señalización FAK es la regulación de la adhesión celular [173-176].

El silenciamiento de GPRC5A disminuyó la expresión de la integrina $\beta 1$ (ITGB1), que provoca una disminución en la adhesión celular mediada por integrina, interfirió con la fosforilación de la vía de señalización FAK / Src, disminuyendo su activación y redujo la actividad de las pequeñas GTPasas RhoA y Rac1 [177], implicadas en la adhesión celular a la matriz extracelular [178, 179].

3. GPRC5A Y SU ROL EN EL CÁNCER HUMANO

3.1. El cáncer

El cáncer comprende seis características biológicas, llamadas sellos distintivos del cáncer o “Hallmarks” en inglés, que permiten que las células normales vayan evolucionando progresivamente a un estado neoplásico, adquiriendo una sucesión de nuevas capacidades durante el desarrollo del cáncer que consta de múltiples pasos en humanos. Estas etapas son las

siguientes: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis [8]. Sumado a esto, se encuentra la inestabilidad del genoma que agiliza su adquisición y la inflamación que induce múltiples funciones distintivas. En los últimos años se incorporaron dos características más, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune (Figura 10).



Figura 10: Sellos distintivos del cáncer. Imagen modificada de [8].

A continuación, se describirán brevemente cada uno de los sellos distintivos del cáncer:

Señales de proliferación sostenida. Uno de los rasgos más importantes de las células cancerosas es su capacidad para mantener la proliferación indefinida. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento. De este modo, regulan la entrada y la progresión del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando así una homeostasis del número celular y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura y función normal del tejido. Las células cancerosas tienen la característica de desregular estas señales, como por ejemplo, aumentar la

producción de factores de crecimiento [180] como también sus receptores [180] o bien estimular las vías de señalización corriente abajo de estos receptores [181].

Evasión de factores supresores de crecimiento. Las células cancerosas también deben superar programas celulares que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de las acciones de los genes supresores de tumores. Dos genes supresores tumorales *RB* y *PT53*, que codifican las proteínas Rb (asociadas al retinoblastoma) y p53 respectivamente, controlan la proliferación celular regulando el ciclo celular o, alternativamente, activan programas de senescencia y apoptosis, a partir de señales extracelulares e intracelulares [182, 183]. Los contactos que ocurren entre células al generarse densas poblaciones de células normales provocan una inhibición del crecimiento. La inhibición por contacto es un mecanismo que funciona in vivo para garantizar la homeostasis del tejido normal, que se elimina durante la tumorigénesis.

Evasión del sistema inmune. El rol del sistema inmune en la formación de tumores todavía no está del todo claro. Diversas teorías proponen que las células y los tejidos son vigilados constantemente por un sistema inmune siempre en alerta, y que dicha vigilancia es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las nuevas células cancerosas y, por lo tanto, los tumores nacientes. Según esta hipótesis, los tumores sólidos han logrado evitar ser detectados por el sistema inmune. Así, ciertos tipos de cáncer se desarrollan en individuos inmunocomprometidos [184].

Activación de inmortalidad replicativa. Contrariamente a la mayoría de las células normales del cuerpo que pasan a través de un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular, las células cancerosas requieren una capacidad replicativa ilimitada para generar tumores [185]. Esta limitación se debe a dos barreras: la senescencia, una entrada típicamente irreversible en un estado no proliferativo pero viable, y la apoptosis, que implica la muerte celular [185].

Inflamación promovida por el tumor. La inflamación es parte de la respuesta inmune no específica que ocurre en respuesta a estímulos nocivos, como patógenos, células dañadas o irritantes. Consiste en un aumento del flujo

sanguíneo, mayor metabolismo celular, vasodilatación, liberación de mediadores solubles, extravasación de fluidos y afluencia celular [186]. La presencia de leucocitos en los tumores, observada en el siglo XIX por Rudolf Virchow, proporcionó la primera indicación de un posible vínculo entre la inflamación y el cáncer [187]. Tanto las células inflamatorias como sus mediadores están presentes en la mayoría de los tumores [188], donde el microambiente inflamatorio alrededor del tumor impulsa la progresión del tumor [8]. La interleuquina-1 β (IL-1 β) es un mediador importante de la inflamación relacionada con el cáncer y puede ser secretada por las células inmunes, estromales y tumorales [189]. Los niveles de IL-1 β aumentan en una variedad de cánceres, incluido el cáncer de colon [190, 191]. Estudios recientes han demostrado que la interacción entre las células de cáncer de colon y las células inmunes induce la secreción de IL-1 β de las células inmunes [192, 193]. Los niveles elevados de IL-1 β se han asociado con un mayor crecimiento e invasión del tumor de colon [194, 195]. Sin embargo, todavía no está del todo claro cómo IL-1 β puede contribuir al desarrollo del cáncer.

Activación de invasión y metástasis. La metástasis implica la propagación de células cancerosas desde el tumor primario a los tejidos circundantes y a órganos distantes, es la causa principal de mortalidad por cáncer [196]. Las células cancerosas generalmente desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular [185].

Inducción de angiogénesis. Brevemente, al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La vasculatura nueva asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, se genera para cubrir estas necesidades. Durante la embriogénesis, la curación de heridas y el ciclo reproductivo femenino la angiogénesis se activa de manera transitoria. Por el contrario, durante la progresión del tumor, la angiogénesis se activa lo que hace que la vasculatura normalmente inactiva brote continuamente nuevos vasos que ayudan a mantener crecimientos neoplásicos en expansión [197].

Inestabilidad genómica y mutación. La obtención de las distintas características mencionadas anteriormente depende en gran medida de una sucesión de modificaciones en los genomas de células neoplásicas lo que

permite su crecimiento. La capacidad de los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y resolver defectos en el ADN garantiza que las tasas de mutación espontánea sean generalmente muy bajas durante cada generación celular. Mediante mutaciones inactivadoras o represión epigenética, los sistemas “cuidadores” del genoma pueden verse afectados [198] aumentando la incidencia al cáncer [199]. Los sistemas cuidadores del genoma cumplen una amplia gama de funciones como detectar daños en el ADN y activar la maquinaria de reparación, reparar directamente el ADN dañado e inactivar moléculas mutagénicas antes de que hayan dañado el ADN [200, 201]. TP53 llamado el “guardián del genoma”, cumple funciones en la detención del ciclo celular, en la activación de proteínas de reparación del ADN, en el ingreso a la senescencia y en la activación de la apoptosis [202]. Aunque la alteración del genoma varía enormemente entre los diferentes tipos de tumores, la inestabilidad del genoma es propio de la gran mayoría de las células cancerosas humanas.

Evasión de la muerte celular. En condiciones fisiológicas, las células dañadas en la embriogénesis, en la metamorfosis, cuando hay carencia de los factores de crecimiento, por activación de los llamados receptores de muerte, en células sometidas a estrés por radiación ionizante o por compuestos químicos mutagénicos, etc., se eliminan a través de un tipo de muerte celular programada denominada apoptosis [203, 204]. Este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular; cuando se altera se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer [205].

Reprogramación del metabolismo energético. Las enfermedades neoplásicas, además de los puntos anteriormente vistos, generan un cambio en el metabolismo energético para alimentar el crecimiento y la división celular. Las células normales, en condiciones aeróbicas, procesan la glucosa para dar piruvato a través de la glucólisis en el citosol, y luego ese piruvato se transforma en dióxido de carbono en la mitocondria. En condiciones anaeróbicas, se favorece la glucólisis y se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias que consumen oxígeno. En las células cancerosas fue observado un mecanismo energético modificado, llamado efecto Warburg, donde incluso en presencia de

oxígeno, las células cancerosas producen energía principalmente en el citosol por un proceso de glicólisis aeróbica [206] (Figura 11). Existen varias controversias con respecto a las consecuencias y a la función del efecto Warburg. Se ha hipotetizado que el efecto Warburg es la causa que las células cancerosas promuevan su crecimiento y proliferación a través del aumento en la síntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas [207] y puedan acceder a una mayor fuente de energía (ATP) permitiendo que la oxidación de la glucosa ocurra entre 10 a 100 veces más rápido que la oxidación completa de glucosa en las mitocondrias [208]. Otra característica del efecto Warburg es la acidificación del espacio extracelular debido al aumento de lactato, hecho que promueve el crecimiento invasivo y la metástasis de células malignas [209, 210]; otra teoría sugiere que el lactato ayuda a evadir el sistema inmune [211, 212]. Estudios previos en nuestro laboratorio determinaron que el loop autócrino de IL-1 β , aumenta la actividad de la enzima lactato deshidrogenada (LDH) responsable de la conversión de piruvato a lactato, a través de JNK y c-Src. El aumento en la actividad de LDH fue acompañado por un aumento del ácido láctico y por una acidificación del medio extracelular [213]. Por otro lado, la alta tasa de absorción de glucosa afecta el potencial redox citosólico y mitocondrial [214] causando una variación en la generación de ROS, afectando los mecanismos de señalización de las células tumorales y finalmente favoreciendo la proliferación celular [215].

Se ha demostrado que el aumento de la glucólisis está asociado con oncogenes activados (Ej. *RAS* y *MYC*) y supresores tumorales mutados (Ej. *TP53*) [216, 217], confiriéndole a las células tumorales mayor capacidad de proliferación y menor apoptosis. Las condiciones de hipoxia que se encuentran presentes dentro de muchos tumores pueden aumentar los niveles del factor de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α que regulan positivamente la glucólisis [218-220] (Figura 11). Recientemente se ha descubierto una nueva vía de señalización que involucra a HIF-1 α y a GPRC5A, donde la hipoxia aumentó a través de HIF la expresión de GPRC5A y éste último a YAP (“yes-associated protein”), protegiendo a las células tumorales de la apoptosis durante la privación de oxígeno [221].

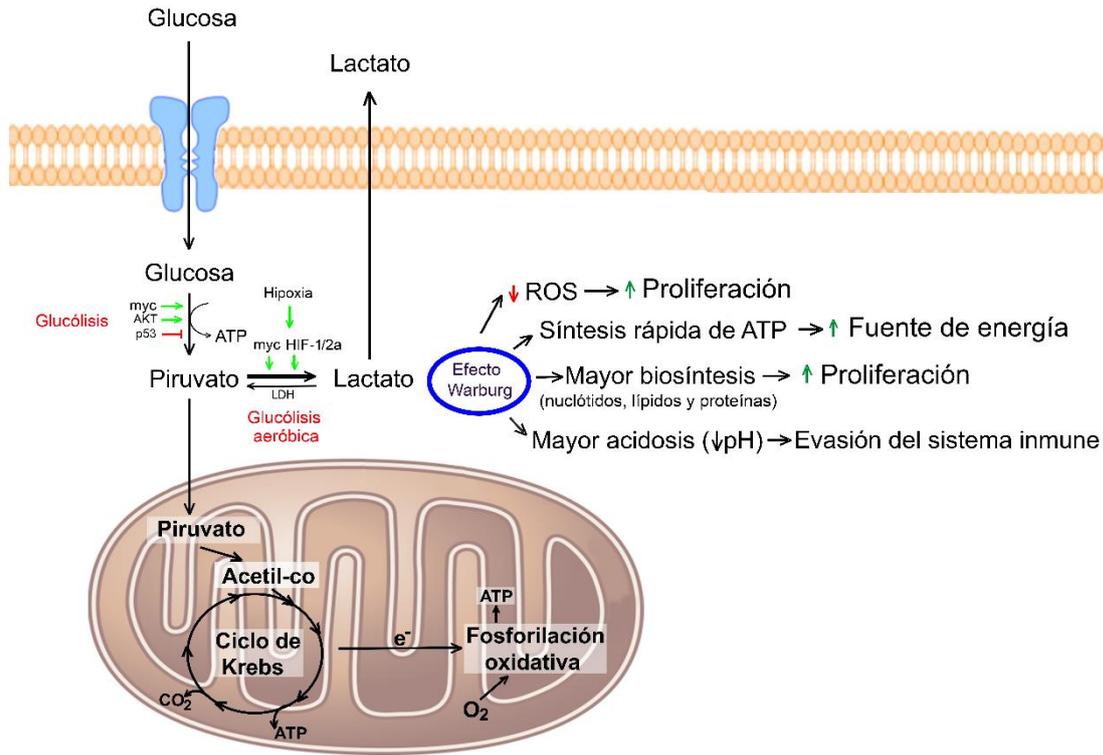


Figura 11: Efecto Warburg. El efecto Warburg se define como un aumento en la tasa de absorción de glucosa y de la producción preferencial de lactato incluso en presencia de oxígeno. Se ha hipotetizado que la principal función del efecto Warburg es aumentar la proliferación celular a través de la reducción del pH extracelular, aumento de la biosíntesis (nucleótidos, lípidos y proteínas), aumento en la velocidad en la producción de ATP y disminución de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Abreviaturas: LDH: lactato deshidrogenasa; HIF-1/2a: factor inducible por hipoxia; AKT: o proteína quinasa B; Acetil-co: acetil coenzima A.

3.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En el microambiente inflamatorio crónico predominan los macrófagos. Esos macrófagos, junto con otros leucocitos, generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) para combatir las infecciones [222]. Antes se pensaba que solo las células del sistema inmune eran las productoras de ROS, pero más tarde se descubrió que también lo hacen las células epiteliales [223]. Las ROS son radicales, iones o moléculas que tienen un solo electrón no apareado en su capa más externa de electrones, debido a esto, las ROS son altamente reactivas. Las ROS pueden clasificarse en dos grupos: radicales y no radicales. Dentro del grupo de ROS radicales se encuentra el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), óxido nítrico ($NO\cdot$), radicales orgánicos ($R\cdot$), radicales

peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), radicales alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), radicales tiilo ($\text{RS}\cdot$), radicales sulfonilo ($\text{ROS}\cdot$), radicales tiil peroxilo ($\text{RSOO}\cdot$) y disulfuros (RSSR). Dentro del segundo grupo, ROS no radicales, se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (O_2), ozono/trioxígeno (O_3), hidroperóxidos orgánicos (ROOH), hipocloruro (HOCl), peroxinitrito (ONO^-), anión nitrosoperoxicarbonato ($\text{O}=\text{NOOCO}_2^-$), anión nitrocarbonato ($\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$), dióxido de dinitrógeno (N_2O_2), nitronio (NO_2^+) y compuestos de carbonilo derivados de lípidos o carbohidratos altamente reactivos [224]. Entre ellos, el radical superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo son las ROS mejor estudiadas en cáncer.

Se conoce que las vías de señalización sensibles al estrés oxidativo están constantemente estimuladas en muchos tipos de cáncer y afectan a varios aspectos de las células cancerosas [225, 226]. Por ejemplo, las ROS en el cáncer están involucradas en la progresión y proliferación del ciclo celular, supervivencia y apoptosis celular, metabolismo energético, morfología celular, adhesión celular, motilidad celular, angiogénesis y mantenimiento del tumor [224]. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las principales ROS, puede actuar como segundo mensajero en la señalización celular [227-231]. El H_2O_2 regula la actividad de las proteínas oxidando de manera reversible a los grupos sulfhidrilo y de manera irreversible a otros grupos funcionales [225, 232, 233]. Entre las proteínas que regulan están incluidas las tirosina-fosfatasa, las tirosina-quinasa, los receptores tirosina-quinasa y los factores de transcripción [225, 232, 233]. Está comprobado que varias isoformas de PKC son activadas por H_2O_2 [234, 235]. De manera indirecta, el H_2O_2 afecta la fosforilación de su sitio activo, y se cree que es por medio de la inhibición de las fosfatasa. El H_2O_2 es un oxidante suave que puede oxidar los residuos de cisteína en las proteínas. Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) contienen un residuo de cisteína esencial en el sitio activo característico que es importante para la función catalítica. Por lo tanto, los PTP experimentan una inactivación mediada por H_2O_2 debido a la oxidación de estos importantes residuos de cisteína [236-238].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un factor clave del fenotipo metabólico del cáncer. Los niveles intracelulares de ROS pueden modificarse mediante una variedad de parámetros que incluyen oxigenación, disponibilidad de glucosa, factores de crecimiento, sustancias carcinógenas y citoquinas (Figura 12). Las ROS actúan como integradores de la información ambiental y

como efectores río abajo de las vías de señalización. Mantener ROS dentro de un rango acotado permite que las células malignas mejoren el crecimiento y la invasión al tiempo que disminuyen el ingreso a la apoptosis. Las células cancerosas modifican activamente su metabolismo para optimizar los niveles intracelulares de ROS y mejorar así la supervivencia [215].

Aunque las ROS se consideran clásicamente como citotóxicas y mutagénicas, hay evidencia que sugiere que las ROS, como el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , sirven como reguladores de las vías de transducción de señales para la proliferación y supervivencia celular. Algunas de ellas es la vía MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) / ERK1/2 (“extracelular regulated kinase 1/2”), donde en cáncer de mama y ovario, melanoma y leucemia las ROS la regulan positivamente generando un aumento en la proliferación celular, la supervivencia celular y la motilidad [239-242]. En cáncer de hígado tratamientos con TPA indujo la generación de ROS y éstas a través de la activación de PKC (“protein kinase C”) aumentó los niveles de ERK que provocó un aumento en la migración celular [243]. Otras de las vías regulada por las ROS en cáncer es la vía de AKT/PKB (“protein kinase B”) [244-247], una vía antiapoptótica que regula la supervivencia celular a través de la activación de NF- κ B (“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”) y la fosforilación y la inactivación de sus sustratos, como las proteínas proapoptóticas Bad, Bax, Bim y el factor de transcripción FOXO [248-252]. En cáncer pancreático, las ROS promovieron la supervivencia celular a través de la activación de AKT [247].

Por otro lado, en muchos tipos de tumores hay un aumento en la actividad del factor de transcripción NF- κ B (“nuclear factor- κ B”) [253-256]. NF- κ B tiene un rol crucial en la supervivencia de las células tumorales, la regulación del ciclo celular y la proliferación, la adhesión celular y el desarrollo de resistencia a los medicamentos en las células cancerosas durante la terapia [257-259]. NF- κ B es un sensor del estrés oxidativo [260] y se activa a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno [261]. El estrés oxidativo activa NF- κ B a través de una variedad de vías de señalización distintas [262]; por ejemplo, el tratamiento de las células de cáncer de mama con IL-1 β genera H_2O_2 y superóxido, lo que activa a NF- κ B y produce un aumento de la proliferación celular [263, 264]. El aumento de ROS también genera aumento de NF- κ B a través de la activación de la proteína quinasa C δ (PKC δ) [265] (Figura 12).

Contrariamente a los ejemplos anteriormente citados, donde las ROS tienen capacidad para activar las vías de señalización mitogénicas, también se ha demostrado que los niveles elevados de ROS inducen la detención del ciclo celular, la senescencia y la muerte de las células cancerosas mediante la activación de las vías de señalización JNK (“c-Jun N-terminal kinase”) y p38 (“mitogen activated protein kinase p38”) [266, 267]. La vía de ERK1/2 también tiene un rol anti-tumorigénico, la cual al ser modulada por ROS, genera un aumento en la apoptosis celular [268]. La liberación mitocondrial de H₂O₂ y NO conduce a la activación de la quinasa JNK (“cJun N-terminal kinases”) [269, 270]. En respuesta a ROS, JNK cataliza la fosforilación y la regulación negativa de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 [271], la liberación de citocromo C [272, 273] y la activación corriente abajo de caspasas [269] (Figura 12).

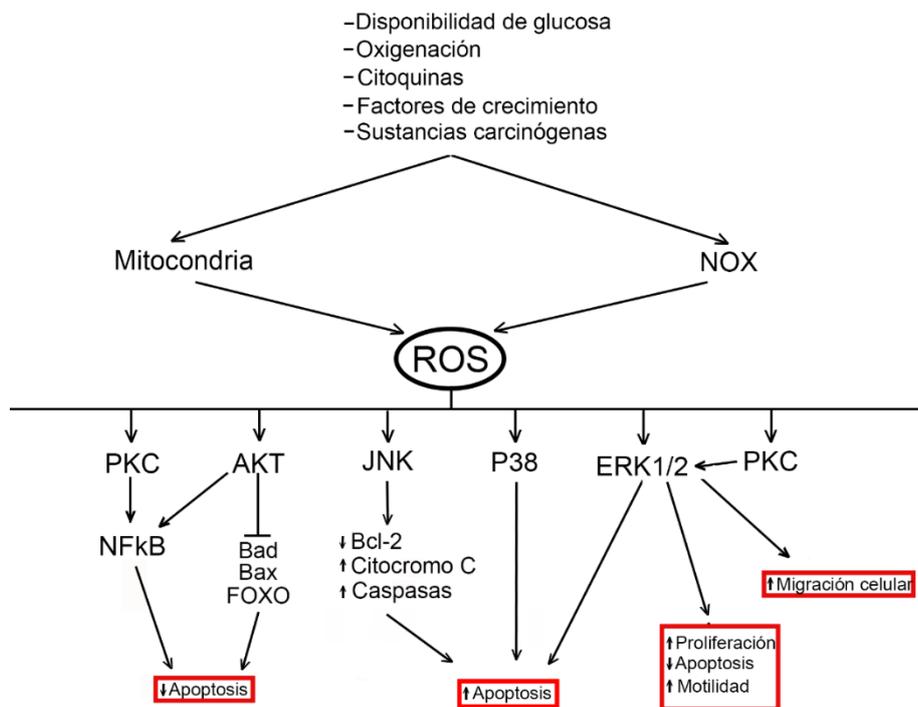


Figura 12: Principales vías de señalización moduladas por ROS en cáncer.

Resultados previos de este laboratorio determinaron la existencia de un loop autócrino de IL-1β [274], el cual consiste en que tratamientos con IL-1β exógena, por medio de la activación de su receptor y posterior activación del factor de transcripción NF-κB, induce la transcripción del ARNm de IL-1β y luego la

traducción a pro-IL-1 β . La maduración de pro-IL-1 β a IL-1 β madura y su posterior secreción estuvo modulada por el ión cloruro (Cl⁻) [275]. Por lo tanto ión Cl⁻ actúa como un segundo mensajero modulando la expresión, maduración y secreción de IL-1, como también la modulación de otros genes como por ejemplo *RPS27* (“ribosomal protein S27”) y *GLRX5* (“glutaredoxin 5”) [276, 277]. Este loop autócrino de IL-1 β produjo disminución en la actividad del complejo I mitocondrial (mCx-I) y aumento de las ROS celulares y mitocondriales [274]. Luego se observó que el aumento de ROS estaba mediado por c-Src (“proto-oncogene tyrosine-protein kinase”) y por la activación de NOX1/4 [278]. Este loop también activó la expresión de uno de los ligandos del receptor EGFR (“epidermal growth factor receptor”), EREG (“epiregulin”), conduciendo al aumento en la actividad de dicho receptor [279]. Por lo tanto, continuar con el estudio de IL-1 β y Cl⁻ como moduladores de ROS y moduladores de la expresión de genes es de gran importancia.

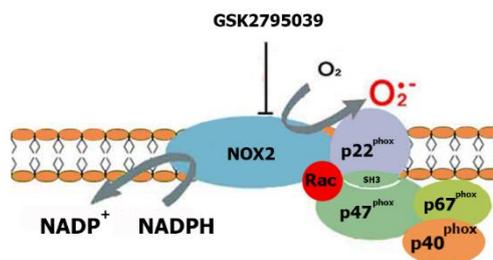
3.1.1.1. Fuentes celulares de ROS

Las fuentes endógenas de ROS incluyen diferentes organelas celulares como mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico. Las principales fuentes de ROS son la cadena de transporte de electrones mitocondrial y el complejo NADPH oxidasa (NOX) [280].

Mitocondria. Durante la respiración celular los electrones pasan a través de una serie de complejos mitocondriales al receptor de electrones terminal, el oxígeno molecular (O₂). Los radicales superóxido O₂^{-•}, son producidos en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y complejo III (ubiquinona citocromo c reductasa) cuando estos complejos transfieren los electrones a la coenzima Q, también llamada ubiquinona (Q), y ésta los transfiere finalmente al oxígeno molecular generando radicales superóxido. Los otros componentes mitocondriales que contribuyen a la formación de ROS incluyen monoaminoxidasa, α -cetoglutarate deshidrogenasa, glicerol fosfato deshidrogenasa y p66shc [281]. La mayor parte de p66Shc se encuentra en el citoplasma con una pequeña fracción localizada en el espacio intermembrana mitocondrial. Luego el estrés oxidativo activa a PKC β que fosforila a p66Shc [282], el cual se transloca al espacio intermembrana mitocondrial, donde se

asocia con el citocromo-c que transfiere electrones al oxígeno molecular generando $O_2^{\cdot-}$.

Complejo NADPH oxidasa (NOX). El complejo NOX se encuentra unido a la membrana y cataliza la generación de $O_2^{\cdot-}$ intracelular y extracelular a partir de O_2 y NADPH [283]. El primer miembro de la familia NOX identificado, NOX2 (originalmente llamado gp91phox), es una glucoproteína unida a la membrana expresada en los fagocitos que genera ROS en respuesta a la infección bacteriana y fúngica [284]. Se ha identificado homólogos de gp91phox (NOX2) en células no-fagocíticas como por ejemplo en células epiteliales de colon humano [285, 286]. Aunque se localizan principalmente en la membrana plasmática, los NOX de mamíferos se pueden encontrar en otras membranas, incluidas las del núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico [283]. El principal componente de la enzima NOX2 es una subunidad catalítica glicosilada localizada en la membrana, que se ensambla con una segunda subunidad asociada a la membrana, p22phox. Hay cuatro subunidades reguladoras citosólicas, p47phox, p67phox, p40phox y la proteína G Rac, que luego de su activación, se traslocan a la membrana y se asocian con el complejo gp91phox / p22phox. Una vez formada, la enzima NOX2 cataliza la conversión de NADPH citoplasmático a $NADP^+$ con la transferencia de electrones hacia las moléculas de oxígeno, lo que resulta en la formación de aniones superóxido en el espacio extracelular [287] (Figura 13). Por su localización celular, los SOD 1 y 3 pueden convertir rápidamente el $O_2^{\cdot-}$ derivado de NOX en H_2O_2 , que puede difundir a través de la membrana [288]. En presencia de un catalizador metálico, el H_2O_2 se convierte en radicales hidroxilo ($HO\cdot$) a través de la reacción química de Fenton [289]. El $HO\cdot$ es altamente tóxico debido a su alta reactividad indiscriminada, lo que provoca la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y finalmente su acumulación da como resultado daño celular o inestabilidad genómica [290].



NADPH oxidasa 2 (NOX2)

Figura 13: Estructura del complejo NADPH oxidasa (NOX2). La actividad de NOX2 requiere las subunidades p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y Rac. Una vez activada, la enzima NOX2 cataliza la conversión de NADPH citoplasmático a NADP⁺ con la transferencia de electrones hacia las moléculas de oxígeno, lo que resulta en la formación de aniones superóxido (O₂⁻). El inhibidor farmacológico GSK2795039 inhibe la actividad de NOX2 y por lo tanto la generación de O₂⁻.

3.1.1.2. Antioxidantes celulares

Las células cuentan con sistemas de protección contra el ataque de las ROS a los lípidos, proteínas y ADN. Existen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los agentes antioxidantes enzimáticos más conocidos son las superóxido dismutasas (SOD), las glutatión peroxidadasas (GPX), las peroxiredoxinas (PRX) y las catalasas (CAT) [291].

Las superóxido dismutasas (SOD) son los principales sistemas de defensa antioxidante contra el O₂⁻ [292]. Hay tres isoformas de SOD en mamífero: la Cu / ZnSOD citoplásmica (SOD1), la MnSOD mitocondrial (SOD2) y la Cu / ZnSOD extracelular (SOD3) [293]. El O₂⁻ liberado en la matriz mitocondrial por los complejos I, II y III se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por SOD2 [294]. El O₂⁻ liberado del complejo III en el espacio intermembrana atraviesa los canales iónicos dependientes de voltaje en el citosol para ser convertido en H₂O₂ por SOD1 [295]. La SOD1 de mamíferos también puede convertir el O₂⁻ en el espacio intermembrana mitocondrial en H₂O₂ que difunde libremente [296]. SOD3 es la SOD principal en el espacio extracelular vascular que funciona como protección contra los efectos tóxicos de los superóxidos [297].

La glutatión peroxidasa (GPX) puede convertir H_2O_2 en H_2O en el citoplasma y las mitocondrias. Durante este proceso, los GPX oxidan el glutatión reducido (GSH) a disulfuro de glutatión (GSSG). Por otro lado, la glutatión reductasa (GR) reduce el GSSG oxidado de nuevo a GSH, utilizando NADPH como donante de electrones [298].

Las peroxiredoxinas (PRX) y las catalasas (CAT) son otra familia de enzimas antioxidantes que convierten el H_2O_2 intracelular en agua [299, 300].

Dentro de los mecanismos no enzimáticos se incluyen antioxidantes de bajo peso molecular como las vitaminas E y C, la bilirrubina, el ácido úrico, el ácido ascórbico y el glutatión [301].

N-acetilcisteína (NAC) es un antioxidante farmacológico ampliamente utilizado [302], a pesar de esto, no está del todo claro su mecanismo de acción. Por un lado, se cree que NAC elimina directamente los oxidantes a través de su grupo tiol (Benrahmoune et al., 2000; Winterbourn y Metodiewa, 1999). Por otro lado, se cree que NAC ingresa a las células y dentro del citosol, se convierte en L-cisteína, un precursor de la síntesis de GSH [280]. NAC también es una fuente de sulfuro de hidrógeno (H_2S), una molécula de señalización redox [303], que posteriormente se oxida a especies de azufre en las mitocondrias [304] que se cree que son un mediador clave de los efectos antioxidantes de NAC [305]. Otro

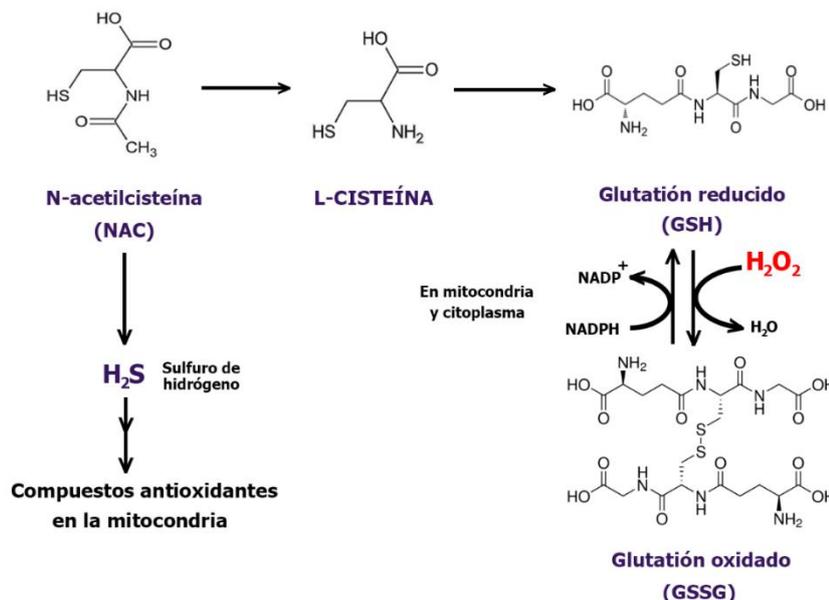


Figura 14. Mecanismo antioxidante de N-acetil-cisteína (NAC).

antioxidante farmacológico es el inhibidor selectivo del complejo NADPH oxidasa 2 (NOX 2) GSK2795039 [287] (Figura 14).

3.1.2. Muerte celular programada, apoptosis

Las células que entran en apoptosis sufren un estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática [185]. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN [185]. El citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico [306]. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células [307]. La rápida fagocitosis de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento en la membrana celular de la N-acetilglucosamina y de la fosfatidilserina [308], que son señales para la fagocitosis [309]. Durante la apoptosis participa la transglutaminasa (de tejidos) que provee a los cuerpos apoptóticos de una consistencia rígida y evita que las moléculas del citoplasma se difundan fuera de él [310]. También hay un aumento de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} necesarios para la actividad de las endonucleasas [311]. Todos estos cambios estructurales son provocados por la transmisión de señales mediadas por un grupo de cisteín-proteasas denominadas caspasas. Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca) [312] (Figura 15).

En la vía extrínseca, se recibe una señal desde fuera de la célula que induce el camino hacia la muerte celular. Esto puede ocurrir si la célula ya no es necesaria o si está dañada. Al igual que muchas vías para provocar cambios complejos en una célula, la vía extrínseca implica muchos pasos, cada uno de los cuales puede ser regulado por la expresión génica o por otras moléculas (Fig. 15):

- 1- Como la mayoría de las señales entre células, la vía extrínseca de la apoptosis comienza con moléculas señalizadoras que se unen a los receptores llamados receptores de muerte ("dead receptors", DRs), en el exterior de la membrana celular; en mamíferos existen seis DRs: TNFR1, Fas, DR3, DR4/TRAILR1, DR5/TRAILR2, y DR6. La mayoría de los DRs pertenecen a la superfamilia de receptores TNF ("tumor necrosis factor") [313]. Dos tipos comunes de mensajeros químicos que desencadenan la vía extrínseca a la apoptosis son FAS/APO-1/CD95 [314] y TRAIL/APO-2 ("Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand") [315]. Estas moléculas pueden ser secretadas por las células vecinas (efecto paracrino) si una célula está dañada o ya no es necesaria. Los receptores que unen FAS y TRAIL se denominan "FASR" ("FAS receptor") y "TRAILR" ("TRAIL receptor")
- 2- El proceso de unión del ligando con el receptor provoca cambios en el dominio intracelular del receptor. En respuesta a los cambios en el dominio intracelular de TRAILR o FASR, los receptores reclutan proteínas como FADD (dominio de muerte asociado a FAS o "Fas-associated protein with death domain") y TRADD ("TNFR1 associated death domain") para propagar señales apoptóticas [316]. La asociación de estas proteínas da como resultado la formación del complejo DISC ("death-inducing signaling complex") [317].
- 3- El complejo DISC a su vez también interactúa con dos proteínas adicionales, pro-caspasa-8 y pro-caspasa-10, que permiten continuar con el proceso de muerte celular.
- 4- Pro-caspasa-8 y pro-caspasa-10 son proteínas inactivas hasta que interactúan con un FADD activado. Si estas dos moléculas encuentran un FADD activado, las partes de las proteínas que las mantienen inactivas se "cortan" y las pro-caspasas se convierten en caspasa-8 y caspasa-10. Estas caspasas se dispersan a través del citoplasma y desencadenan cambios en varias otras moléculas.
- 5- La familia de proteínas Bcl-2 incluye miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1) y pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bok y proteínas solo BH3 ("only BH3"): Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Bad, Hrk, Bid) [318, 319]. La molécula pro-apoptótica inactiva llamada BID (miembro de la familia Bcl-2

subgrupo proteínas solo BH3), se transforma en “truncated BID” tBID cuando es clivada por las caspasas activadas [320-322]. Después de que BID se transforma en tBID, tBID se mueve a las mitocondrias insertándose en la membrana mitocondrial y activa a dos moléculas pertenecientes a la familia Bcl-2 pro-apoptóticas, BAX y BAK [323]. La activación de BAX y BAK son los primeros pasos compartidos por las vías extrínsecas e intrínsecas a la apoptosis.

La vía intrínseca, se desencadena por el estrés o el daño a la célula como daño en el ADN, privación de oxígeno, sobreexpresión de oncogenes, medicamentos de quimioterapia e irradiación, y otros tipos de estrés que afectan la capacidad de funcionamiento de una célula [324]. Los pasos son los siguientes (Figura 15):

- 1- En respuesta a estos daños se activa un conjunto de proteínas pro-apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2 llamadas “BH3-only proteins” (proteínas solo BH3) [324].
- 2- Las proteínas pro-apoptóticas “solo BH3” inhiben a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 [325] eliminando la inhibición sobre BAX y BAK [326] o estimulan directamente a los miembros proapoptóticos de esta familia [324, 325].
- 3- BAX y BAK activados causan una condición conocida como MOMP (permeabilización de la membrana externa mitocondrial o “Mitochondrial outer membrane permeabilisation”) [327]. MOMP se considera el "punto de no retorno" para la apoptosis. Los pasos que conducen a MOMP pueden ser detenidos en su camino por moléculas inhibitoras, pero una vez que se haya iniciado MOMP, la célula completará el proceso de muerte.
- 4- MOMP desempeña su papel clave en la apoptosis al permitir la liberación de citocromo C en el citoplasma [328].
- 5- En circunstancias normales, el citocromo C tiene un rol importante en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (o cadena respiratoria). Durante MOMP, sin embargo, el citocromo C se libera de las mitocondrias y actúa como una molécula de señalización en el citoplasma celular. Se ha demostrado que la liberación de citocromo c de las mitocondrias promueve la formación de un complejo llamado apoptosoma, compuesto por citocromo

c, Apaf-1 (“apoptotic protease-activating factor 1”) y caspasa-9, que activa la caspasa-9 [329-331]. Al igual que con la activación de las caspasas-8 y -10 en la ruta extrínseca, la caspasa-9 desencadena diversos cambios en toda la célula.

- 6- La caspasa-9 realiza varias funciones para promover la apoptosis. Entre los más importantes está la activación de caspasas-3 y -7 [329-331]. Una vez activadas, las caspasas-3 y -7 comienzan la descomposición de los materiales celulares. La caspasa-3 condensa el ADN de la célula y luego lo descompone.

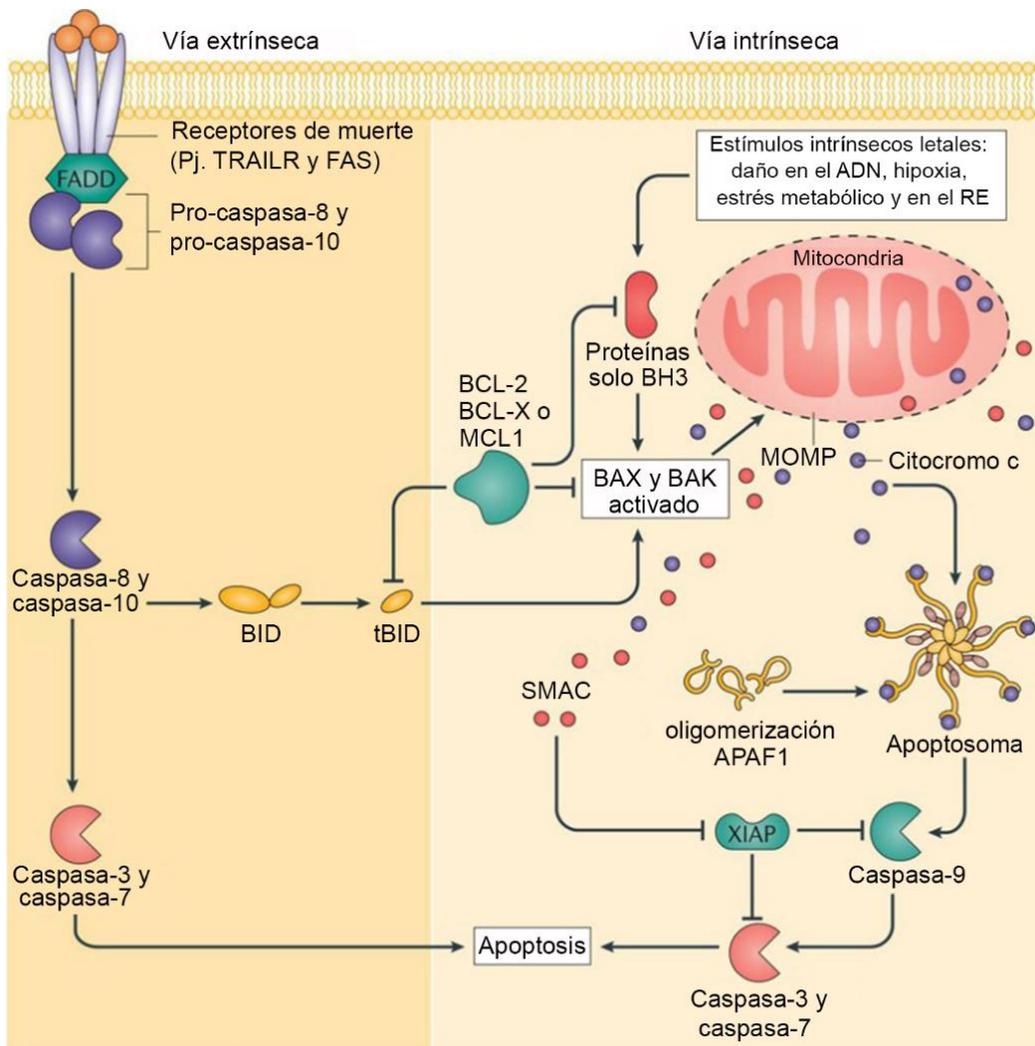


Figura 15: Vías de señalización de la muerte celular programada o apoptosis. Vía intrínseca: es iniciada por proteínas “solo BH3”, que inactivan las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1 y A1) eliminando la inhibición que estas proteínas ejercen sobre Bax y Bak. Bax o Bak pueden permeabilizar la membrana externa mitocondrial, liberando citocromo c, que provoca que Apaf-1 (factor de activación de la proteasa apoptótica 1) active la caspasa-9. Vía extrínseca: se activa cuando los ligandos de la familia TNF se unen a sus receptores en la superficie celular y activan la caspasa-8 a través de proteínas adaptadoras que incluyen FADD. Las dos vías son en gran medida independientes, pero en ciertas células la vía del receptor de muerte se involucra con la vía del estrés a través de una forma escindida de la proteína Bid (tBid), que puede comprometer a los homólogos de Bcl-2 y a Bax. Imagen modificada de [5].

3.1.2.1. Las Caspasas

Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis [312].

Las procaspasas son una familia de cisteín-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa [332]. Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10. Tomando en cuenta la estructura primaria, se pueden agrupar en dos clases: la clase I incluye a las procaspasas que tienen un prodominio N-terminal grande (procaspasas-1, -2, -8, -9 y -10) y la clase II a las que tienen un dominio N-terminal pequeño o sin este dominio (procaspasas-3, -6, -7) [333]. Los dominios de las procaspasas de clase I contienen regiones de interacción proteína-proteína que permiten la formación de complejos homodiméricos [334]. Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico. La autoactivación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad

de autoproteolizarse; durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico [335]. En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos, hidrolizando a las diversas proteínas del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN [336].

La muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer [325, 337, 338].

El "desencadenante apoptótico" que transmite señales entre los reguladores y los efectores está controlado por miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 [325]. La familia Bcl-2 de inhibidores de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) actúa en gran parte uniéndose y suprimiendo dos proteínas desencadenantes pro-apoptóticas (Bax y Bak).

Se han identificado varios sensores de anomalías en las células durante el desarrollo del tumor. Uno de ellos es el sensor de roturas en el ADN y anomalías cromosómicas que funciona a través del supresor de tumores p53 [325, 337]. P53 induce la apoptosis induciendo el aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, Noxa y Puma BH3 [339]. Otra condición que conduce a la muerte celular implica la señalización hiperactiva de ciertas oncoproteínas como Myc, que desencadena la apoptosis a través de Bim y otras proteínas "solo BH3" [340].

Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. Lo más común es la pérdida de la función supresora de P53, que elimina este sensor de daño. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares al aumentar la expresión de los reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de las señales de supervivencia (Igf1/2), al regular negativamente factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) o interferir en la señalización por ligandos extrínsecos [185]. La multiplicidad de mecanismos para evitar la apoptosis refleja la diversidad de señales inductoras de apoptosis que las poblaciones de células encuentran durante su evolución al estado maligno.

Las caspasas no solo participan en el proceso de apoptosis, sino que también están involucradas en la muerte celular mediada por piroptosis (caspasa 1, 4, 5 y 11) [341], necroptosis (caspasa 8) [342], autofagia (caspasa 1, 8, 9 y 3) [343] y catástrofe mitótica (caspasa 2) [344]. La función de las caspasas no se limita a

la muerte celular; también tienen roles no apoptóticos que incluyen participación en la inflamación e inmunidad (caspasas 1, 4, 5 y 12) [345], proliferación de células del sistema inmune (caspasa 8) [346], supresión tumoral (caspasa 2) [347], diferenciación celular (caspasas 2, 3, 7, 8 y 9) [348], desarrollo neural (caspasa 3 y 9) [349] y el envejecimiento (caspasa 2) [350].

3.2. Expresión diferencial de GPRC5A en cáncer

Como se observa en la Figura 8 (pág. 20), *GPRC5A* se expresa mayoritariamente en pulmón, pero es ampliamente estudiado en varios tejidos debido a que su desregulación se ha asociado con distintos tipos de cáncer en humanos, aunque sus niveles de expresión difieren entre los distintos tipos de cáncer.

3.2.1. GPRC5A como supresor de tumores

A continuación se describirá brevemente el posible rol de *GPRC5A* en diversos tipos de tumores. El trabajo de revisión de Jian X et al [10] describe con detalle estas relaciones.

3.2.1.1. Cáncer de pulmón

En cáncer de pulmón, la expresión de *GPRC5A*, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, es mucho menor comparado con el tejido sano pulmonar [113, 169, 351, 352]. En este sentido, se ha reportado que la expresión de *GPRC5A* es más alta en epitelios bronquiales normales que en pacientes con EPOC y cáncer de pulmón [113]. En modelos de ratones *KO-GPRC5A* (-/-), se ha reportado una mayor probabilidad de desarrollar espontáneamente tumores pulmonares que en los ratones *wt-GPRC5A* (+/+) [352]. Además, se observó que los ratones *KO-GPRC5A* presentaban mayores niveles de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, como IL-1 β , tanto a través de la activación de NF- κ B [353] como de STAT3 [169]. En otros estudios con modelos de ratón, se ha demostrado que el tratamiento con un carcinógeno de tabaco derivado de la nicotina fue capaz de inducir un mayor desarrollo de tumores en ratones *KO-GPRC5A* (-/-), comparados con los controles sin tratar [354, 355].

Por otra parte, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que la sobreexpresión de GPRC5A inhibe la viabilidad celular y aumenta la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de pulmón NSCLC, donde GPRC5A interactuaría como mediador de la actividad antitumoral de p53 [145]. Este efecto supresor de tumores en células NSCLC es inactivado a través de la fosforilación de GPRC5A por EGFR [155]. GPRC5A ubicado en la membrana del retículo endoplásmico (ER) suprimió la síntesis de proteínas oncogénicas como EGFR, perturbando el ensamblaje del complejo de iniciación de la traducción a través de la unión directa al complejo eIF4F. La supresión de EGFR por GPRC5A contribuye significativamente a prevenir la tumorigénesis pulmonar inducida por radiación ionizante (IR) en células NSCLC y ratones [356].

3.2.1.2. Cáncer de cabeza y cuello

A GPRC5A también se lo involucra con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. La expresión de GPRC5A a nivel proteína es mucho mayor en células escamosas (epidermis) orales normales que en carcinoma oral de células escamosas. La sobreexpresión de GPRC5A en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas revirtió el fenotipo maligno. Por lo tanto, GPRC5A es importante para la homeostasis en el tejido oral y la eliminación o represión de este gen puede implicar en la tumorigénesis en dicho tejido [357]. En carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello la represión de GPRC5A se correlacionó con STAT3 activado, que se asoció con características clínico-patológicas agresivas en pacientes con este cáncer. Además, la sobreexpresión de GPRC5A suprimió la activación de STAT3 inducida por IL-6 e inhibió el crecimiento celular [170].

3.2.2. GPRC5A como promotor de tumores

Hay que tener en cuenta que el aumento en la expresión de GPRC5A puede corresponder a una respuesta de la célula tratando de frenar al tumor y no necesariamente implica que GPRC5A esté actuando como oncogen. No necesariamente implica una relación causal. Incluso en algunos casos en que se ha demostrado una aparente relación causal, hasta que no se conozca en detalle la señalización de GPRC5A será difícil entender el rol aparentemente ambiguo

de GPRC5A, que en algunos casos se comporta como anti-oncogen y en otros como promotor de tumores.

3.2.2.1. Cáncer de colon

En cáncer de colon diversos estudios sugieren que GPRC5A se encuentra sobreexpresado [111, 358, 359]. La hipoxia, niveles reducidos de O₂ en el tejido, es una característica de los tumores [360] y se produce cuando el ritmo de crecimiento tumoral supera la disponibilidad de O₂, sumado a una perturbación del flujo sanguíneo [361, 362]. Las células tumorales activan una respuesta transcripcional adaptativa mediada principalmente por los factores inducibles por hipoxia (HIF) que los ayudan a sobrevivir y seguir creciendo [363, 364]. La hipoxia aumentó la expresión de GPRC5A a través de HIF, protegiendo a las células tumorales de la apoptosis por activación de la vía YAP (“yes-associated protein”). De este modo, GPRC5A regularía la respuesta adaptativa a la hipoxia a través de la vía HIF→GPRC5A→YAP, protegiendo a las células tumorales de colon [221].

Por otra parte, tanto en líneas celulares de cáncer de colon como en un modelo de cáncer asociado a colitis en ratones, la deficiencia de *GPRC5A* redujo los agentes oxidantes debido al aumento del nivel de glutatión reducido (GSH), el cual es considerado el mecanismo principal para la eliminación de ROS. GPRC5A reguló la expresión de Vanin-1 (VNN1) mediada por NF-κB, que es la enzima predominante para la generación de cisteamina. La administración de cistamina (la forma disulfuro de cisteamina) en líneas celulares deficientes en GPRC5A inhibió la actividad de γ-GCS (enzima limitante de la velocidad de síntesis de GSH cuya actividad es inhibida por la cistamina), lo que condujo a la reducción del nivel de GSH y al aumento del crecimiento celular. Esto sugiere que GPRC5A promueve la tumorigénesis a través de la estimulación de la expresión de Vanin-1 y el estrés oxidativo en el cáncer asociado a la colitis [111].

3.2.2.2. Cáncer gástrico

En cáncer gástrico, en comparación con los tejidos gástricos normales, los niveles de expresión de proteínas y ARNm de GPRC5A se encuentran significativamente elevados [365]. El aumento de la expresión de GPRC5A está

significativamente relacionado con parámetros clínicos agresivos, como mayor tamaño del tumor y la metástasis en los ganglios linfáticos, teniendo un rol en la progresión tumoral en cáncer gástrico [366]. Los ARN circulares (circRNA) y los micro ARN (miRNA) son ARN no codificantes, algunos de los cuales se cree que participan en el desarrollo del cáncer. En particular, en cáncer gástrico se observó que el circRNA hsa_circ_006100, el cual cumple un rol oncogénico, se encuentra sobreexpresado; mientras que la expresión de miR-195 (un blanco predictivo de GPRC5A), que cumple un rol supresor de tumores, se encuentra reducido. En modelos celulares y animales de cáncer gástrico, la sobreexpresión de *GPRC5A* aumentó la viabilidad y la proliferación celular, pero este efecto fue reprimido por la sobreexpresión de miR-195. Los elevados niveles del circRNA hsa_circ_006100 en cáncer gástrico promovió el crecimiento celular y la metástasis por disminución de los niveles de miR-195 (inhibiendo su función supresora de tumores) y aumentando la función aparentemente oncogénica de GPRC5A [367]. Por otro lado, en otro modelo de cáncer gástrico, la sobreexpresión de miR-204 redujo la proliferación celular en cáncer gástrico y reguló negativamente la expresión de GPRC5A [152].

3.2.2.3. Cáncer de páncreas

Estudios en cáncer de páncreas, tanto en líneas celulares como en tejidos, se observó un aumento en la expresión de GPRC5A, comparado con células pancreáticas normales. El silenciamiento de GPRC5A disminuyó el crecimiento celular, la proliferación, la formación de colonias y la capacidad de migración de las células de carcinoma pancreático [153, 368].

3.2.2.4. Cáncer de próstata

En cáncer de próstata también se observó un rol de GPRC5A como promotor de tumores. A partir del silenciamiento de GPRC5A, se observó una proliferación celular menor tanto *in vitro* como *in vivo*, y una participación de GPRC5A en la regulación del ciclo celular. También se correlacionó a GPRC5A con metástasis en cáncer de huesos en pacientes con cáncer de próstata [369].

3.2.3. Investigaciones contrapuestas en cáncer

3.2.3.1. *Carcinoma hepatocelular*

Existe información contrapuesta con respecto al rol que cumple GPRC5A en carcinoma hepatocelular. Estudios en siete líneas celulares de este tipo de cáncer revelaron niveles más bajos de ARNm de GPRC5A [370], mientras que en estudios en tejidos derivados de pacientes se encontró elevada la expresión del ARNm y de la proteína de GPRC5A [371, 372].

3.2.3.2. *Cáncer de mama*

En estudios realizados en líneas celulares y tejidos de cáncer de mama se demostró una elevada expresión del ARNm de *GPRC5A* en comparación con el tejido normal, donde el silenciamiento de GPRC5A (-/-) condujo a la inhibición del crecimiento celular [373]. Resultados similares se obtuvieron en otras líneas celulares de cáncer de mama, donde además se observó una correlación entre la expresión de p53 con la expresión de *GPRC5A*. En estos estudios, las células que expresaban p53 mostraban un menor nivel de expresión de GPRC5A, en tanto que las células *KO-P53* presentaron mayor expresión de GPRC5A [144]. En concordancia con los resultados anteriores, mediante estudios de inmunohistoquímica en tejidos de cáncer de mama y en tejidos mamario normal, se mostró que GPRC5A se expresa de manera abundante en cáncer de mama. Sin embargo, no se pudo establecer ninguna asociación entre la expresión de GPRC5A y las características clínico-patológicas [374].

Una interacción defectuosa célula-matriz permite que las células epiteliales se desprendan afectando la arquitectura del tejido y la migración celular y el comportamiento invasivo [171, 172]. Por lo tanto, una regulación alterada de la adhesión célula-matriz puede facilitar la progresión del cáncer, como se muestra para varios tipos de cáncer humano [173, 174]. A pesar de que la mayoría de los trabajos indican un papel para *GPRC5A* como promotor de tumores en cáncer de mama, los siguientes estudios sugieren lo contrario. El silenciamiento de *GPRC5A* en líneas celulares de cáncer de mama resulta en una reducción de la adhesión celular de células epiteliales y una mayor capacidad de propagación. Este efecto fue acompañado por la desregulación de la expresión de la integrina

$\beta 1$ y la disminución de la activación de FAK, un regulador intracelular de la adhesión celular [175, 176], y su unión reducida a la quinasa c-Src [177]. Además, GPRC5A junto con el regulador de transporte de iones FXYD3 y PYCARD, mediadores de la apoptosis y la inflamación, son reportados como posibles marcadores para predecir la clasificación patológica del cáncer de mama, beneficiando los tratamientos clínicos [375]. Otros estudios demostraron que en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231, células que expresan EGFR, la eliminación de GPRC5A promovió la formación de colonias, el crecimiento celular, la migración celular y las capacidades de invasión, pero no tuvo este efecto en la línea celular de cáncer de mama MCF7 que no expresan EGFR. La eliminación de GPRC5A aumentó la señalización de EGF, un efecto que puede revertirse inhibiendo la fosforilación de EGFR [376]. Esto probablemente se debe a que GPRC5A tiene un efector inhibidor sobre EGFR [376]. Pero a su vez, EGFR inhibe por fosforilación a GPRC5A [155], de modo que se regulan recíprocamente, manteniendo un equilibrio complejo.

En la Tabla 3, se resume el nivel de expresión de *GPRC5A* en células tumorales, comparadas con células sanas en diversos tejidos, y su rol en el desarrollo del tumor.

Tipo de cáncer	Expresión de GPRC5A	Consecuencias de la modificación de la expresión de GPRC5A	Rol de GPRC5A
Cáncer de pulmón	↓	Mayor activación de NFkB, STAT3, citoquinas. Desarrollo de tumores.	supresor tumoral
Cáncer de cabeza y cuello	↓	Mayor activación de STAT3.	supresor tumoral
Cáncer de mama	↑	Mayor crecimiento celular	pro tumoral
		Mayor expresión de integrina $\beta 1$ y FAK (mayor adhesión celular), menor crecimiento y migración celular.	supresor tumoral
Cáncer de colon	↑	Regula la respuesta adaptativa a la hipoxia (HIF→GPRC5A→YAP). Mayor agentes oxidantes por reducción de glutatión reducido vía Vanin-1.	pro tumoral
Cáncer gástrico	↑	Aumento del tamaño de tumores y de metástasis, mayor viabilidad y proliferación celular.	pro tumoral

Cáncer de páncreas	↑	Mayor crecimiento celular, proliferación y migración.	pro tumoral
Cáncer de próstata	↑	Mayor proliferación celular.	pro tumoral
Carcinoma hepatocelular	↓↑	-	pro tumoral/supresor tumoral

Tabla 3: Resumen de la expresión diferencial de *GPRC5A* en distintos tipos de cáncer, comparado con tejido sano, y su función.

4. GPRC5A Y SU IMPLICANCIA EN OTRAS ENFERMEDADES

GPRC5A se expresa altamente en podocitos (células renales) y su expresión está significativamente disminuida en glomérulos de pacientes con nefropatía diabética, enfermedad causada por daño a los nefrones (unidad estructural y funcional del riñón) por exceso de glucosa en sangre. El silenciamiento de GPRC5A provocó el engrosamiento de la membrana basal glomerular y la activación de las células mesangiales, que son dos características de la nefropatía diabética en humanos. GPRC5A moduló la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la activación del receptor de EGF en línea celular humana de podocitos [377].

5. 12-O-TETRADECANOILFORBOL-13-ACETATO (TPA) Y PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), también conocido comúnmente como acetato de tetradecanoilforbol, acetato de tetradecanoilforbol o forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), es un diéster de forbol de origen vegetal (Figura 16).

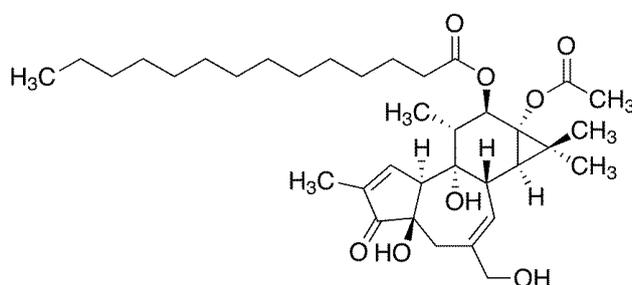


Figura 16: Estructura molecular del 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA/PMA).

Se sabe que este compuesto actúa mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC) y su cascada de señalización, uniéndose directamente a sus dominios C1 [378], imitando la función del diacilglicerol (DAG), ligando endógeno de PKC [379].

La familia PKC está compuesta por nueve genes que codifican diez isoenzimas que cumplen diferentes funciones biológicas, están reguladas de manera diferente y se clasifican como clásicas/convencionales, novedosas o atípicas de acuerdo con la naturaleza de sus dominios reguladores [3–9] (Figura 17). Las isoenzimas convencionales (α , β I, β II y γ) poseen dominios en tándem C1A y C1B que se unen a DAG o a éster de forbol y un dominio C2 que se une al segundo mensajero Ca^{2+} . Tras la interacción de PKC con DAG, éster de forbol o Ca^{2+} , la quinasa se activa y se transloca a la membrana adquiriendo su capacidad de fosforilar [380]. Las isoenzimas nóveles (δ , ϵ , θ , η) también contienen dos dominios C1 en tándem que se unen a DAG o ésteres de forbol pero poseen un nuevo dominio C2 que no une Ca^{2+} y no sirve como un módulo de unión a la membrana. Para compensar la falta del dominio C2 en el reclutamiento hacia la membrana, el dominio C1B de las isoenzimas novedosas tiene una afinidad 100 veces mayor por el DAG en comparación con el dominio C1B de las PKC convencionales [381, 382]. Las isoenzimas atípicas (ζ , ι / λ) no responden ni a DAG ni a Ca^{2+} ; más bien, poseen un único dominio C1 atípico que retiene la capacidad de unirse a fosfolípidos aniónicos y un dominio PB1 que media las interacciones proteína-proteína.

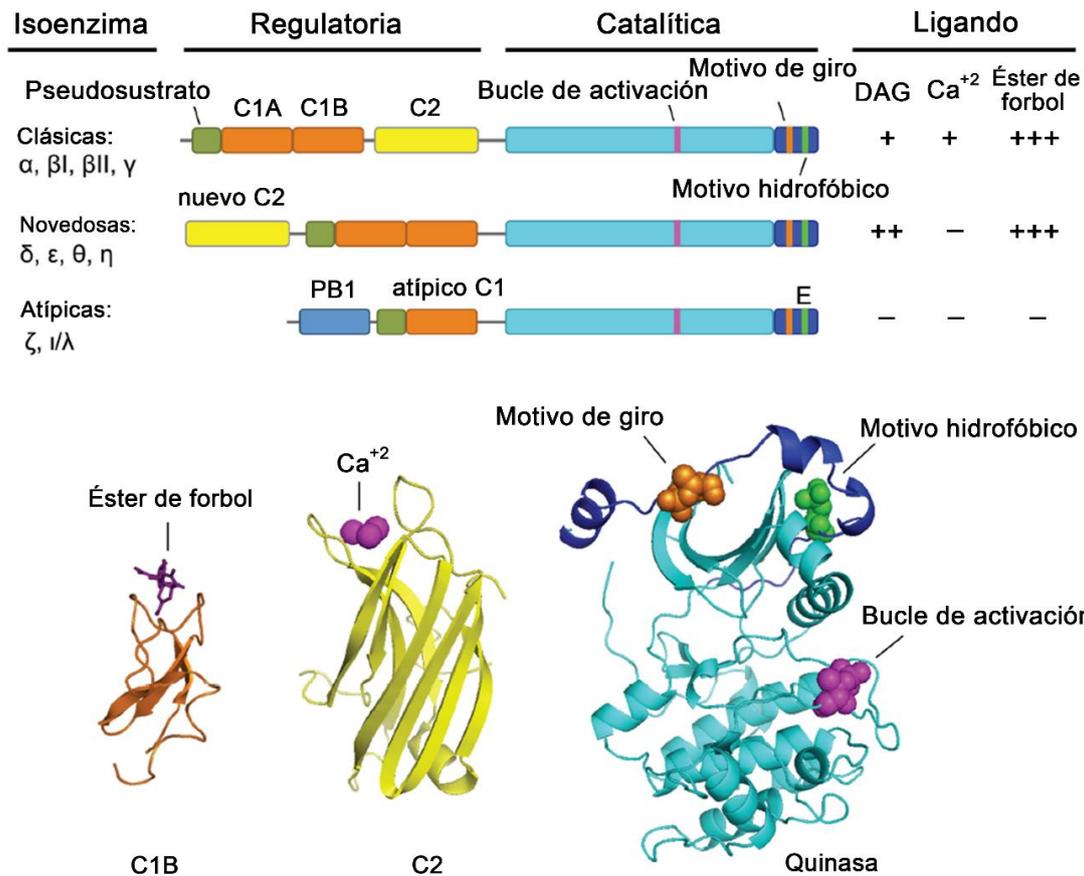


Figura 17: Estructura y ligandos de las isoenzimas de PKC. Estructura del dominio de los miembros de la familia PKC, que muestra el segmento de pseudosustrato autoinhibidor que se une a la quinasa como un sustrato real, pero no posee el aminoácido a ser fosforilado y por lo tanto actúan como inhibidores de la actividad enzimática (verde), dominios C1 (naranja), dominio C2 (amarillo), núcleo de la quinasa (cian) y extremo C-terminal (azul oscuro); el bucle de activación (rosa), el motivo de giro (naranja) y el motivo hidrofóbico (amarillo). Se muestran los ligandos que se unen a cada subfamilia, junto con sus afinidades relativas. También se muestran las estructuras cristalinas de los dominios C1B, C2 y quinasa. Imagen modificada de [14].

La generación del DAG (Figura 18), ocurre cuando la fosfolipasa C (PLC), estimulada por receptores acoplados a proteína G, hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) de la membrana plasmática a DAG y a trifosfato de inositol (IP3). El IP3 se une al receptor IP3 (IP3R) en el retículo endoplásmico (RE), liberando Ca²⁺. DAG y Ca²⁺ reclutan proteína quinasa C convencional (PKC) a la membrana plasmática (a través de sus dominios C1 y C2, respectivamente) y

la activan. La liberación de Ca^{2+} también conduce a la producción de DAG en el Golgi [4].

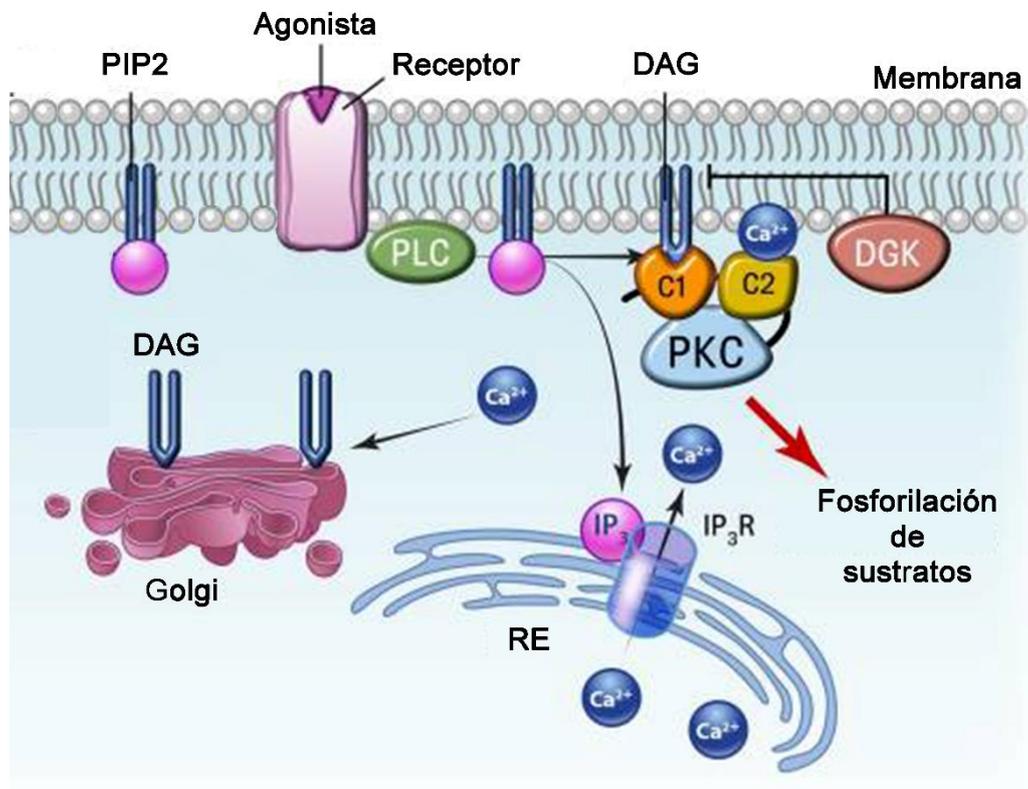


Figura 18. Diagrama de la síntesis del DAG. La estimulación del agonista activa los receptores de la superficie celular como los receptores de tirosina quinasa o los receptores acoplados a la proteína G, que activan la fosfolipasa C (PLC). El cual actúan sobre el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para producir diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). IP3 se une al receptor IP3 (IP3R) en el retículo endoplásmico (ER), liberando Ca^{2+} . DAG y Ca^{2+} reclutan la proteína quinasa C (PKC) convencional a la membrana plasmática (a través de sus dominios C1 y C2, respectivamente) y la activan. La liberación de Ca^{2+} también conduce a la producción de DAG en el Golgi. La diacilglicerol quinasa (DGK) suprime la señalización mediada por DAG al convertir DAG en ácido fosfatídico (PA). Imagen modificada de [4].

Debido a su capacidad de ser un potente activador de esta quinasa, el TPA es ampliamente utilizado para estudiar PKC y las vías relacionadas con ella [383, 384]. La vía de PKC activa cascadas de fosforilación que dan como resultado una red de señalización que participa en la regulación de la proliferación, diferenciación, mitogénesis, apoptosis y estructura/función del citoesqueleto [385-391]. Además, varios estudios han implicado a PKC en la fisiopatología de

diversos tipos de enfermedades cancerosas, observándose una mayor expresión de PKC en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama [392], pulmón [393], cerebro [394], ovarios [395], vejiga [396], riñón [397] y el sistema gastrointestinal [398].

A pesar de que la expresión anormal de PKC es una característica común de la neoplasia, la relación entre la expresión alterada de PKC y el proceso de transformación o la progresión de la enfermedad no están claras. Cuando los inhibidores de PKC se empezaron a utilizar en ensayos clínicos, el resultado fue no solo que no funcionaban como medicamentos contra el cáncer, sino que en algunos casos, los inhibidores de PKC empeoraban el resultado del paciente [399]. Además, no hay evidencias de que mutaciones en los genes regulados por PKC conduzcan a la activación de protooncogenes o a la inducción de la transformación celular. Sin embargo, debido a la importancia de PKC en el mantenimiento de los mecanismos homeostáticos celulares, parece posible que una desregulación de PKC contribuya a la promoción del tumor al inducir la expresión errónea de los protooncogenes y alterar las vías de señalización que controlan las células.

5.1. El TPA en cáncer

Comúnmente, el TPA se emplea como un agente promotor de tumores para la carcinogénesis de la piel en roedores [400] y como agente para inducir inflamación cutánea en animales de experimentación [401, 402]. La respuesta inflamatoria producida por TPA se la asocia a un aumento transitorio en la producción de prostaglandinas [403, 404].

El TPA estimula una variedad de funciones celulares en las células cancerosas, incluida la motilidad celular a través de la activación de PKC en varias células cancerosas. El TPA en células de glioma GBM8401 y en células de cáncer de mama, aumentó la invasión celular incrementando tanto la motilidad celular como la migración, a través de la activación de la expresión del gen MMP-9, que codifica para una metaloproteasa involucrada en la degradación de la matriz extracelular, a través de la activación de la vía $PKC\alpha \rightarrow ERK \rightarrow NF-\kappa B$ [405-407]. En cáncer de mama, TPA aumentó la migración celular asociada con las vías de $PKC\delta$ y Wnt-1, lo que condujo a la activación de $STAT3\alpha$, la

inactivación de GSK3 β , el aumento de β -catenina y el aumento de la expresión de fascina-1; esta última regula las estructuras del citoesqueleto para el mantenimiento de la adhesión celular, la coordinación de la motilidad y la invasión [408]. En la línea celular de melanoma A375, TPA activó la ciclooxigenasa COX-2 lo que aumentó la migración celular [409]. En células de hígado de rata, TPA estimuló la migración celular por medio de la activación del receptor de ácido lisofosfatídico (LPA) [410].

Sin embargo, la función de TPA es controvertida porque también se ha observado una disminución en la capacidad de proliferación celular en las células de linfoma tratadas con TPA en comparación con los controles [411]. La actividad de TPA como agente diferenciador de células hematopoyéticas se ha estudiado en líneas celulares de leucemia HL60, U937, K562 y NB4, células de leucemias mieloides agudas humanas y células madre hematopoyéticas normales [412-417]. Se cree que estos efectos de TPA en las células HL60, en parte, son debidos a la activación de la proteína quinasa C β [418, 419]. En estas células, el TPA induce alteraciones fenotípicas en la morfología, el inmunofenotipo y la función, que son características de la maduración celular a lo largo de distintas vías hematopoyéticas. En 1998 en China se realizó un ensayo piloto en pacientes con leucemia mieloide y se observó la reducción de blastos leucémicos (células tumorales de la leucemia que no siguen el proceso de maduración normal). En este ensayo los pacientes recibieron altas dosis de TPA en combinación con citarabina o vitamina D3 [420]. Luego de este antecedente, pacientes fueron tratados únicamente con TPA como una droga terapéutica llegando a la fase I en pacientes con leucemia mieloide. Los resultados evidenciaron diversos efectos secundarios como dolor muscular, fatiga y fiebre luego de las 4 h de administración. Se observó la reducción tumoral en solo un paciente [421, 422]. Análisis de muestras pertenecientes a estos pacientes, revelaron que TPA indujo apoptosis o diferenciación celular y se demostró que la citotoxicidad observada inducida por TPA estuvo asociada con la modulación de la vía de señalización de ERK [423]. La regulación diferencial de la expresión de c-myc, c-max y mxi1 también se ha informado en células de leucemia que experimentan diferenciación inducida por TPA [424]. En cambio, en células de cáncer de colon el TPA bloqueó la diferenciación celular evitando la acumulación de marcadores de diferenciación e indujo la pérdida de la integridad de las

uniones estrechas (“tight junctions”), efectos mediados por la activación de la PKC [425].

TPA también se ha administrado en pacientes para atenuar la leucopenia (nivel bajo de glóbulos blancos) inducida por quimioterapia [426]. Estos resultados, aunque preliminares, sugirieron cierta eficacia terapéutica de TPA en pacientes.

Estudios recientes en cáncer de hígado, TPA tuvo un efecto antitumoral inhibiendo la vía YAP a través de AMOT, lo cual indujo un aumento de las caspasas 3/7 [427]. Dependiendo del contexto celular, el TPA puede causar la progresión o la detención del ciclo celular al inducir la ciclina D1 y p21 a través de la vía MEK / ERK [428-431]. En líneas celulares de cáncer de mama, TPA puede iniciar la senescencia celular induciendo la detención del ciclo celular o fomentando la geroconversión (que es la conversión de la detención del ciclo celular reversible a senescencia irreversible) o ambas [432]. Por lo tanto, pueden ocurrir diferentes efectos después de la exposición al TPA en diferentes tipos de células.

En la Tabla 4, se resume estos y otros efectos de TPA en distintos tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	Efectos del TPA	Proteínas involucradas	Vías de señalización involucradas	Citas
Glioblastoma	Aumento de la invasión celular por aumento de la motilidad y la migración celular.	MMP-9 (metalopeptidasa 9 de matriz). Función: degradación de la matriz extracelular/metástasis.	PKC α -->ERK-->NF-kB	[413]
Cáncer de mama	Aumento de la migración celular.	FSCN1 (fascina-1). Función: estructura del citoesqueleto/adhesión/motilidad.	PKC δ --> STAT3 α --> β -catenina y PKC δ --> GSK3 β --> Wnt1 --> β -catenina	[415]
		COX-2 (ciclooxygenasa 2). Función: síntesis de prostaglandinas.	-	[417]
Melanoma	Resistencia a células NK ("natural killer") y LAK ("lymphokine-activated killer"). Disminución del crecimiento y diferenciación celular.	ICAM-1 (molécula de adhesión celular); VNR (receptor de vitronectina); colágeno IV Función: adhesión celular.	-	[433]
		Bcl-2 ("B-cell lymphoma 2") Función: proapoptótica/regulación de la vía de apoptosis intrínseca.	-	[26]
Linfoma	Disminución de la proliferación celular.	-	-	[434]
Neuroblastoma		noradrenalina Función: actúa como hormona neurotransmisor.	-	[435]
Leucemia	Diferenciación de células hematopoyéticas: cambios en la morfología, inmunofenotipo y función.	-	-	[419-421, 424-426]
		-	PKC β	[427, 428]
		c-myc, c-max ("myc-associated factor X") y mx11 ("MAX-interacting protein 1") Función: protooncogenes controla proliferación	-	[431]
Leucemia mieloide	Reducción de la leucopenia.	-	-	[430]
Cáncer de colon	Bloqueo de la diferenciación celular, pérdida de la integridad de las uniones estrechas.	-	PKC	[432]
	-	MUC2 (mucina 2) Función: protección de la superficie de los tejidos epiteliales.	Ras-->ERK-->NFkB	[436]

	Aumento de la diferenciación celular y sensibilidad al fármaco doxorubicina usado para quimioterapia.	GP-170 (Glucoproteína-P 1) Función: transportador de sustratos. Responsable de la disminución de la acumulación de fármacos en células resistentes.	-	[437]
--	---	---	---	-------

Cáncer de hígado	Rol anti-tumorogénico.	YAP ("Yes-associated protein") Función: activador transcripcional de oncogenes.	AMOT	[438]
Cáncer de mama	Inicio de la senescencia celular.	-	-	[439]
	Aumento de la metástasis.	MMP-9	-	[22]
Carcinoma renal	Cambios en la morfología celular, no modificó la proliferación celular.	-	ERK	[440]
Cáncer de pulmón	Aumento de la expresión de marcadores de diferenciación.	-	-	[441]
	-	COX-2	Ras, Raf-1; ERK; NF-κB	[442]

Tabla 4: Resumen de los efectos de TPA en distintos tipos de cáncer, proteínas y vías de señalización involucradas. (-) Indica que no hay información. El color verde representa aumento de la expresión y el color rojo disminución de la expresión.

5.2. TPA y la producción de ROS

Como TPA es un agente ampliamente utilizado como promotor de tumores, su participación en el estrés oxidativo durante la promoción del tumor ha sido ampliamente estudiado. Hay varios estudios que demuestran la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por TPA en células fagocíticas. TPA indujo la liberación de ROS en leucocitos polimorfonucleares [443-445], macrófagos peritoneales [446-452] y neutrófilos [453-457]. Además, las ROS producidas en los distintos tipos de células mencionadas anteriormente indujeron daño en ADN aislado [444, 458, 459], y en el ADN de células fagocíticas [460-462] y de células no fagocíticas circundantes, incluyendo los queratinocitos [463], células tumorales [455], células de fibroblastos NIH-3T3 [464] y células de plasmocitoma [465]. Células HeLa [466] y células HL60 [467] también presentaron oxidación del ADN al estar expuestas a TPA. Los estudios *in vivo* e *in vitro* en la epidermis de ratones tratados con TPA, también mostraron aumentos en la producción de ROS [468-471] como daño en el ADN por un aumento en la oxidación de las bases del ADN [472-476]. También demostraron

que TPA provoca roturas en una sola cadena del ADN (“single strand breaks”, SSB) [477]. En células de leucemia mieloide TPA indujo la producción de ROS a través de la vía de PKC β II [478]. En células epiteliales está poco estudiado la inducción de ROS por TPA [479].

Aunque los estudios anteriores demostraron que TPA induce daño en el ADN en las células y condujo a la generación de ROS, no se sabe si estas propiedades fueron mediadas por ROS o por algún otro mecanismo.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

- 1- El éster de forbol TPA estimula la expresión de *PEIG-1/GPRC5A* por diversas vías relacionadas con la quinasa PKC.
- 2- TPA induce ROS y estas modulan la expresión de *PEIG-1/GPRC5A*.
- 3- *PEIG-1/GPRC5A* participa en la modulación de ROS, de IL-1 β y de la apoptosis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos de regulación de la expresión del gen “phorbol ester induced gene 1” (símbolo *PEIG-1*), también denominado “G protein-coupled receptor class C group 5 member A” (símbolo *GPRC5A*), inducible por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y su participación en la apoptosis celular y en el estrés oxidativo (generación de especies reactivas de oxígeno, “reactive oxygen species”, ROS), en células T84 de cáncer de colon. La desregulación de este gen se asocia a diferentes tipos de cáncer en humanos, como también a otras enfermedades.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar las principales vías de transducción de señales involucradas en la regulación de la expresión de *PEIG-1/GPRC5A* por TPA.
- Estudiar si TPA modula la generación de ROS celular y mitocondrial y el posible rol de las ROS en la modulación de la expresión de *PEIG-1/GPRC5A*.
- Estudiar el rol de *PEIG-1/GPRC5A* en los niveles de IL-1 β , de ROS y sus efectos en la apoptosis celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

A continuación, se menciona el origen de los reactivos utilizados en este trabajo de tesis. IL-1 β (Cat. N° I9401), antagonista del receptor de IL-1 (IL1RN) (Cat. N° SRP3327), dimetil sulfóxido (DMSO), cóctel de inhibidores de proteasas (Cat. N° P2714) y rotenona (Cat. N° R8875) son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Cat. N° HY-18739) y los inhibidores GSK-690693 (Cat. N° HY-10249), SP600125 (Cat. N° HY-12041), Gö 6983 (Cat. N° HY-13689), GSK 650394 (Cat. N° HY-15192), H-89 (Cat. N° HY-15979) y GSK 2795039 (Cat. N° HY-12298), fueron adquiridos en MedChem Express (MCE, Monmouth Junction, NJ). Los inhibidores U0126 (Cat. N° U-400) y SB203560 (Cat. N° S-370) son de Alomone Labs (Jerusalen, Israel). El inhibidor BMS-345541 (Cat. N° 401480) es de Calbiochem (San Diego, CA). El reactivo Anexina V-FITC es de Immunotools (Cat. N° 31490013SP). “EvaGreen” (Cat. N° 31000) es de Biotium Inc. (Hayward, CA). Los cebadores utilizados (Tabla 1) son de Eurofins MWG TecnoLab (Luxemburgo). Los vectores de la técnica ARNg CRISPR/Cas9 GPRC5A (Cat. N° K0900705) son de Applied Biological Materials (ABM, Canada). MitoSOX (Molecular Probes Cat. N° M36008), diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (Molecular Probes Cat. N° D399) y ROX (glycine conjugate of 5-carboxy-X-rhodamine, succinimidyl ester, Invitrogen Cat. N° 12223-012) se adquirieron de Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA). 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Cat. N° 559925) se adquirió en BD Pharmingen (USA). Taq ADN polimerasa Pegasus (Cat. N° EA00101, PBL Productos Bio-Lógicos) se adquirió en Embiotec (Bs. As. Argentina). NAC N-acetilcisteína (NAC) (Cat. N° 616-91-1) es de PharmaZell, Chennai und Vizag, India. Tetrametilrodamina, éster etílico, perclorato (TMRE) (Cat. N° T669, Molecular Probes, USA). La enzima de restricción KpnI (Cat. N° R0142S) fue adquirida en BioLabs, New England). Los reactivos para la medición de caspasas son de Biomol (Hamburg, Germany): IETD-AFC (Cat. N° ALX-260-110), LEHD-AFC (Cat. N° P-445), AFC-DEVD (Cat. N° P-409), Ac-IETD-CHO (Cat. N° P-430), Ac-DEVD-CHO (Cat. N° P-410). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Anticuerpos: Primarios: Anti-RAIG1 (Cat. N° 5657, Cell Signaling Technology), anti-actina (Cat. N° A2066, Sigma-Aldrich), anti-I κ B- α mouse (Cat. N° sc-1643, Santa Cruz Biotechnology), anti-p38 (Cat.

N° sc-7973, Santa Cruz Biotechnology), anti- p-JNK (Cat. N° sc-271133, Santa Cruz Biotechnology). Secundarios: Goat Anti-rabbit IgG-HRP (Cat. N° 554021, BD Pharmingen), Goat Anti-mouse IgG-HRP, Goat Anti-rabbit IgG-rhodamine (Cat. N° AP187R, Sigma-Aldrich), Anti.rabbit IgG-FITC (Sigma-Aldrich).

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Células T84

Las células T84 (CCL-248) corresponden a líneas celulares provenientes de carcinoma de colon humano, adquiridas en ATCC, Rockville, MD. Todos los experimentos fueron realizados con esta línea celular, a menos que se indique lo contrario.

2.2. Células Caco-2

Esta línea celular fue obtenida de ATCC (HTB-37) (ATCC, Rockville, MD) y también provienen de células epiteliales de carcinoma de colon humano. Se utilizaron para corroborar los resultados obtenidos con células T84.

2.3. Condiciones de cultivo

Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio de cultivo DMEM-F12 1:1 (Life Technologies, Gibco-BRL, Rockville, MD) suplementado con 5 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios SA, Bs As, Argentina), 10 U/ml penicilina, 10 µg/ml estreptomina (Life Technologies, Gibco-BRL, Rockville, MD), como se describió anteriormente [274]. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO₂. Para cada experimento, las células fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/cm² en DMEM-F12 suplementado con 5 % v/v de SFB. Antes de cada tratamiento, las células fueron cultivadas en medio libre de suero durante 24 h.

3. CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

3.1. Descongelamiento

Se siguió el método descrito por Maniatis y col. [480], como se describió anteriormente [481]. Para descongelar las células mantenidas en nitrógeno

líquido, se retiró del tanque un criotubo y se lo sumergió en un baño con agua a 37°C (con las medidas de seguridad correspondientes). Se agitó constantemente cuidando que la tapa no tome contacto con el agua (dejándola semi-abierta para que descomprima cualquier resto de N₂ líquido y no explote). Inmediatamente después del descongelamiento, las células (1-4 millones) se pasaron a una botella de 75 cm² con 20 ml de medio de cultivo.

3.2. Congelamiento

Nuevamente se siguió el método descrito por Maniatis y col. [480] y utilizado previamente [481]. Brevemente, luego del descongelamiento y replicación de la línea celular, con el fin de preservar sus características originales, se procedió a congelar parte de las células obtenidas. Se congelaron entre 1 y 4 x 10⁶ células/ml/criotubo. Las células crecidas hasta un 60-70 % de confluencia se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,25 % p/v tripsina/ 0,02 % p/v EDTA en "Phosphate-buffered saline" (PBS) 1X) durante aproximadamente 10 min en estufa de cultivo hasta que las células se levantaron de la placa de cultivo. Luego se inactivó la tripsina con 5-10 ml de medio de cultivo suplementado con SFB 5 % v/v. La mezcla fue agitada suavemente hasta obtener una suspensión homogénea de células, se retiró una alícuota y se preparó una dilución 1:1 con solución de tinción vital "azul de trypan" para su posterior conteo en cámara de Neubauer. Paralelamente al conteo, las células disgregadas fueron centrifugadas a 600 x g durante 10 min; se retiró el medio sobrenadante, se resuspendieron en solución A de congelamiento (DMEM-F12 20 % v/v y SFB 80 % v/v) y se pusieron en hielo. Luego se agregó lentamente y en agitación suave la solución B de congelamiento (DMEM-F12 80 % v/v y DMSO 20 % v/v) y se las dejó en hielo durante 15 min. Posteriormente se almacenaron a -80°C durante 24 h, dentro de un recipiente de material aislante del calor (telgopor) para disminuir la pendiente de enfriamiento. Finalmente, se las retiró de -80°C y se las pasó a -196°C, en un tanque con nitrógeno líquido.

4. TRATAMIENTOS

En todos los casos los niveles de expresión de *GPRC5A* se normalizaron con respecto a la expresión del gen *TBP* ("TATA box binding protein"). El valor promedio de la expresión de *GPRC5A* en las células T84 sin tratar (controles)

fue tomada como 1, y el resto de los niveles de expresión fueron relativizados a este valor.

4.1. Curva de concentración de TPA

Transcurridas las 24 h en medio libre de suero, se incubaron las células con concentraciones crecientes de TPA (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 6,6; 12,5; 25; 50; 75; 100 y 200 ng/ml) durante 4 h, en DMEM-F12 libre de suero a 37°C. Transcurrido este tiempo se extrajo el ARNm total como se indica en la sección *Extracción de ARN total*, y se cuantificó el nivel de expresión de *GPRC5A* como se indica en la sección *Cuantificación del nivel de expresión de GPRC5A por PCR cuantitativa en tiempo real*.

4.2. Curva de tiempo con TPA

Transcurridas las 24 h en medio libre de suero, se incubaron las células con 100 ng/ml de TPA durante diversos tiempos (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h), en DMEM-F12 libre de suero a 37°C. Posteriormente se cuantificó el nivel de expresión de *GPRC5A* como ya se indicó.

4.3. Inhibición de vías señalización

Se incubaron las células T84 durante 24 h en DMEM-F12 libre de suero y luego durante 4 h con inhibidores de distintas vías de señalización: MAPK1/p38 (SB203560) 10 µM [482], MEK1/2 (U0126) 10 µM [483], JNK (SP600125) 10 µM [482], NF-κB (IKK III BMS345541) 10 µM [484], AKT (GSK690693) 10 µM [485], PKC (Gö 6983) 10 µM [486], PKA (H-89) 10 µM [487] y SGK1 (GSK650394) 0,1; 1; 10; 20 µM. Luego de estos tratamientos se realizaron mediciones por RT-PCR en tiempo real y western blot, como se indica en las secciones: *Cuantificación del nivel de expresión de GPRC5A por PCR cuantitativa en tiempo real* y *Análisis de proteínas mediante western blots*.

4.4. Bloqueo del calcio intracelular con BAPTA-AM

Luego de 24 h en medio sin suero, se incubaron las células T84 durante 4 h en presencia del quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA-AM (1,2-bis(o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético) 150 µM, una concentración que

bloquea significativamente el Ca^{2+} intracelular en esta línea celular [488]. Las células al mismo tiempo fueron tratadas con y sin TPA (100 ng/ml, 162 nM). Posteriormente, se midió la expresión del ARNm de *GPRC5A* por real time PCR, como se indicó anteriormente.

4.5. Tratamiento con IL-1 β , IL1RN y Cl $^{-}$

Transcurridas las 24 h en medio sin suero, se incubaron por separado las células T84 durante 4 h en presencia de IL-1 β (5 ng/ml), IL1RN (10 ng/ml) y con distintas concentraciones de Cl $^{-}$ (5 y 75 mM), con o sin TPA. En las incubaciones con distintas concentraciones de Cl $^{-}$ para establecer un rápido equilibrio entre la concentración intracelular y extracelular de este ion, independientemente de la actividad de los canales de Cl $^{-}$, se utilizó una estrategia de doble ionóforo, que mantiene además fijo el pH intracelular, el volumen celular, el potencial de membrana celular, el potencial de membrana mitocondrial y la concentración de K $^{+}$ en 140 mM [276, 489]. Primero las células fueron lavadas con Hank's-gluconato (Tabla 5), para remover el Cl $^{-}$ extracelular remanente. Luego las células fueron incubadas con 5 y 75 mM de Cl $^{-}$ extracelular por 4 h, con o sin TPA (100 ng/ml). Las diferentes concentraciones de Cl $^{-}$ fueron obtenidas combinando dos soluciones amortiguadoras de alta concentración de K $^{+}$ (solución de KCl y solución de KNO $_3$), conteniendo los ionóforos nigericina (5 μ M, intercambiador K $^{+}$ /H $^{+}$) y tributiltin (10 μ M, intercambiador OH $^{-}$ /Cl $^{-}$) (Tabla 6).

Composición (mM)	Hank's-Cl	Hank's-gluconato	Solución KCl	Solución KNO $_3$
NaCl	136,9	0	0	0
KCl	5,4	5,4	140	0
KNO $_3$	0	0	0	140
CaCl $_2$	1,3	0	0	0
Na-gluconato	0	136,9	0	0
Ca-gluconato	0	1,3	1,3	1,3
K-gluconate	0	5,4	0	5,4
NaH $_2$ PO $_4$	3,7	3,7	3,7	3,7
KH $_2$ PO $_4$	0,4	0,4	0,4	0,4
NaHCO $_3$	4,2	4,2	4,2	4,2
MgSO $_4$	0,7	0,7	0,7	0,7
D-glucosa	5,5	5,5	5,5	5,5

HEPES	10	10	10	10
-------	----	----	----	----

Tabla 5: Composición de soluciones amortiguadoras utilizadas.

Curva Cloruro	Solución KCl (ml)	Solución KNO ₃ (ml)	Vf (ml)	Tributiltin (10 µM)	Nigericina (5 µM)
5 mM	0,179	4,821	5	10 µl	5 µl
75 mM	2,679	2,321	5	10 µl	5 µl

Tabla 6: Composición de las soluciones de Cl⁻ utilizadas.

4.6. Inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se incubaron las células T84 durante 24 h en DMEM-F12 libre de suero con dos bloqueadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) por separado: inhibidor de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) citoplasmática (GSK2795039, 10 µM [287]) y n-acetil-cisteína (NAC, 5 mM, un antioxidante [305]). Las incubaciones se realizaron durante 4 h a 37°C para la posterior medición de la expresión del ARNm de GPRC5A.

5. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo de Chomczynski y col. [490], con algunas modificaciones. Las células fueron lavadas con 2 ml PBS 1X frío y lisadas con 1 ml de la solución de extracción (tiocianato de guanidinio 1,9 M, citrato de sodio 10 mM, acetato de sodio 0,1 M, sarcosyl 0,25 % p/v, fenol 50 % v/v (saturado en H₂O), beta-mercaptoetanol 50 mM) por cada 10 cm² de superficie de la placa donde las células fueron sembradas. Para separar el ARN del ADN y las proteínas, por cada 1 ml de reactivo se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente en un vórtex. Se mantuvo a temperatura ambiente 15 min para facilitar la separación de fases, y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. Luego se extrajo la fase superior que corresponde a la fase acuosa, que es la que contiene el ARN total, con el cuidado de no tocar la interfase, que contiene el ADN genómico y proteínas (entre ellas ARNasas), y se transfirió a un tubo limpio. El ARN fue precipitado de la fase acuosa agregando 500 µl de isopropanol por ml de solución de extracción utilizada y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min, a 4°C. El precipitado fue lavado tres veces con

etanol frío 75 % (v/v en H₂O) para eliminar los restos de tiocianato de guanidinio y se dejó secar al aire, con los tubos destapados. Finalmente, el precipitado obtenido se disolvió en agua libre de ribonucleasas (tratada 24 h con 0,1 % de dietilpircarbonato, DEPC y autoclavada) a razón de 20 µl por ml de solución de extracción y se guardó a -80°C. La cuantificación del ARN purificado se realizó utilizando un NanoDrop 1000 V3.8 (NanoDrop Technologies, Inc.). Para verificar la pureza del ARN se usaron las relaciones de absorbancia 260/230 nm (presencia de sales), considerándose aceptable una relación mayor a 2,0 y 260/280 nm (presencia de proteínas), cuyo cociente fue considerado aceptable a partir de 1,8. El ARN total así obtenido fue utilizado para las reacciones de RT-PCR en tiempo real. La calidad general de las muestras de ARN fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa 1 % p/v preparado en solución amortiguadora (MOPS (ácido 3[Nmorfolino]propanosulfónico) 0,1 M, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5 mM, pH 7,0) formaldehído 15 % v/v y con bromuro de etidio [480]. Previo a la electroforesis las muestras de ARN (1-3 µg) se desnaturalizaron a 65-70°C durante 5-15 min. La electroforesis se realizó a 80 Volts (V), durante 30 min. Luego el gel se visualizó en un transiluminador UV con un documentador de geles (UVP, Inc. Upland, CA, E.U.A.) y se analizaron las bandas 28S y 18S ARNr para corroborar la integridad del ARN. Una relación de 2:1 (28S: 18S) es una buena indicación de que el ARN no fue degradado.

6. RT-PCR EN TIEMPO REAL

6.1. Transcripción Reversa

Se realizó la reacción de retrotranscripción usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante, con unas pocas modificaciones [481]. Brevemente, se usó 2 µg de ARN libre de ADN, oligo(dT)₁₂ 10 µM y H₂O hasta completar un volumen final de 15 µl y se llevó a 65°C durante 5 min, luego los tubos se sumergieron rápidamente en hielo. Posteriormente, a dicha mezcla se le agregó 200 U de transcriptasa reversa de MMLV/mg de ARN, 40 U del inhibidor de ARNasas RNAsin (Promega, WI), dNTPs 10 µM, solución amortiguadora específica para esta reacción 20 % v/v y H₂O hasta un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción de RT se incubó a 37°C por 5 min y luego a 42°C durante 2 h; finalmente se agregó un paso de

70°C por 15 min. El ADN copia (ADNc) obtenido fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

6.2. Cuantificación del nivel de expresión de *GPRC5A* por PCR cuantitativa en tiempo real

Como método de cuantificación en las RT-PCR cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR), se utilizó el método de Ct (“cycle threshold”) comparativo ($\Delta\Delta Ct$) [491]. Es muy importante verificar que la eficiencia de amplificación, tanto del gen blanco como del control endógeno, sea cercana al 100 %, y que ambos genes estén dentro del mismo rango dinámico de medición.

Mediante el programa de NIH “Primer Blast” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se diseñaron cebadores para amplificar el gen *GPRC5A* (amplicones de ~ 100 pares de bases son óptimos para real-time PCR [492]), y se buscó el estándar interno adecuado para obtener la misma eficiencia de amplificación en el rango lineal de cuantificación. Para ello, comparamos tres genes distintos como estándares internos: *TBP*, *GAPDH* y *ARN 18s*, obteniéndose mayor similitud en la abundancia y eficiencia de amplificación con *TBP*, por lo que la expresión de *GPRC5A* se refirió a este último gen (Tabla 7). Para encontrar las condiciones adecuadas de amplificación se realizaron curvas de concentración de cebadores, $MgCl_2$ y muestra de ADNc.

Para la detección de la reacción de PCR se utilizó el colorante fluorescente “EvaGreen” y el colorante 6-carboxi-X-rodamina (ROX) 50 nM como referencia [493]. Para las distintas reacciones se agregaron $MgCl_2$ 2 mM, desoxinucleótidos trifosfatos 0,2 mM, 1 U de Taq ADN polimerasa Pegasus, solución amortiguadora específica para esta reacción 10 % v/v y los cebadores “forward” y “reverse” de la Tabla 7 (0,16 mM *GPRC5A* y 0,3 mM *TBP*) en un volumen final de reacción de 25 μ l. Para detectar los productos de amplificación en tiempo real, se utilizó un termociclador ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), con lector de fluorescencia ciclo a ciclo. Se calculó la concentración equivalente de cada gen mediante el método de $\Delta\Delta Ct$, con el programa provisto por el fabricante del termociclador.

Gen	Cebador "forward"	Cebador "reverse"	Pares de bases del producto
<i>GPRC5A</i>	5'-GCTGCTCACAAAGCAACGAA-3'	5'-ATAGAGCGTGTCCCCTGTCT-3'	154
<i>TBP</i>	5'-ACAGTGAATCTTGGTTGTAACCTGA-3'	5'-AAACCGCTTGGGATTATATTCG-3'	84

Tabla 7. Secuencias de los cebadores y longitud de sus productos.

6.3. Condiciones de amplificación por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en las siguientes condiciones: 95°C (5 min) y 40 ciclos de 95°C (30 seg), 58°C (30 seg), 72°C (30 seg). Al finalizar la PCR, 10 µl de cada mezcla de PCR fueron separados en geles de agarosa 3 % p/v preparados en solución amortiguadora TAE 1X con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV para confirmar el tamaño de los amplicones y verificar la inexistencia de dímeros de los cebadores, que interfieren sumando una señal inespecífica a los resultados [480].

7. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1 β MEDIANTE EL MÉTODO ELISA

Se midieron los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de los cultivos celulares de células T84 que expresan *GPRC5A* y *knock out* de *GPRC5A* tratadas con TPA. Como controles se usaron células sin tratar. Luego de la incubación correspondiente, se recolectó el sobrenadante de los medios de cultivo y se los concentró hasta un volumen de 250 µl mediante centrifugación a 3.500 x g durante 30 min a 4°C utilizando las unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra-15 (corte de 10 kDa, EMD Millipore, Billerica, MA). La IL-1 β se midió a partir de sobrenadantes de concentrado congelado utilizando el kit ELISA de IL-1 β humana (BD OptEIA™ - Kit ELISA de IL-1 β humana, BD Biosciences). Las mediciones se realizaron utilizando un lector de microplacas (modelo Benchmark, Bio-Rad, Hercules, CA). Esta metodología ya fue realizada anteriormente en nuestro laboratorio [275].

8. BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *GPRC5A* POR LA TÉCNICA DE CRISPR/Cas9

Las siglas CRISPR provienen de “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, es decir, Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, y Cas9 es una de las proteínas de la familia de las nucleasas que está asociada a CRISPR, por lo que su nombre proviene de “Crispr Asociated System” (es decir Sistema Asociado a CRISPR) [494].

La tecnología CRISPR/Cas9 de uso actual se basa en el sistema bacteriano CRISPR/Cas tipo II, que proporciona a las bacterias inmunidad adquirida frente a virus y plásmidos, dándoles protección ante elementos génicos extraños [495]. El sistema CRISPR/Cas de las bacterias funciona como un proceso de múltiples etapas. Primero se detectan pequeños fragmentos de ácidos nucleicos exógenos que provienen de la infección con fagos o plásmidos, y a continuación se incorporan en el genoma huésped entre secuencias de ADN repetidas en tándem de 30 a 34 pares de bases (pb) o LTRR (“long tandemly repeated repetitive”) interespaciadas por secuencias no repetidas de 35 a 39 pb [496]. Estas secuencias se transcriben a ARN, y junto con proteínas Cas del huésped, reconocen y destruyen o silencian mediante cortes a los ácidos nucleicos invasores que entran de nuevo en la bacteria, es decir, aparece una respuesta a modo de memoria inmune [497]. Este mecanismo de integración del ADN exógeno en el ADN huésped es una gran ventaja evolutiva puesto que la inmunidad adquirida debida a esta integración es transmitida a la descendencia [498]. El aspecto clave de este descubrimiento, ha sido su traslación a la ingeniería genética en eucariotas, ya que supone un mecanismo revolucionario de reconocimiento y escisión del ADN en sitios específicos del genoma combinando los fundamentos de las nucleasas y el reconocimiento específico de secuencias de ADN mediante pequeños oligonucleótidos de ARN (ARN guía).

La proteína Cas9 es una endonucleasa que forma un complejo riboproteico con dos ARNs de cadena sencilla no codificantes, ARNcr (ARN CRISPR) y ARNtracr (ARNcr trans-activador), sirviendo ARNcr como guía para asociarse por complementariedad de bases con secuencias diana de ADN y ARNtracr necesario para la interacción ADN-Cas9 [499], permitiendo que Cas9 genere una escisión de la doble hebra de ADN en un sitio específico. El doble ARN ARNtracr-ARNcr se rediseñó más tarde como una única molécula quimérica denominada ARN guía (ARNg) permitiendo la expresión simultánea junto con la proteína Cas9. Este ARNg mantiene dos características: una secuencia de unos 20

nucleótidos (nt) en el extremo 5' que determina el apareamiento de ADN con la secuencia diana y una secuencia de ARN en el extremo 3' que adopta una estructura secundaria determinada que se une a la proteína Cas9. La Cas9 tiene dos regiones, la región REC responsable del reconocimiento de ácidos nucleicos y la región NUC que contiene los dominios nucleasa HNH y RuvC [500], un dominio PI (PAM Interacting) que interactúa con PAM (del inglés Protospacer Adjacent Motif) y un dominio de calce (WED, Wedge) importante para el reconocimiento de la estructura secundaria del extremo 3' del ARNg, e interactúa también con el ADN anterior a la región PAM [501, 502]. El dominio HNH corta la hebra de DNA complementaria a la secuencia guía de ARNg (hebra de DNA diana), mientras que el dominio RuvC corta la hebra de DNA no diana (Figura 19).

El proceso por el cual la Cas9 genera el corte en la secuencia de ADN consta de varios pasos (Figura 20). El ARNg induce un cambio conformacional en la Cas9, permitiendo el reconocimiento del ADN [503]. El complejo de Cas9-ARNg

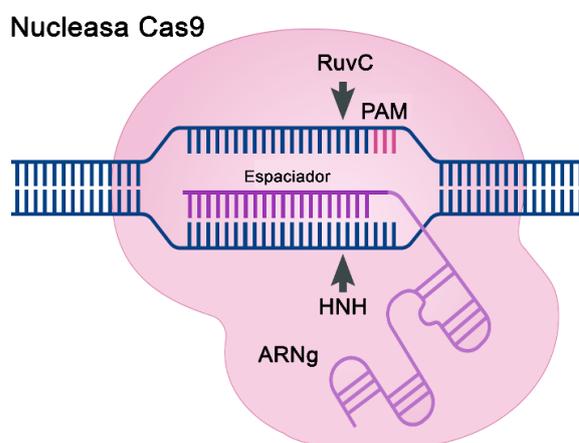


Figura 19: Las proteínas Cas9 se basan en la guía del ARNg (ARN guía) para su especificidad. En los sistemas CRISPR/Cas9, la endonucleasa Cas9 interactúa con el ARNg que le indica la secuencia diana de ADN, colocada cerca de una secuencia PAM (del inglés Protospacer Adjacent Motif), generando una ruptura de la doble cadena de ADN a través de los dos dominios de la nucleasa Cas9, RuvC y HNH. Figura modificada de [11].

se une a la secuencia PAM a través de su dominio PI, que inicia la separación de la hebra de ADN en la región próxima a PAM para facilitar la formación del complejo ARNg-ADN [502, 504]. Este complejo está cargado negativamente, por

lo que se inserta en una ranura cargada positivamente entre los lóbulos REC y NUC de Cas9 [505]. El complejo Cas9-ARNg continuará desenrollando el DNA sólo si existe una complementariedad suficiente entre la secuencia guía de ARNg y el ADN diana [503, 506, 507]. Esta interacción favorece además la separación de la doble hebra de ADN más allá de la región de inicio y la formación de un bucle-R [507-509]. Finalmente, el bucle-R completo provoca otro cambio conformacional en el dominio HNH, activando la actividad nucleasa de los dominios RuvC y HNH para inducir la escisión del ADN [503, 510]. Después de la escisión, Cas9 permanece unida al ADN diana escindido hasta que otros factores celulares desplazan la enzima para su reciclado [508].

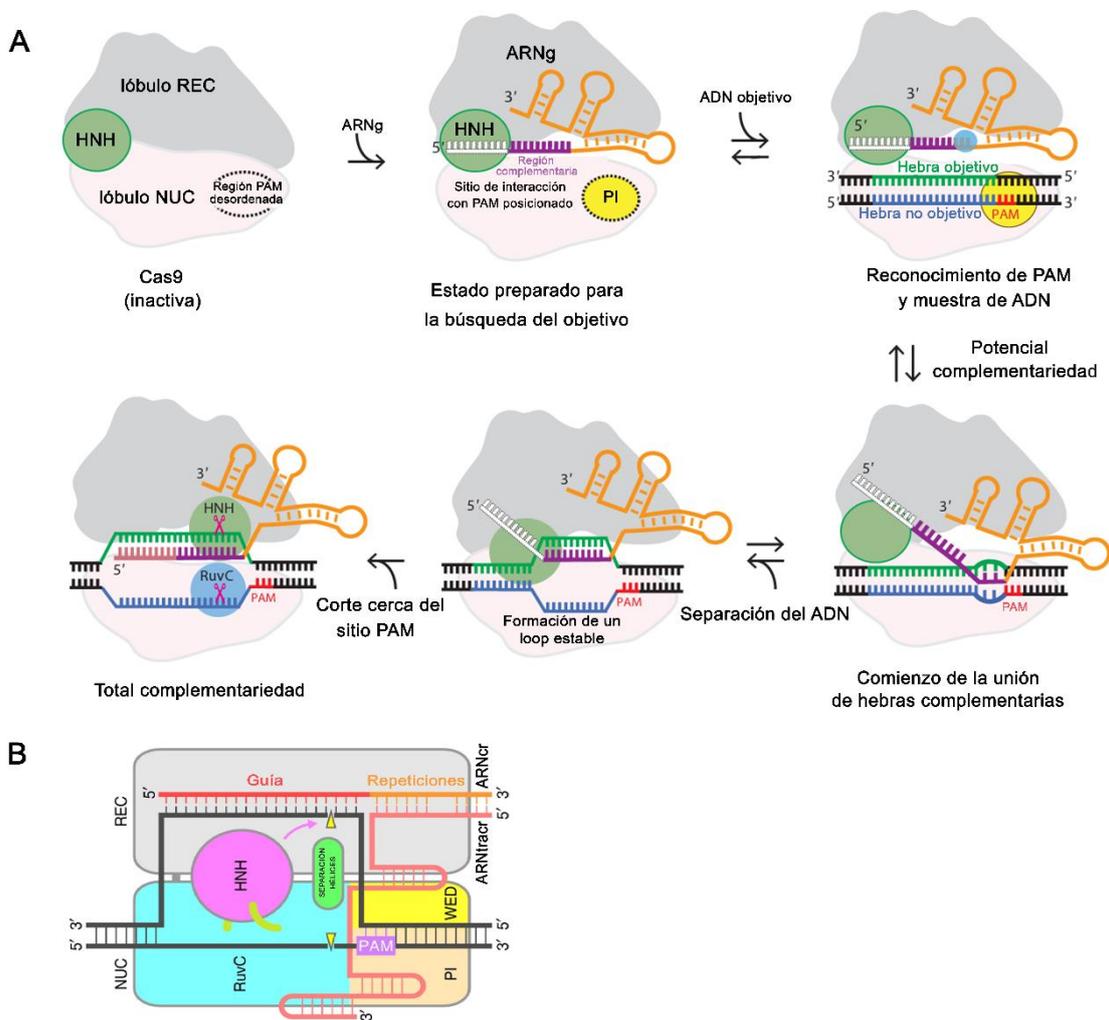


Figura 20: A: Etapas de la escisión de la Cas9 al ADN doble cadena guiada por el ARNg. Figura modificada de [1]. **B:** Complejo Cas9. Mecanismo de interferencia con el ADN objetivo. Los sitios de escisión están indicados por triángulos amarillos. Figura modificada de [12]

La escisión en la doble cadena de ADN (DSB, Double-Strand Break) [500], desencadena la reparación del ADN a través de mecanismos celulares intrínsecos, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ, Non Homologous End Joining) o la reparación dirigida por homología (HDR, Homology-Directed Repair) [511-513]. La reparación por medio del mecanismo NHEJ, resulta en la introducción de inserciones o deleciones aleatorias (InDels), produciendo la interrupción del marco de lectura de un gen o de los sitios de unión de factores de transcripción en promotores. El proceso resulta en el *knockout* del gen afectado [514-516]. El otro mecanismo de reparación es el HDR, el cual permite la introducción de nucleótidos específicos o largas inserciones. Para ello, es necesaria la introducción de una secuencia con los cambios que se quieren introducir, junto con el ARNg y la Cas9 (Figura 21).

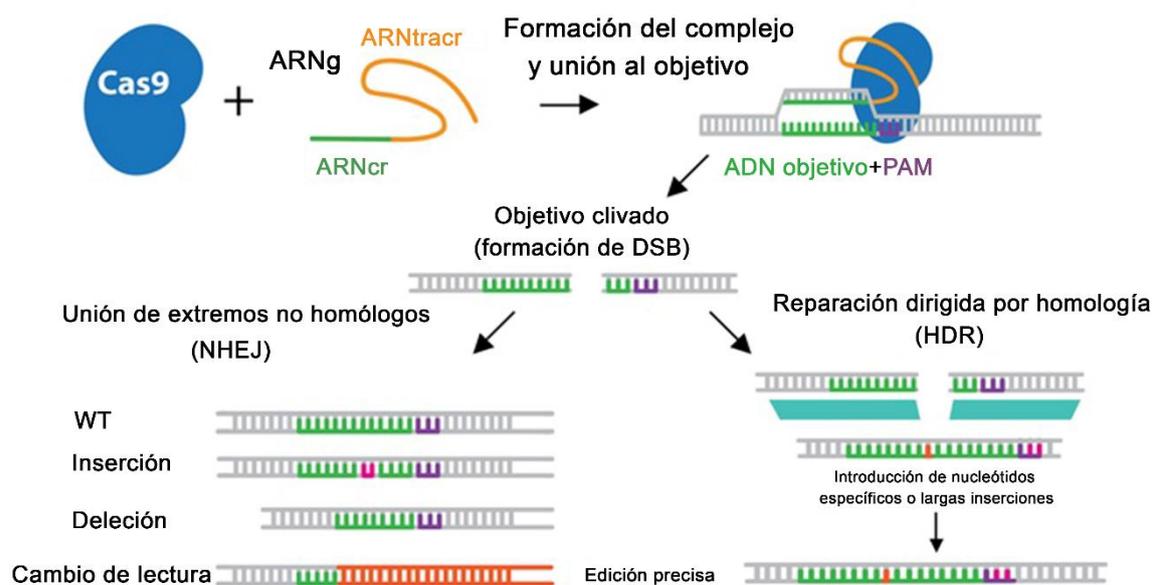


Figura 21: Unión de extremo no homólogo (NHEJ) versus reparación dirigida por homología (HDR): NHEJ repara naturalmente los cortes de doble cadena en la célula, un mecanismo que con frecuencia causa inserciones o deleciones en el ADN. Al introducir una plantilla de reparación de ADN, la célula puede reparar la ruptura por HDR, lo que lleva a una modificación precisa del ADN. Figura modificada de <https://www.addgene.org/crisprguide/>

De esta forma se creó un sistema sencillo de dos componentes (la proteína Cas9 y el ARNg) en el que se podía cambiar la secuencia del ARNg, para que la Cas9 pueda dirigirse a cualquier secuencia de ADN de interés [517]. La única

limitación del sistema es que el DNA diana debe poseer una pequeña secuencia que sigue inmediatamente 3' a la secuencia de complementariedad de ARNg y que se conoce con el nombre de PAM que es indispensable para que la proteína Cas9 corte la secuencia diana [518].

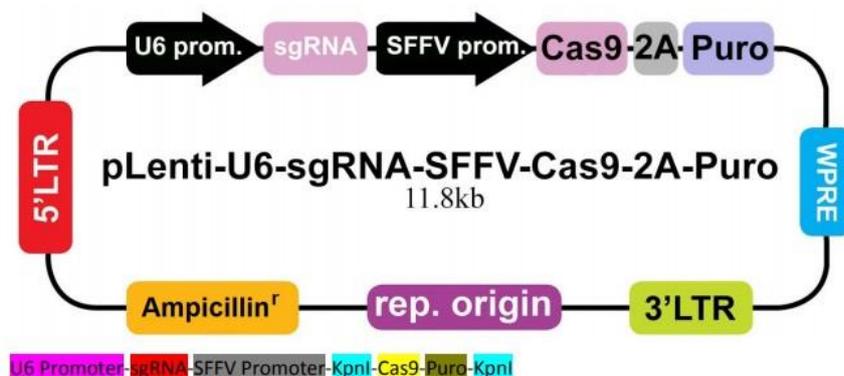
8.1. Preparación de bacterias competentes por “heat-shock”

Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5a (Novagen). Para hacerlas competentes se utilizó el protocolo de CaCl₂ descrito en el manual de Sambrook y col. (Sambrook J, 1989), con algunas modificaciones. Se picó una colonia de 2-3 mm de diámetro desde una placa fresca crecida por 16-20 h a 37°C y se transfirió a 100 ml de medio LB. Posteriormente se incubó con agitación constante durante aproximadamente 5 h a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,3-0,5 a 600 nm. Luego se mantuvieron las bacterias en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 3.200 x g (rotor A-4-81, centrífuga Eppendorf) durante 10 min, a 4°C. Se descartó el medio de cultivo y se resuspendió el pellet bacteriano en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M previamente enfriado en hielo. Posteriormente se centrifugó a 3.200 x g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M previamente enfriado por cada 50 ml de cultivo original. Se agregaron 140 µl de DMSO por 4 ml de células resuspendidas, se mezcló suavemente y se dejó reposar la suspensión en hielo por 15 min. Luego se agregaron 140 µl de DMSO adicionales, nuevamente se mezcló y se dejó la suspensión en hielo. Las suspensiones se fraccionaron en volúmenes de 100-200 µl, en tubos de 1,5 ml previamente enfriados, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

8.2. Transformación de bacterias competentes con plásmidos CRISPR/Cas9 específicos de *PEIG-1/GRPC5A*

Plásmidos con la construcción CRISPR/Cas9 (pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro), fueron adquiridos en Applied Biological Materials (ABM Inc., Canada). La amplificación de los plásmidos se realizó mediante la transformación bacteriana siguiendo el protocolo de Sambrook y col. [480], con algunas modificaciones. Se transformaron bacterias competentes con cuatro plásmidos con la construcción CRISPR/Cas9 y conteniendo distintas secuencias ARN guía

(ARNg) (ARNg1, ARNg2, ARNg3 y una secuencia ARNg aleatoria no codificante como control) (Figura 22). Los plásmidos fueron nombrados pARNg1, pARNg2, pARNg3 y pCtl respectivamente.



Plásmidos	Secuencia ARN guía
pARNg1	AGAAACGGTGGCCACAGCCG
pARNg2	GATCCTCGTCTGCAAGGTGC
pARNg3	CAGTCCGATGATGAAGGCGA
pCtl	GCACTCACATCGCTACATCA

Figura 22: Construcción del vector pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro CRISPR/Cas9 y secuencia de los ARN guía de cada plásmido.

Las bacterias competentes (guardadas previamente a -80°C) se mantuvieron en hielo durante 10 a 15 min, hasta que se descongelaron. Posteriormente se agregaron por separado 50 ng de cada plásmido cada 200 μl de bacterias competentes. Se mezcló pipeteando suavemente, y se dejó la mezcla en hielo durante 30 min. Luego se incubaron las bacterias a 42°C durante 90 seg e inmediatamente se pasaron a hielo por 1-2 min. Se agregaron 800 ml de medio LB sin antibióticos y se dejaron incubando a 37°C con agitación durante 45 min, para permitir que se recupere la pared de las bacterias y expresen el marcador de resistencia antes del agregado del antibiótico ampicilina usado para seleccionar las que fueron transformadas. Luego se transfirieron 200 μl de bacterias en placas de Petri que contenían medio LB agar 2 % y ampicilina (50 mg/ml). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h. Las placas de Petri fueron guardas en la heladera hasta su posterior uso.

8.3. Extracción de ADN Plasmídico Bacteriano por *Lisis Alcalina*

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito por *Sambrook y Russell* [519], con algunas modificaciones. Se inoculó la bacteria portadora de los plásmidos CISPR/Cas9 en 5 ml de medio LB con su respectivo antibiótico. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37°C y en agitación constante. Una vez finalizada la incubación, se centrifugó el cultivo por 2 min a 3.200 x g, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 µl de una solución isotónica (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM (pH 8) y EDTA 10 mM (pH 8)). Luego se añadió al mismo tubo 200 µl de la solución de lisis (NaOH 0,2 N y SDS 1 % p/v), y se mezcló cuidadosamente invirtiendo el tubo unas 5 veces y se incubó la reacción 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió al tubo 150 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial y H₂O) y se incubó en hielo entre 10 y 15 min. Los agregados se centrifugaron a 8.000 x g durante 15 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, y se le agregó 1 ml de etanol 100 % frío. Luego se lo incubó 6 min a -20°C y se centrifugó a 8.000 x g durante 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 70 %. Se mezcló invirtiendo el tubo unas 5 veces y se centrifugó a 8.000 x g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada. Para verificar presencia y calidad del plásmido, se cuantificó el ADN por absorbancia (al igual que ARN como se mencionó anteriormente) y se visualizó, mediante tinción con bromuro de etidio (BrEt), 1 µg de cada plásmido en un gel de agarosa 1 % mediante electroforesis durante 45 min a 80 V.

8.4. Selección de bacterias recombinantes por digestión enzimática

Una vez comprobada la presencia y calidad de los cuatro plásmidos (Inserto 1,2,3 y control) por electroforesis, se confirmó la presencia del plásmido de interés por digestión enzimática con la enzima KpnI, la cual libera una secuencia de 6,3 kb y otra de 5,5 kb. La reacción de digestión (500 ng de plásmido purificado, 5 U de la enzima KpnI y 1X de NEBuffer) se incubó durante 60 min a

37°C. Luego el producto digerido se visualizó en un gel de agarosa 1 % mediante electroforesis (Figura 23).

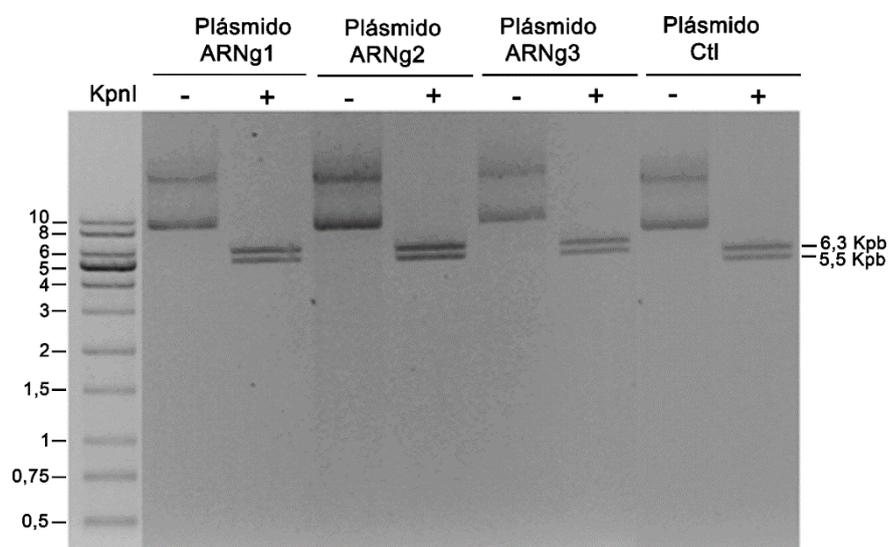


Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos conteniendo la construcción CRISPR/Cas9 digeridos enzimáticamente. Cuatro plásmidos con la construcción CRISPR/Cas9 fueron digeridos con 5 U de KpnI y posteriormente sembrados en un gel de agarosa 1 %. Calle 1: patrón de peso molecular L1 kpb plus (PBL Productos Bio-Lógicos). Pertenece a una corrida distinta. Calle 2: Plásmido con el ARNg 1 sin digerir. Calle 3: Plásmido con el ARNg 1 digerido con KpnI. Calle 4: Plásmido con el ARNg 2 sin digerir. Calle 5: Plásmido con el ARNg 2 digerido con KpnI. Calle 6: Plásmido con el ARNg 3 sin digerir. Calle 7: Plásmido con el ARNg 3 digerido con KpnI. Calle 8: Plásmido control sin digerir Calle 9: Plásmido control

8.5. Transfección por electroporación

La transfección de los plásmidos se realizó mediante el método de electroporación descrito por *Sambrook y Russell* [519], con algunas modificaciones. Se cultivaron células T84 en DMEM/F12 con 5 % de suero hasta un 60 % de confluencia, se levantaron con 0,5 % Tripsina/PBS 1X, se lavaron con DMEM/F12 sin suero 3 veces, y se llevaron a una concentración de 20×10^6 células/ml en DMEM/F12. Los plásmidos se transfectaron mediante electroporación utilizando un electroporador de onda cuadrada BTX-ECM-830 (Genetronix Inc., San Diego, CA), como se describió anteriormente [520]. Se utilizaron las siguientes condiciones de electroporación: 140 Volts, 17 mseg, 1 pulso, en cubetas de 4 mm de ancho “Gene Pulser” (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA). Se emplearon 4×10^6 células por electroporación y 40 μg de cada plásmido con la construcción CISPR/Cas9.

8.6. Selección de células *knock out* GPRC5A

Para determinar la concentración óptima de puromicina a la cual las células T84 transfectadas con los plásmidos con la construcción CRISPR/Cas9 debían ser seleccionadas, se realizó una curva con concentraciones crecientes del antibiótico, como describimos anteriormente con otras selecciones [278]. Células T84 fueron sembradas en placas de 6 wells a una densidad baja de 2×10^5 células/well en DMEMF12 con 5 % SFB. Al día siguiente se le agregó a cada well una concentración distinta de puromicina: 0; 2,5; 5; 7,5; 10; y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todos los días fue observado el estado de las células y cada dos días se volvió a agregar la misma concentración de antibiótico. La menor concentración de puromicina a la cual mueren el 100 % de las células a cabo de 7 días, era la concentración óptima de selección. Esta concentración fue 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células fueron seleccionadas durante 60 días antes de empezar con los experimentos.

9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOTS

9.1. Extracción de proteínas

Las células fueron incubadas como se indicó anteriormente, lavadas dos veces con PBS frío y posteriormente se despegaron con un rastrillo de goma (Nunc, Thermo Scientific) en solución de extracción (10 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % desoxicolato de sodio, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol) conteniendo cóctel de inhibidores de proteasas (5 ml de cóctel/20 g de extracto celular). Las muestras se centrifugaron a $14.000 \times g$ por 20 min a 4°C . Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -80°C para su posterior uso. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó por el método de Lowry [521].

9.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

Se siguió el protocolo descrito por [480]. Alícuotas de 30-50 μg de proteínas fueron desnaturalizadas durante 5 min a 100°C en presencia de una solución amortiguadora ("sample buffer") (Tris 50 mM, DTT 10 mM, SDS 2 % p/v, azul de

bromofenol 0,1 % p/v, glicerol 10 % v/v, pH 6,8). Las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 11 % en solución amortiguadora Tris-glicina (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1 % p/v, pH 8,8), como se describió anteriormente [481]. La electroforesis se inició a 80 V hasta que la muestra entró en el gel de separación. Luego, el voltaje se aumentó a 100 V. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa en presencia de una solución amortiguadora de transferencia (glicina 39 mM, Tris-base 48 mM, SDS 0,037 % p/v, metanol 20 % v/v, pH 8,3) durante 2,5 h a un voltaje constante de 100 V.

9.3. Inmunodetección, Western blots

Para la inmunodetección se siguió el protocolo descrito por [480]. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5 % p/v en TBS (para anti-GPRC5A) o con BSA 5 % p/v en TBS (para anti-JNK, anti-P38 y anti-IkBa) durante 1 h y luego incubadas bajo agitación constante durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente (Ver Tabla 8), disuelto en la misma solución bloqueante. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min en TBS-tween-20 (0,1 % v/v) (TBS-T) y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a HRP. Finalmente, las membranas fueron incubadas con 2,5 ml de la solución A (25 µl de luminol 250 mM, 11 µl de ácido p-cumárico 90 mM, 250 µl de Tris 1 M pH 8,8 y 2,22 ml de H₂O) y 2,5 ml de la solución B (4,55 µl de H₂O₂ 30 %, 250 µl Tris 1 M pH 8,8 y 2,25 ml de H₂O), como se describió anteriormente [278]. Los resultados fueron visualizados usando el ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

	Anticuerpos	Dilución
Primarios	Anti-GPRC5A	1:1000
	Anti-IkB-α	1:500
	Anti- p-JNK	1:500
	Anti- p-38	1:300
	Anti-actina	1:1000
Secundarios	Goat anti-mouse IgG-HRP	1:1000
	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:2000

Tabla 8: Anticuerpos y diluciones utilizadas para la realización de los Western Blots.

10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA GPRC5A POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La cuantificación de proteína de GPRC5A se realizó por citometría de flujo, como fue descrito anteriormente [213]. Células T84 se cultivaron en placas p60 (4×10^5 células / placa, densidad 2×10^4 células / cm^2) en DMEM-F12 con 5 % SFB. Las células se levantaron mediante tratamiento con tripsina (0.25 % tripsina, 0.02 % EDTA), y se lavaron dos veces con PBS 1x. Las muestras enfriadas en hielo que contenían 1×10^6 células por 150 μl de PBS se fijaron agregando 50 μl de paraformaldehído 4X a cada tubo y se incubaron durante 15 minutos a 4°C . Las células se lavaron tres veces con PBS más Tween 20 al 0,2 % (PBS-T) y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con BSA al 5 % en PBS durante 30 minutos y se lavaron dos veces con PBS-T y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos. Las células se incubaron con 50 μl del anticuerpo anti-GPRC5A diluido 1: 200 en BSA al 5 % y se incubaron durante la noche a 4°C . Luego, las células se lavaron cuatro veces con PBS-T y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos. Las células se incubaron con 50 μl del anticuerpo secundario anti-FITC diluido 1: 400 en BSA al 5 %, se incubaron 1 h a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS-T. Finalmente, las células se sedimentaron por centrifugación a $400 \times g$ durante 5 minutos, se resuspendieron en 300 μl de PBS helado y se corrieron en el citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences, San José, CA). Para cuantificar el contenido de GPRC5A, se midió la media de la intensidad de fluorescencia (IFM) y los resultados se expresaron como media \pm SE de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

11. INMUNOFLUORESCENCIA

Para poder observar la localización celular de GPRC5A, células T84 y células T84 *GPRC5A* (-/-) fueron sembradas en una placa de 24 wells conteniendo cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (2×10^4 células/pocillo) en DMEM-F12, SFB 5 % v/v por 24 h; y luego se incubaron en medio sin suero durante 24 h y se realizó el tratamiento con y sin TPA (100 ng/ml) durante 4 h. Como fue

descrito anteriormente [213], una vez finalizada la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y luego fijadas con 4 % de paraformaldehído en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con TBS. Más tarde, las células fueron bloqueadas con 5 % de BSA-TBS durante 1 h a temperatura ambiente e incubadas con anti-GPRC5A en una dilución 1:200 en 5 % de BSA-TBS tween-20 (0,1 % v/v) durante toda la noche a 4°C. Luego se retiró el anticuerpo primario, se lavó tres veces con TBS, y se incubó durante 60 min con el anticuerpo secundario (anti-rabbit conjugado a rodamina) en una dilución 1:400 en 5 % de BSA-TBS tween-20. Pasado este tiempo, se volvió a lavar las células cuatro veces con TBS y se visualizaron las muestras en el microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Alemania), con platina termostaticada a 37 °C.

12. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

12.1. Medición de ROS celular

12.1.1. Medición por espectrofluorimetría

Las ROS celulares fueron medidas por espectrofluorimetría como previamente se ha descrito [522], con algunas modificaciones. Para medir el nivel de ROS intracelular se utilizó la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Ex/Em 510/540) [523, 524]. Esta sonda, al ingresar a la célula pierde los grupos acetato (DA) por la acción de esterasas intracelulares, generando DCFH; al ser oxidado por las ROS el DCFH forma el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) [523, 524]. Como se describió anteriormente [278], las células se sembraron a una densidad de 20.000 células/cm² en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (Greiner Bio-One, Germany) en DMEM-F12, SFB 5 % v/v por 24 h; y luego se incubaron en medio sin suero durante 24 h y se realizó el tratamiento con y sin TPA (100 ng/ml) durante 4 h. Finalizado el tratamiento, las células se incubaron con DCFH-DA (20 µM) en medio Hank's a 37°C en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO₂ por 60 min. Luego las células fueron lavadas tres veces con 200 µl de medio Hank's. La medición de la intensidad de la fluorescencia se realizó en un

espectrofluorímetro de placas (NOVOstar BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Germany).

12.1.2. Medición por citometría de flujo

Las ROS celulares fueron medidas por citometría de flujo como previamente ha sido descrito [525], con algunas modificaciones. Primero las células fueron incubadas 4 h con o sin TPA (100 ng/ml). Finalizada esta incubación, los niveles de ROS celulares fueron medidos, usando la sonda DCFH-DA (Ex/Em 510/540) en medio Hank's conteniendo 20 μ M de sonda fluorescente y luego se incubó a 37°C en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO₂ durante 40 min. Como control positivo se incubaron las células con H₂O₂ 250 y 500 μ M durante 30 min [526]. Como se describió anteriormente [278], luego las células fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/cm², se recolectaron mediante tratamiento con tripsina y se realizaron tres lavados con 200 μ l de medio Hank's para quitar exceso de sonda mediante centrifugaciones sucesivas a 400 x g durante 5 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 μ l de medio Hank's y se analizaron en el citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences, San José, CA).

12.2. Medición de ROS mitocondriales

12.2.1. Medición por espectrofluorimetría

Las ROS mitocondriales fueron medidas por espectrofluorimetría como previamente ha sido descrito [278], con algunas modificaciones. Los niveles de ROS mitocondrial fueron medidos utilizando MitoSOX (Ex/Em 510/580 nm), una sonda selectiva de detección de superóxido O₂⁻ mitocondrial [527]. Una vez que la sonda ingresa a la célula, y dentro de la mitocondria, se oxida por acción del superóxido. El producto de oxidación es altamente fluorescente al unirse al ADN y emite fluorescencia. Como se describió previamente [278], las células fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/cm² en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (Greiner Bio-One, Germany) en DMEM-F12, SFB 5 % v/v por 24 h; luego se incubaron en medio sin suero durante 24 h previo al tratamiento con y sin TPA. Finalizado el tratamiento, las células fueron incubadas con MitoSOX en medio Hank's a una concentración de 5 μ M a 37°C

en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO₂ por 10 min. Luego las células fueron lavadas tres veces con 200 µl de medio Hank's. La medición de la intensidad de la fluorescencia se realizó en un espectrofluorímetro de placas (NOVOstar BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Germany).

12.2.2. Medición por citometría de flujo

Las ROS mitocondriales fueron medidas por citometría de flujo como previamente ha sido descrito [525], con algunas modificaciones [278]. Primero las células fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/cm² e incubadas con y sin TPA (100 ng/ml) durante 4 h. Finalizada esta incubación, para medir los niveles de ROS mitocondriales, el medio DMEM/F12 fue reemplazado por medio Hank's conteniendo 5 µM de MitoSox (Ex/Em 510/580 nm), y luego se procedió a una incubación de 10 min a 37°C en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO₂. Luego las células fueron recolectadas mediante tratamiento con tripsina y se realizaron tres lavados con 200 µl de medio Hank's para quitar exceso de sonda mediante centrifugaciones sucesivas a 400 x g durante 5 min. Como control positivo de producción de ROS, se incubaron las células con rotenona (inhibidor del complejo I mitocondrial) a una concentración 10 µM [528], y como control negativo, se utilizó el inhibidor de NOX (inhibidor de la enzima NADPH oxidasa citoplasmática, GSK2795039) a una concentración 10 µM, ambos tratamientos durante 4 h antes de la medición. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 µl de medio Hank's y se analizaron en el citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences, San José, CA).

13. MEDICIÓN DE APOPTOSIS

13.1. Citometría con Anexina V y 7-aminoactinomicin D (7-AAD)

La anexina V, en presencia de Ca²⁺, se une a la fosfatidilserina que se externaliza en la membrana plasmática de las células con apoptosis temprana [529], mientras que el colorante 7-aminoactinomicin D (7-AAD) penetra en las células en las que se ha alterado la permeabilidad. Es por esto que al teñir las

células con anexina V unida al fluorocromo FITC y 7-AAD se pueden diferenciar las células sanas (anexinaV-/7-AAD-), en apoptosis temprana (anexinaV+/7-AAD-), necróticas (anexinaV-/7-AAD+) y células en apoptosis tardía (anexinaV+/7-AAD+) [530]. Las células se cultivaron como fue descrito previamente y luego de cambiar el medio a un medio sin suero, se le realizaron los tratamientos correspondientes. Luego fueron despegadas con tripsina (0.25 % tripsina, 0.02 % EDTA), lavadas 3 veces con la solución “binding buffer” (0,33 g/l de Ca^{2+} en PBS) y centrifugadas a 250 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron en 30 μl de “binding buffer” y se agregaron 2,5 μl de anexinaV-FITC. Se incubaron las células a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. Luego se agregó 2,5 μl de 7-AAD y se las incubó durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Inmediatamente luego de la incubación (sin lavar) se agregaron 270 μl de “binding buffer” y se analizaron las células con el citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences, San José, CA).

13.2. Evaluación del potencial mitocondrial

Al entrar las células en apoptosis se produce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que se puede evaluar con la sonda TMRE (etil ester de tetrametilrhodamina) (Ex/Em: 549/573). El TMRE permea dentro de las células y al tener carga positiva se acumula en las mitocondrias activas, por lo que las mitocondrias fluorescen en el naranja-rojo. Al disminuir el potencial de las mismas en la apoptosis, se reduce la acumulación, y por lo tanto el nivel de fluorescencia del colorante disminuye [531]. Primero las células se cultivaron como se describió en M&M y luego se le realizaron los tratamientos correspondientes. El medio DMEM-F12 fue reemplazado por medio Hank's conteniendo 40 nM de TMRE, y luego se procedió a una incubación de 20 min a 37°C. Luego las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina y se realizaron tres lavados con medio Hank's para quitar exceso de sonda mediante centrifugaciones sucesivas a 400 x g durante 5 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 300 μl de medio Hank's y se analizaron en el citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences, San José, CA).

13.3. Medición de la actividad de caspasas mediante ensayos fluorimétricos

Durante el proceso de apoptosis se produce la activación, por clivaje, de proteínas caspasas, que desencadenan los eventos que llevan a la muerte celular [532]. Entre estas podemos diferenciar a la caspasa-9 (vía intrínseca), la caspasa-8 (vía extrínseca) y a la caspasa-3 (efectora) [312]. Como se describió anteriormente [533], para evaluar la actividad de estas caspasas cultivos celulares de la línea T84 se trataron con tripsina luego del tratamiento con TPA (100 ng/ml, 4 h), o sin tratar. Posteriormente se contaron las células, se las centrifugó a 1000 x g, 4°C durante 10 min y se realizaron lavados con PBS 1x. Luego se resuspendieron a una concentración 1×10^7 células/ml con el buffer de lisis (50 mM HEPES pH 7,4, 0.1 % CHAPS- TRITON X-100, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA). Luego se incubaron las muestras en hielo durante 5 min para que se produzca la lisis, terminada la incubación se centrifugaron a 10.000 x g a 4°C durante 10 min, se tomó el sobrenadante que contiene el extracto citosólico celular y se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso. La medición de la actividad de caspasa de los extractos se realizó por fluorimetría (NOVOstar BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Germany), para ello se colocaron 10 µl de extracto (proveniente de 2×10^5 células lisadas) en placas con fondo transparente de 96 pocillos y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con distintos inhibidores de las caspasas como control. Luego se inició la reacción utilizando sustratos fluorogénicos específicos Ac-DEVD-AFC (sustrato de la caspasa-3), Ac-IETD-AFC (sustrato de la caspasa-8) y Ac-LEHD-AFC (sustrato de la caspasa-9). Estos sustratos, al ser clivados, permiten que el AFC emita fluorescencia a 480 nm por excitación a 376 nm. Para descontar la interferencia de otras proteasas celulares, a los valores de fluorescencia en cada caso se les restó el valor obtenido en presencia de los inhibidores específicos de las caspasas 3 y 9 Ac-DEVD-CHO [534, 535] y de caspasa 8 Ac-IETD-CHO [536]. Tanto los inhibidores como los sustratos se llevaron a la concentración deseada con un buffer conteniendo 50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1 % CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA y 10 % glicerol.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los diferentes valores fueron graficados utilizando el programa ORIGIN (Originlab Co., Northhampton, MA, USA). Los valores finales se obtuvieron a partir del promedio de triplicados intraensayo e interensayo para cada experimento. Los valores finales, a menos que se indique lo contrario, fueron relativizados tomando como 1 (uno) el valor promedio de los controles. Finalmente, para los gráficos y los cálculos de significancia se utilizaron los valores relativos individuales de cada replicado, calculados a partir de ese único valor estándar promedio (el promedio de los controles); así se pudo incluir el error estándar también en los controles. A menos que se indique lo contrario, los valores se muestran como media \pm error estándar (n = número de experimentos independientes). En los gráficos de barras se muestran además las medias correspondientes a cada experimento independiente mediante un círculo negro con fondo blanco. La presencia de diferencias significativas entre medias fue determinada mediante análisis de ANOVA y el “test” de Tukey HSD.

RESULTADOS

I. RESULTADOS PREVIOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Como fue mencionado en la introducción, este trabajo comenzó a partir de resultados anteriores del laboratorio [122]. Estos resultados previos son importantes para entender el proceso y las estrategias seguidas en esta tesis.

Con el objetivo de entender los mecanismos por los cuales el TPA inducía una disminución en la expresión del gen *CFTR* [537], se buscaron genes específicos modulados por este éster de forbol en líneas celulares T84 de cáncer de colon. Estas células expresan altos niveles del gen *CFTR*, lo que las convierte en un buen modelo de estudio sobre la regulación de la expresión de este gen. Previamente, se había observado que la expresión del ARNm del *CFTR* no era estimulada por TGF- β 1, EGF o PDGF [7], aunque sí era regulada negativamente por TPA [537]. Utilizando células T84 estimuladas con TPA y mediante la técnica de “Differential Display” (DD), se aisló y se secuenció parcialmente un fragmento de ARNm de aproximadamente 2.2 kb. Para llevar a cabo el DD (Figura 24 A), las células T84 fueron tratadas durante 4 h con los siguientes compuestos: TPA (100 ng/ml), TPA (100 ng/ml) + TGF- β 1 (5 ng/ml), TGF - β 1 (5 ng/ml), EGF (20 ng/ml), PDGF (2,5 ng/ml). Como control se utilizaron células sin tratar. Luego el ARN total fue aislado y se realizó la técnica de DD. Desde el gel de acrilamida fue seleccionado un fragmento de ADNc que respondía a TPA, pero no a TGF- β 1, EGF o PDGF (indicado con una flecha). Esta banda fue cortada del gel, eluída y amplificada por PCR con los cebadores correspondientes. Para caracterizar mejor este ARNm se realizaron curvas dosis-respuesta con TPA. La respuesta máxima fue obtenida luego de la incubación con 50 ng/ml de TPA durante 4 h (Figura 24 B). Los niveles de ARNm se incrementaron a partir de la hora de tratamiento con 100 ng/ml de TPA, alcanzando un máximo de expresión a las 4 h (Figura 24 C).

Este gen fue denominado “phorbol ester induced gene 1” (1 porque fue el primero que se secuenció de los genes que respondían a TPA) y se le asignó el símbolo *PEIG-1* (GenBank AF506289.1 y AAM77594.1) [122, 123]. Dos años después fue redescubierto por el laboratorio de Reuben Lotan usando la misma técnica (DD), pero estimulando las células con ácido retinoico en lugar de TPA [125]. Lo denominaron “retinoic acid induced gene 1” con el símbolo *RAIG-1*.

Finalmente, la “Human Genome Organization” (HUGO) le asignó el símbolo oficial *GPRC5A*.

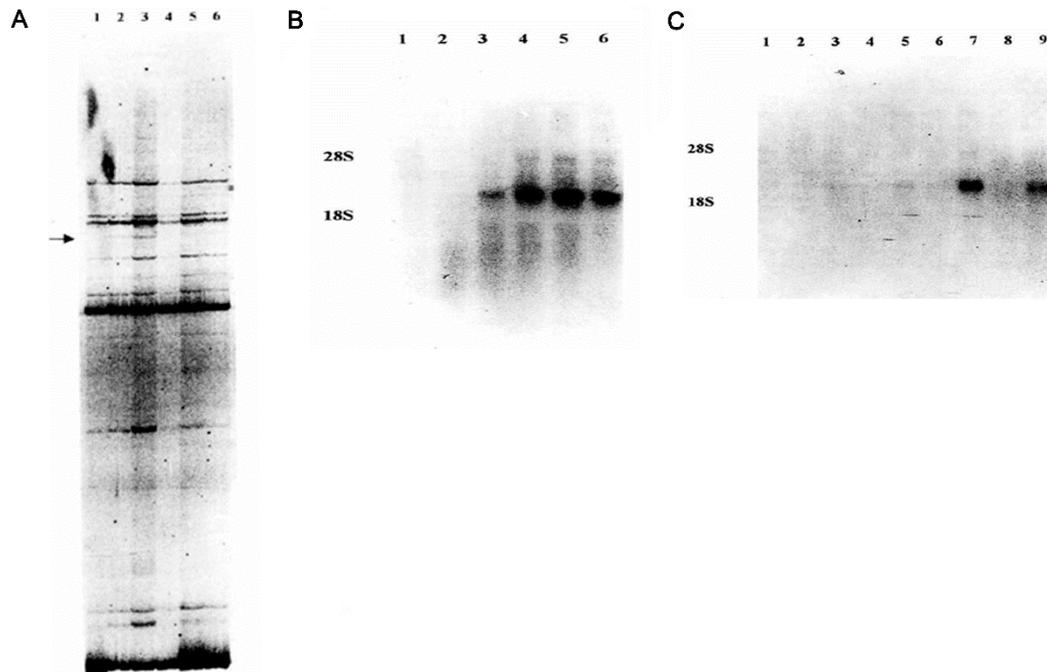


Figura 24: Identificación de un ARNm inducido por TPA. A: “Differential Display” (DD) obtenido luego del tratamiento de células T84 con diferentes factores durante 4 h. Línea 1: Control, Línea 2: TPA (100ng/ml), Línea 3: TPA (100 ng/ml) + TGF- β 1 (5 ng/ml), Línea 4: TGF- β 1 (5 ng/ml), Línea 5: EGF (20 ng/ml), Línea 6: PDGF (2,5 ng/ml). **B:** Curva dosis-respuesta de células tratadas con TPA. Células T84 fueron incubadas durante 4 h con TPA a diferentes concentraciones. Línea 1 a línea 6: 0, 5, 10, 25, 50, y 100 ng/ml. **C:** Curva de tiempo con TPA. Células T84 fueron incubadas en presencia de 100 ng/ml de TPA durante 0 (línea 1), 0,5 (control línea 2, TPA línea 3), 2 (control línea 4 y TPA línea 5), 4 (control línea 6, TPA línea 7) y 24 h (control línea 8, TPA línea 9) [7].

II. RESULTADOS DE ESTA TESIS

1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR TPA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Y EL ARNm DE *GPRC5A*

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real permite amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación del ADN, permitiendo estudiar la expresión génica [538].

Resultados previos del laboratorio indicaban que TPA modulaba positivamente la expresión de *GPRC5A* en células T84 [122]. Para corroborar

estos resultados, y determinar la concentración y el tiempo en el cual TPA genera el mayor aumento en la expresión de *GPRC5A*, se realizó primero una curva de tiempo con 100 ng/ml de TPA, concentración utilizada en el DD (Figura 24 A). Para ello, se incubaron células T84 con esta concentración durante 15 y 30 min, y 1, 2, 4 y 6 h. Luego se aisló el ARNm, se lo utilizó para sintetizar ADNc y se midió la expresión relativa de *GPRC5A*. Los niveles de expresión de *GPRC5A* se normalizaron con respecto a la expresión del gen *TBP* ("TATA box binding protein"). La expresión de *GPRC5A* en las células sin tratamiento con TPA (células Ctl) fue tomada como 1 y los niveles de expresión de T84 incubadas con TPA fueron relativizados a este valor. Como se muestra en la Figura 25 A, se observó un aumento paulatino de la expresión de este gen a medida que aumentó el tiempo de incubación con TPA, siendo este aumento altamente significativo ($p < 0,001$) a partir de las 4 h de incubación con TPA con respecto al control (Ctl, vehículo). Los resultados sugieren que el pico de estimulación es a las 4 h, mientras que a las 6 h se observó una disminución en los niveles del ARNm de *GPRC5A*.

Posteriormente, se realizó una curva de dosis-respuesta en esta misma línea celular. Se incubaron células T84 durante 4 h con diferentes concentraciones de TPA: 0,05; 0,5; 1; 2,5; 5; 6,6; 12,5; 25; 50; 75; 100; 200 ng/ml. A medida que se incrementó la concentración de TPA, aumentó la expresión del ARNm de *GPRC5A* (Figura 25 B). A partir de 2,5 ng/ml de TPA se observaron aumentos significativos, con un pico de expresión a 100 ng/ml de TPA. A partir de 200 ng/ml, se observó una disminución de la expresión.

En concordancia con los resultados previos, se observó el mayor aumento de la expresión del ARNm de *GPRC5A* con 100 ng/ml de TPA a las 4 h de incubación. Los valores de las medias y los desvíos estándar (SE) se detallan en la Tabla 9 (pag. 98).

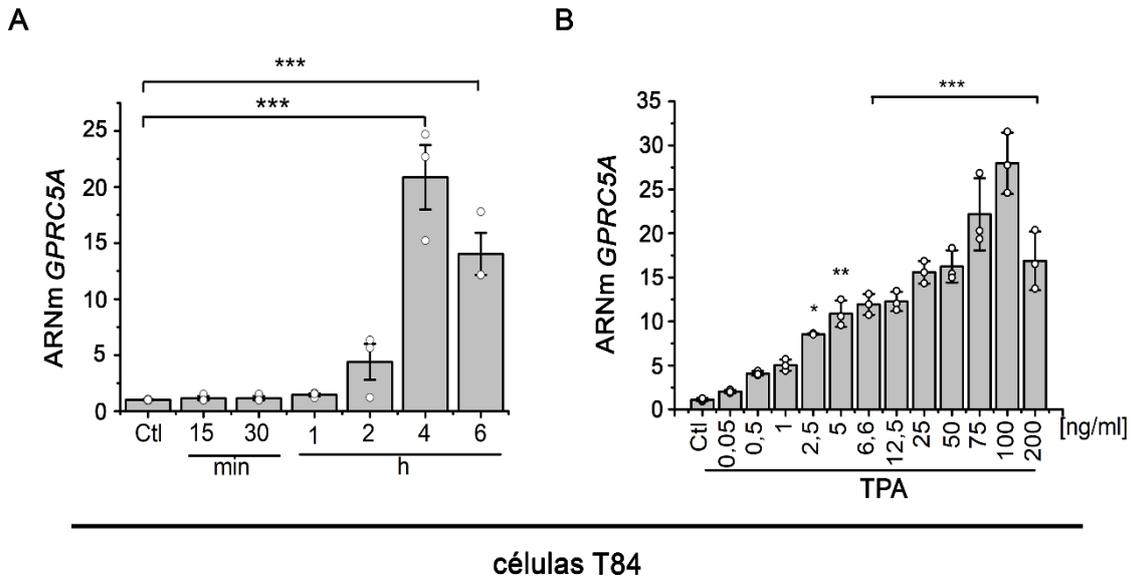
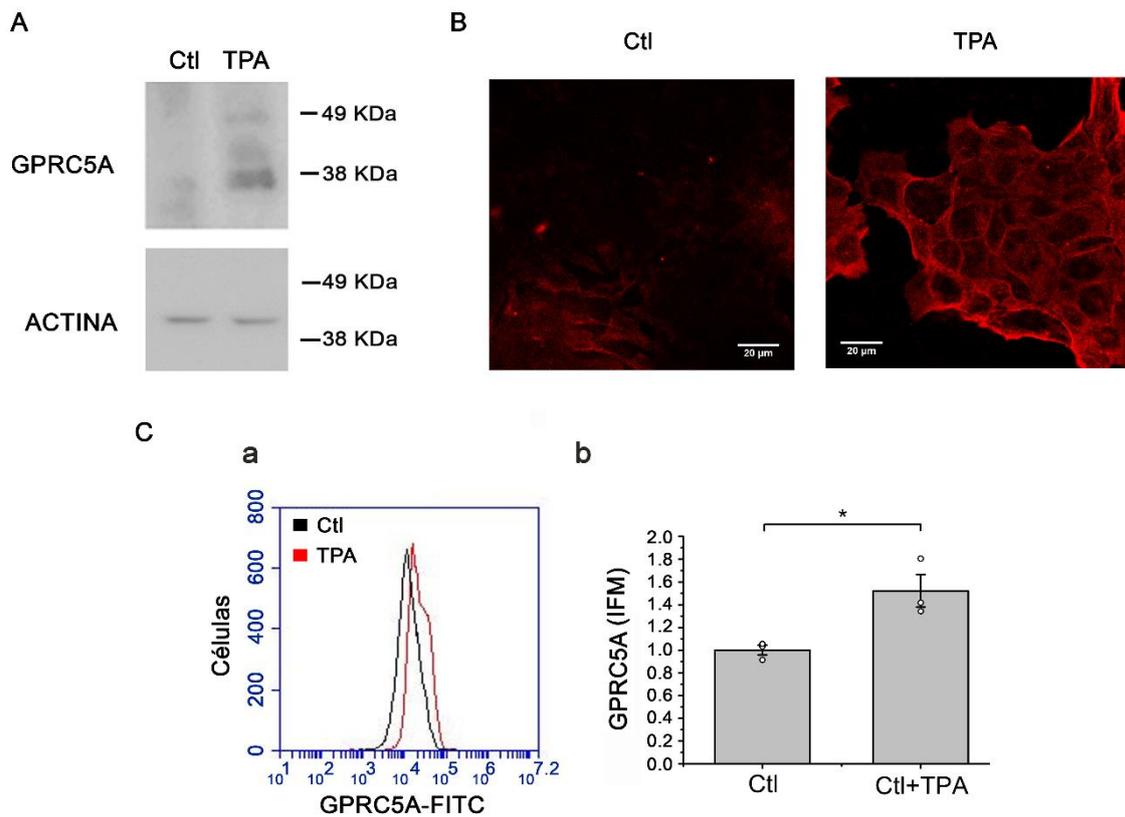


Figura 25: Efecto de TPA sobre la transcripción de GPRC5A en células de cáncer de colon T84. Células T84 se preincubaron en DMEM/F12 libre de suero durante 24 h y luego se incubaron con TPA a diferentes tiempos y concentraciones. Se determinaron los niveles de ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. **A:** Niveles de expresión de ARNm de *GPRC5A* en células T84 incubadas con TPA (100 ng/ml) durante 15 min, 30 min, 1, 2, 4 y 6 h. **B:** Niveles de expresión de ARNm de *GPRC5A* en células T84 incubadas durante 4 h con concentraciones crecientes de TPA (0,05; 0,5; 1; 2,5; 5; 6,6; 12,5; 25; 50; 75; 100; 200 ng/ml). Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (TukeyAnálisis). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Para evaluar si la modulación de la expresión del ARNm por TPA se traducía en un aumento en el nivel de la proteína GPRC5A, se realizaron Western blots (WBs) a partir de proteínas extraídas de células T84 tratadas con 100 ng/ml de TPA durante 4 h. Como control se utilizaron células sin tratamiento con TPA. Como se muestra en la Figura 26 A, se observaron bandas entre los 38 y 49 KDa, correspondientes a las diferentes modificaciones postraduccionales de la proteína (es una glicoproteína). Además, tal como se esperaba, se pudo notar que las calles correspondientes a los tratamientos con TPA presentaron mayor intensidad en las bandas correspondientes a la proteína GPRC5A que los controles. Estos datos fueron confirmados por citometría de flujo (Figura 26 C), donde se evidenció un corrimiento hacia la derecha en la curva correspondiente

a la marca GPRC5A-FITC de células tratadas con TPA (curva roja), con respecto a las células sin tratar (curva negra) (Figura 26 C a). En la Figura 26 C b, se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por citometría de flujo de tres experimentos independientes, donde se observó un aumento significativo ($1,52 \pm 0,14$; $p < 0,05$; $n=3$) de la expresión de GPCRC5A en las células tratadas con TPA con respecto al tratamiento control ($1,00 \pm 0,04$; $n=3$).

Seguidamente se estudió la localización de GPRC5A por microscopía confocal (Figura 26 B), visualizándose en el borde celular y región perinuclear. Como puede observarse, las células tratadas con TPA mostraron un aumento en la intensidad de la señal en comparación con las células sin tratar, en concordancia con la mayor expresión de GPRC5A observada por WBs o por citometría de flujo.



células T84

Figura 26: Efecto de TPA en la expresión de proteína de GPRC5A en células de cáncer de colon T84. Células T84 se preincubaron en DMEM/F12 libre de suero durante 24 h y luego se incubaron con 100 ng/ml de TPA durante 4 h. Se determinaron los niveles de proteína por WB y citometría de flujo. Se estudió la localización celular de GPRC5A por microscopía confocal. **A:** WB de lisados celulares de T84 incubados con TPA (100 ng/ml) durante 4 h (anticuerpo: anti-GPRC5A). **B:** Microscopía confocal de células control y células tratadas con 100 ng/ml de TPA durante 4 h. **C:** Citometría de flujo. (a) Citometría representativa de células T84 tratadas con 100 ng/ml de TPA 4 h. (b) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa de tres citometrías. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* $p < 0,05$).

FIGURA A	TPA (100 ng/ml)						
	Ctl	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h
	1,00 \pm 0,03	1,15 \pm 0,17	1,17 \pm 0,18	1,45 \pm 0,13	4,39 \pm 1,60	20,86 \pm 2,88 ***	14,02 \pm 1,88 ***

FIGURA B	TPA(ng/ml) (4 h)						
	Ctl	0,05	0,5	1	2,5	5	6,6
	1,00 \pm 0,17	2,01 \pm 0,19	4,07 \pm 0,25	5,02 \pm 0,64	8,54 \pm 0,07*	10,87 \pm 1,49 **	11,92 \pm 1,17 ***
		12,5	25	50	75	100	200
		12,26 \pm 1,09 ***	15,58 \pm 1,26 ***	16,24 \pm 1,81 ***	22,17 \pm 4,07 ***	27,97 \pm 3,48 ***	16,87 \pm 3,33 ***

Tabla 9. Datos de la Figura 25 A-B. Valores de la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). * Indica $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ en comparación con las células Ctl.

Para determinar que estos resultados eran independientes de la línea celular utilizada, los mismos fueron confirmados en otro modelo celular de cáncer de colon, células Caco-2. Estas células son de origen epitelial de adenocarcinoma de colon, que al alcanzar la confluencia empiezan a expresar características de diferenciación enterocítica [539]. En este modelo celular, también se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en la expresión del ARNm de *GPRC5A* luego del tratamiento con 100 ng/ml de TPA durante 4 h ($8,69 \pm 0,67$; $p < 0,01$; $n=3$), con respecto al control ($1,00 \pm 0,08$; $n=3$) (Figura 27 A). Asimismo, en las células Caco-2 también se produjo un aumento en los niveles de proteína GPRC5A

luego del tratamiento con TPA, por WB. (Figura 27 B). Estos datos fueron recientemente publicados [130].

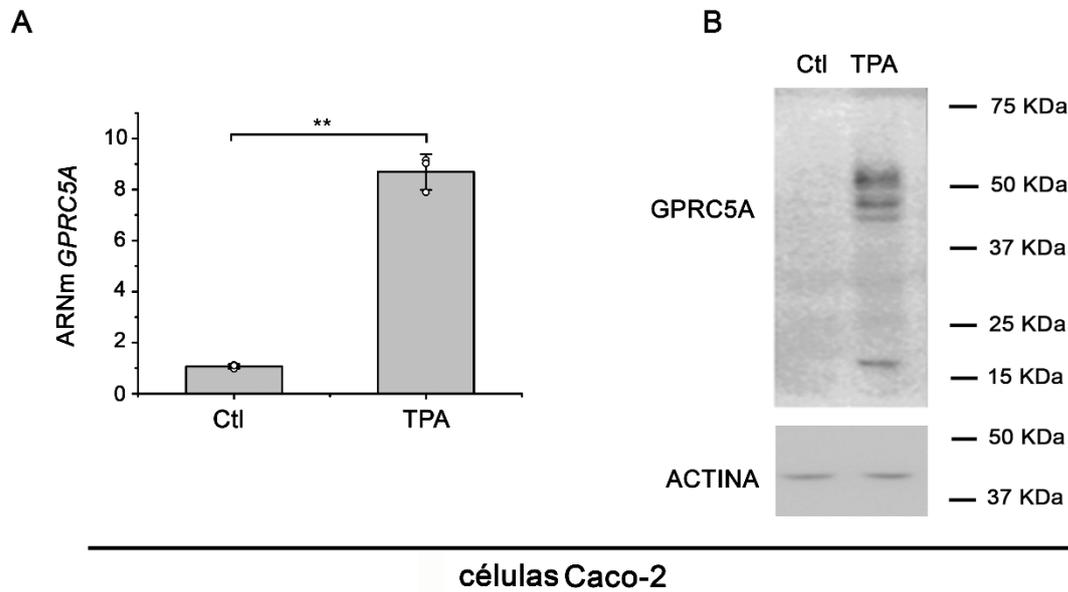


Figura 27: Efecto de TPA en la expresión de GPRC5A en células de cáncer de colon Caco-2. Células Caco-2 se preincubaron en DMEM/F12 libre de suero durante 24 h previamente al tratamiento con TPA (100 ng/ml) durante 4 h. **A:** Nivel de expresión del ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR cuantitativa de células Caco-2 con TPA. **B:** WB de lisados celulares de Caco-2 con TPA (anticuerpo anti-GPRC5A). Imagen representativa de tres WB. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media ± SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (** $p < 0,01$).

2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE *GPRC5A* POR TPA.

Con el fin de determinar qué vías de señalización podrían estar involucradas en la regulación de *GPRC5A* por TPA, se utilizaron inhibidores farmacológicos de enzimas claves que estimulan a factores de transcripción con sitios predichos en el promotor de *GPRC5A* [150]. Los resultados que a continuación se detallan fueron recientemente publicados [130].

2.1. Efecto de la inhibición de PKC, Ca²⁺, PKA y MEK1 / 2 sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA.

Estudios previos indican que TPA activa a PKC [378, 540], y que PKC activa a factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, los cuales, según predicciones bioinformáticas, poseen sitios de unión al promotor de *GPRC5A* [150]. Para estudiar si TPA regulaba a *GPRC5A* por medio de la activación de PKC, células T84 fueron incubadas, junto con TPA, con el inhibidor de PKC Gö6983 (10 µM, 4 h) [486]. En la Figura 28 A, se puede observar que el tratamiento con el inhibidor de PKC Gö6983 en las células estimuladas con TPA, redujo aproximadamente el 80 % la expresión del ARNm de *GPRC5A*, con respecto a las células tratadas solo con TPA. El bloqueo casi total por parte de este inhibidor sobre el efecto de inducción producido por TPA, sugiere que PKC estaría involucrada en la regulación de *GPRC5A* por TPA. Por otro lado, con respecto a los niveles basales del ARNm de *GPRC5A* (Figura 28 A b), el inhibidor de PKC redujo la expresión en un 50 %, con respecto al control. Es decir, PKC también estaría involucrada en mantener una buena parte de los niveles basales de *GPRC5A*.

Para estudiar si la respuesta de *GPRC5A* a TPA era debida a alguna de las isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺, las llamadas isoformas clásicas (convencionales), o bien estaba involucrada alguna de las isoformas nuevas o atípicas, que no dependen de Ca²⁺ para su activación, las células fueron tratadas con el quelante de Ca²⁺ BAPTA (150 µM) [488]. En la Figura 28 B (a) se observa una disminución significativa (~55 %; p<0.05) en la expresión de *GPRC5A* en células tratadas al mismo tiempo con BAPTA y TPA, como también en células tratadas sólo con BAPTA, respecto al tratamiento solo con TPA y al control sin tratamiento respectivamente (Figura 28 B b). Esto sugiere que TPA regularía a *GPRC5A*, al menos en parte, a través de PKC dependientes de Ca²⁺.

Por otro lado, se ha descrito que cerca del sitio de inicio de la transcripción de *GPRC5A* existen elementos de respuesta a AMPc (CRE) [150], y se vio que el aumento de AMPc induce la transcripción de *GPRC5A* [143]. Como PKA es una enzima dependiente de AMPc, y está descrito que PKA activa al factor de transcripción CREB [541, 542], el cual se une a sitios CRE en el promotor, quisimos estudiar si PKA participaba de la posible vía TPA→AMPc→PKA→CREB→*GPRC5A*. Para estudiar si PKA se encontraba

involucrada en la regulación de *GPRC5A*, las células fueron incubadas con el inhibidor de PKA H-89 (10 μ M, 4 h) [487], y al mismo tiempo con TPA (100 ng/ml, 4 h) (Figura 28 C). Se observó una disminución significativa (cerca del 40 %; $p < 0,01$) en la expresión basal del ARNm de *GPRC5A* con el inhibidor de PKA (con respecto al control Figura 28 C(b)). Similar disminución (~35 %; $p < 0,01$), se evidenció en el tratamiento con TPA más el inhibidor de PKA, respecto al tratamiento sólo con TPA (Figura 28 C(a)). Esto sugiere una participación de PKA en la regulación de los niveles basales de este gen y en la estimulación por TPA.

El diacilglicerol (DAG) es considerado un análogo del TPA, ya que también se une a PKC provocando su activación [378, 543]. PKC luego activa a MEK (MAP kinase, “mitogen-activated protein kinase kinase” o ERK kinase, “extracellular signal-regulated kinase kinase”), mecanismo ampliamente descrito [544, 545]. Como MEK activa al factor de transcripción AP-1 [546], que contiene sitios predichos de unión al promotor de *GPRC5A* [150], decidimos estudiar si *GPRC5A* estaba regulado por esta vía. Para ello, células T84 fueron incubadas con el inhibidor de MEK1/2 UO126 (10 μ M, 4 h) [483] junto con TPA (100 ng/ml, 4 h). Como se puede observar en la Figura 28 D, el inhibidor de MEK1/2 UO126 produjo una disminución significativa (~60 %; $p < 0,01$) tanto de los niveles de ARNm de las células tratadas con TPA (Figura 28 D a) como de los niveles basales de ARNm (Figura 28 D b). Esto sugiere que la vía $TPA \rightarrow PKC + Ca^{2+} \rightarrow MEK \rightarrow GPRC5A$ estaría involucrada en la regulación de *GPRC5A* por TPA. Los valores de la media \pm SE (n) se detallan en la Tabla 10 (pág. 103).

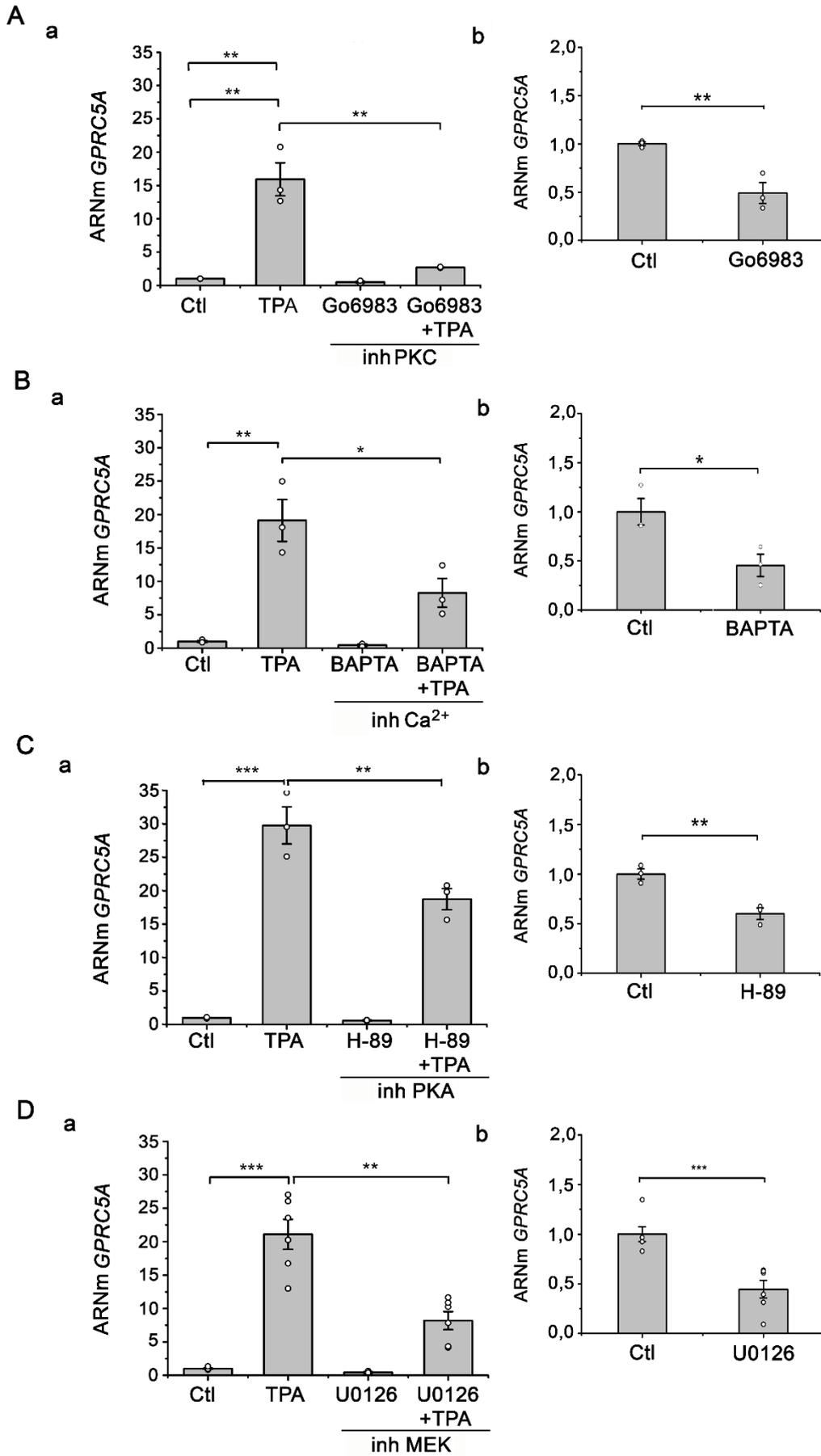


Figura 28: Las vías de transducción de señales PKC, PKA y MEK se encuentran involucradas positivamente en la regulación de la expresión de *GPRC5A* por TPA.

Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero, y a continuación se incubaron por separado durante 4 h con los distintos inhibidores de vías de señalización y el quelante de Ca²⁺ BAPTA, en presencia y en ausencia de TPA (100 ng/ml) según corresponda. Se determinaron los niveles de ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. **A:** inh PKC: inhibidor de PKC Gö6983 (10 µM) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales. **B:** inh Ca²⁺: BAPTA (0,15 mM) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales **C:** inh PKA: inhibidor de PKA H-89 (10 µM) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales **D:** inh MEK: inhibidor de MEK1/2 U0126 (10 µM) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media ± SE de tres experimentos independientes (n=3) en los tratamientos con inhibidor de PKC, Ca²⁺ y PKA y seis experimentos independientes (n=6) en los tratamientos con el inhibidor de MEK1/2. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (**p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001).

FIGURAS	Ctl	TPA	Inhibidor correspondiente	Inhibidor correspondiente +TPA
A	1,00 ± 0,02	15,93 ± 2,47	0,49 ± 0,11	2,69 ± 0,04
B	1,00 ± 0,13	19,12 ± 3,11	0,45 ± 0,20	8,27 ± 2,15
C	1,00 ± 0,05	29,79 ± 2,77	0,60 ± 0,06	18,76 ± 1,57
D	1,00 ± 0,07	21,10 ± 2,24	0,44 ± 0,09	8,18 ± 1,35

Tabla 10: Datos de la Figura 28 A-D. Valores de la media ± SE (n=3 figura A, B y C; n=6 figura D).

2.2. Efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA.

Se sabe que PKC activa la vía de señalización de JNK [547, 548]. Además, *GPRC5A* tiene sitios predichos en su promotor para los factores de transcripción p53 [549] y c-Jun [550], factores activados por JNK (“c-Jun N-terminal kinases”). Por estos motivos, decidimos estudiar si la vía de señalización de JNK estaba involucrada en la regulación positiva de *GPRC5A* por TPA.

Células T84 fueron incubadas con el inhibidor de las quinasas JNK (JNK1, JNK2 y JNK3) SP600125 [551] (10 µM, 4 h [482]) junto con TPA (100 ng/ml, 4 h). En la Figura 29, se observa que el tratamiento con el inhibidor de JNK

aumentó significativamente la expresión del ARNm de *GPRC5A*. Este aumento se observó tanto en células estimuladas con TPA junto con el inhibidor ($26,61 \pm 1,67$; $p < 0,001$; $n=3$), como en células tratadas solo con el inhibidor ($2,13 \pm 0,04$; $p < 0,05$; $n=3$), respecto a las células control con TPA ($15,49 \pm 0,50$; $n=3$) y control sin tratar ($1,00 \pm 0,02$; $n=3$) respectivamente. Por lo tanto, la vía de señalización de JNK estaría implicada negativamente tanto en la inducción de *GPRC5A* por TPA, como en su expresión basal. Para asegurarnos de que la vía de JNK estaba efectivamente inhibida, se analizó el estado de fosforilación de JNK (p-JNK) mediante WB. Como se muestra en la Figura 29 B, el tratamiento con el inhibidor de JNK SP600125 redujo los niveles de p-JNK, y por lo tanto de JNK activado, confirmando que la inhibición fue efectiva a esa concentración

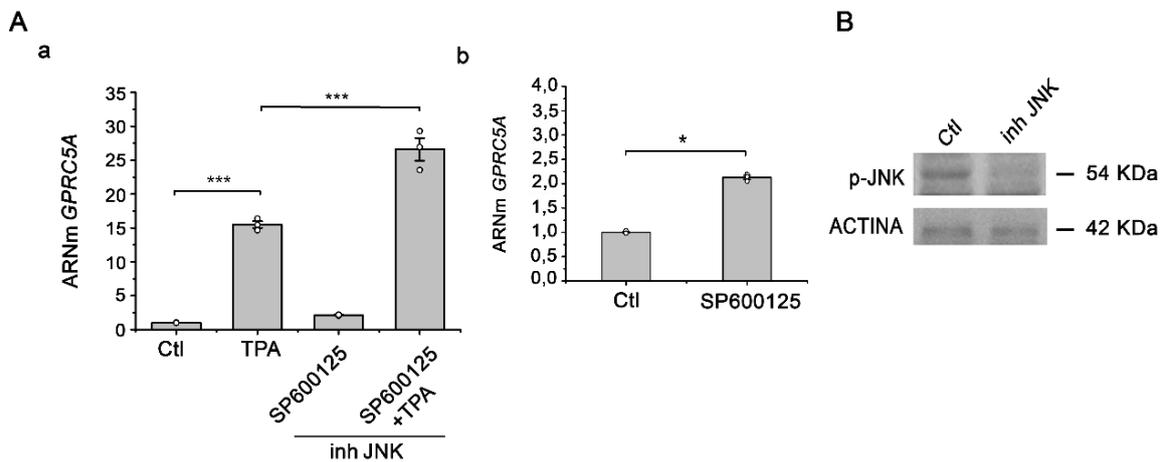


Figura 29: La vía de señalización de JNK se encuentra involucrada negativamente en la regulación de *GPRC5A* por TPA. Las células T84 fueron preincubadas durante 24 h en medio libre de suero y a continuación se incubaron durante 4 h con el inhibidor de JNK (inh JNK) SP600125 (10 μ M), con o sin TPA (100 ng/ml) según corresponda. **A:** Determinación de los niveles de ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales **B:** WB de p-JNK y β -actina desde lisados celulares completos de células T84. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones por RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes ($n=3$). Los WB se realizaron por simplificado. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

2.3. Efecto de la inhibición de AKT, p38 e IKK1/2 sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA.

A partir de predicciones bioinformáticas, se reportó que el promotor de *GPRC5A* tiene sitios de unión predichos para los factores de transcripción: c-Jun/c-Fos (AP-1), MYC/MAX, CREB1 y p53 [150]. Se conoce que tanto AP-1 como p53 son regulados por las vía de señalización de AKT [552, 553] y p38 [550, 554-556]. También se vio que la vía de señalización p38 activa a los factores de transcripción MYC/MAX [557] y CREB [558]. Se conoce que PKA es un activador del factor de transcripción NF- κ B [559]. Para estudiar si estas vías están involucradas en la regulación de *GPRC5A* por TPA, células T84 fueron incubadas con inhibidores farmacológicos de estas vías junto con TPA (100 ng/ml, 4 h).

Como se muestra en la Figura 30 A-C, los tratamientos con los inhibidores de las quinasas AKT (GSK690693, 10 μ M [485], 4 h), p38 (SB203560, 10 μ M [482], 4 h) e IKK-2 (BMS 345541, 10 μ M [484], 4 h) no tuvieron efectos sobre la regulación de la expresión de *GPRC5A* por TPA. Con respecto a los niveles basales de *GPRC5A*, el inhibidor de AKT tuvo un efecto positivo y significativo ($p < 0.05$) (Figura 30 A b), mientras que los inhibidores de p38 y NF- κ B no tuvieron efectos en las condiciones estudiadas (Figura 30 B (b) y Figura 30 C (b)). Para asegurarnos de que la vía de p38 se encontraba inhibida, se analizó el estado de fosforilación de p38 (p-p38) mediante WB, ya que cuando p38 se activa se autofosforila [560, 561]. Como se muestra en la Figura 30 B (c), el tratamiento con el inhibidor SB203560 (10 μ M) redujo los niveles de p-p38 confirmando que la inhibición fue efectiva a esa concentración.

Con respecto a NF- κ B, en condiciones basales, el factor de transcripción se encuentra unido a la proteína I κ B- α que impide su translocación al núcleo y la posterior activación de la transcripción de sus genes diana [562]. La activación de NF- κ B requiere la fosforilación de la proteína I κ B- α mediante la activación del complejo IKK, que está compuesto por tres subunidades, dos catalíticas IKK- α (IKK-1) e IKK- β (IKK-2) y una regulatoria, IKK- γ (NEMO) [563-565]. IKK activado fosforila a I κ B- α , lo que promueve su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma [566]. La degradación de I κ B- α deja libre a NF- κ B. Este factor de transcripción está constituido por una familia de cinco proteínas que incluye c-Rel, RelA/p65, RelB, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100), que forman homodímeros y heterodímeros [562]. El más común es el heterodímero p50/p65, pero existen otras combinaciones de homo y

heterodímeros [567]. Una vez libre NF- κ B se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción. La activación de NF- κ B también implica la fosforilación de la subunidad p65 por la subunidad catalítica de PKA. La disociación de I κ B permite que PKA, una quinasa que vimos que está implicada en la regulación transcripcional de GPRC5A [130], fosforile a p65 aumentando la actividad transcripcional de NF- κ B [559]. Para inhibir la vía de NF- κ B, las células T84 fueron incubadas con BM5345541 (10 μ M), que es un inhibidor de selectivo de IKK-1 e IKK-2, con IC₅₀ de 4 μ M y 0.3 μ M, respectivamente [484]. De modo que en presencia de BMS345541 10 μ M las dos subunidades catalíticas de IKK están inhibidas, I κ B no se fosforila y no se degrada, manteniendo a NF- κ B inactivo. Para comprobar que la inhibición fue efectiva, se evaluó indirectamente la actividad de NF- κ B mediante la medición de los niveles de I κ B- α por WBs. En la Figura 30 C (c) se observa el aumento en los niveles de I κ B- α debido a la disminución de su degradación en presencia de BMS345541. Concluimos que el inhibidor de IKK fue efectivo a esa concentración y que, por lo tanto, la vía de NF- κ B no está involucrada en la estimulación de GPRC5A por TPA.

Los valores obtenidos (media \pm SE (n)) se detallan en la Tabla 11.

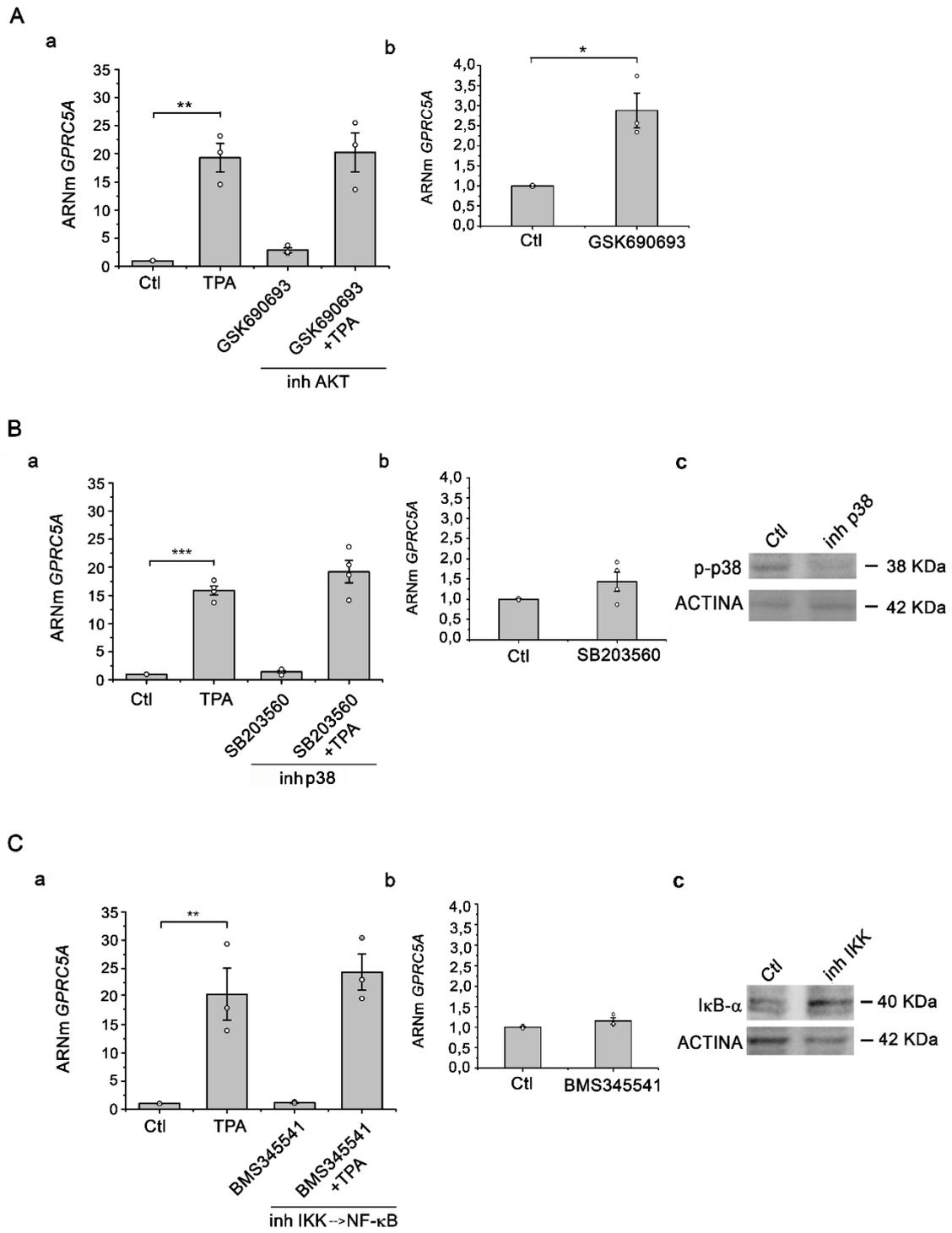


Figura 30: Las vías de transducción de señales AKT, p38 y NF- κ B no se encuentran involucradas en la regulación de la expresión de *GPRC5A* por TPA. Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero, y a continuación se incubaron durante 4 h con distintos inhibidores de vías de señalización, con o sin TPA (100 ng/ml) según corresponda. Se determinaron los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, y el estado de activación de I κ B- α y p38 por WB. **A:** inh AKT: inhibidor de AKT, GSK-690693 (10 μ M) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales **B:** inh p38: inhibidor de p38 SB-203560 (5 μ M) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales (c) WB de p-p38 y β -actina desde lisados celulares completos de células T84. **C:** inh IKK-2/NF- κ B: inhibidor de I κ B BM5345541 (10 μ M) (a) Tratamiento con TPA (b) Niveles basales (c) WB de I κ B- α y β -actina desde lisados celulares completos de células T84. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones por RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por triplicado, y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3) en el caso de los tratamientos con inhibidor de AKT y IKK; y cuatro experimentos independientes (n=4) en los tratamientos con inhibidor de p38. Los WB se realizaron por simplificado. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

FIGURAS	Ctl	TPA	Inhibidor correspondiente	Inhibidor correspondiente +TPA
A	1,00 \pm 0,02	19,31 \pm 2,52	2,88 \pm 0,43	20,24 \pm 3,49
B	1,00 \pm 0,01	15,87 \pm 0,83	1,43 \pm 0,23	19,22 \pm 1,98
C	1,00 \pm 0,02	20,43 \pm 4,61	1,15 \pm 0,08	24,36 \pm 3,18

Tabla 11: Datos de la Figura 30 A-C. Valores de la media \pm SE (n=3 figura A y C; n=4 figura B)

2.4. Efecto de IL-1 β , ion Cl⁻ y la inhibición de SGK1 sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA.

Como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio se vio que la vía de señalización de la citoquina proinflamatoria IL-1 β regula la activación del receptor oncogénico EGFR [279], receptor que fosforila al receptor *GPRC5A* inhibiendo su señalización [155]. Además, hay estudios que indican que IL-1 β es inducida por TPA [568]. Quisimos estudiar si la vía de IL-1 β regulaba a la expresión del ARNm de *GPRC5A*. En la Figura 31 A, se observa que los niveles del ARNm de *GPRC5A* no se encuentran alterados en células T84 tratadas con

IL-1 β (5 ng/ml, 4 h) o con el antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL1RN) (10 ng/ml, 4 h), como tampoco se observa una variación en dichos tratamientos con TPA. Por lo tanto, la vía de IL-1 β no estaría implicada en la regulación de GPRC5A. Para verificar que la IL-1 β recombinante añadida a los cultivos y la señalización de IL1R1 estaban activas, las células T84 se incubaron con 5 ng/ml de IL-1 β y se midió la expresión del ARNm de *IL-1 β* (Figura 31 B). Además, las células se incubaron con IL1RN/anakinra (ANK) para ver si el bucle autócrino de IL-1 β estaba activo en condiciones basales. Los resultados indican que las células T84 responden correctamente a la estimulación con IL-1 β recombinante añadida (esta citoquina estimula su propio ARNm). Además, en presencia de IL1RN / anakinra (10 ng / ml) se observó una reducción pequeña pero no significativa, lo que sugiere que en condiciones basales el “loop” de IL-1 β no tiene una respuesta significativa sobre la expresión basal de IL-1 β , como sí ocurre en células con actividad CFTR disminuída (células IB3-1 o células Caco-2 / pRS26), que secretan IL-1 β y esa IL-1 β activa a sus receptores estimulando la transcripción del ARNm de *IL-1 β* y posterior traducción, generándose un loop autócrino [274].

La quinasa SGK1 (“serum and glucocorticoid-regulated kinase 1”) tiene una gran homología en la secuencia del dominio catalítico con PKC y PKA [569], dos quinasas que vimos que regulan la expresión de *GPRC5A* [130]. Por otra parte, se sabe que TPA modulaba positivamente a *SGK1* [570]. Para determinar si existía un efecto de SGK1 sobre *GPRC5A*, se realizó una curva de concentración con el inhibidor de SGK1 GSK650394 (0,1; 1; 10 y 20 μ M), en presencia o ausencia de TPA (100 ng/ml, 4 h). Como puede observarse en la Figura 31 C, a medida que aumentó la concentración del inhibidor aumentaron los niveles basales de *GPRC5A*, siendo significativo ($p < 0,001$) este aumento a partir de 10 μ M. Cuando se realizaron tratamientos con TPA la expresión de *GPRC5A* disminuyó gradualmente al aumentar la concentración del inhibidor, siendo significativa ($p < 0,001$) esta disminución a 20 μ M. Estos resultados sugieren un efecto dual de SGK1 en la expresión del ARNm de *GPRC5A*, un efecto inhibitorio en los niveles basales y una inducción positiva en su expresión en los tratamientos con TPA. No sabemos a qué se debe este rol opuesto.

Por otro lado, se sabe que la quinasa SGK1 es regulada por el ión cloruro (Cl⁻) [571], el cual se vio que podría actuar como un segundo mensajero regulando

la expresión de genes [572]. Para estudiar si el Cl^- regula a *GPRC5A*, se aplicó la estrategia de doble ionóforo (ver M&M) con la cual se fijó la concentración de Cl^- intracelular ($[Cl^-]_i$) en dos diferentes concentraciones: 5 mM como control, ya que es una concentración baja, y 75 mM como concentración elevada [275]. La Figura 31 D muestra que a estas $[Cl^-]_i$ no varió la expresión de *GPRC5A*, tanto en presencia como en ausencia de TPA. Los valores de la media \pm SE se detallan en la Tabla 12. En conclusión, la expresión de *GPRC5A* no estaría siendo modulada por Cl^- .

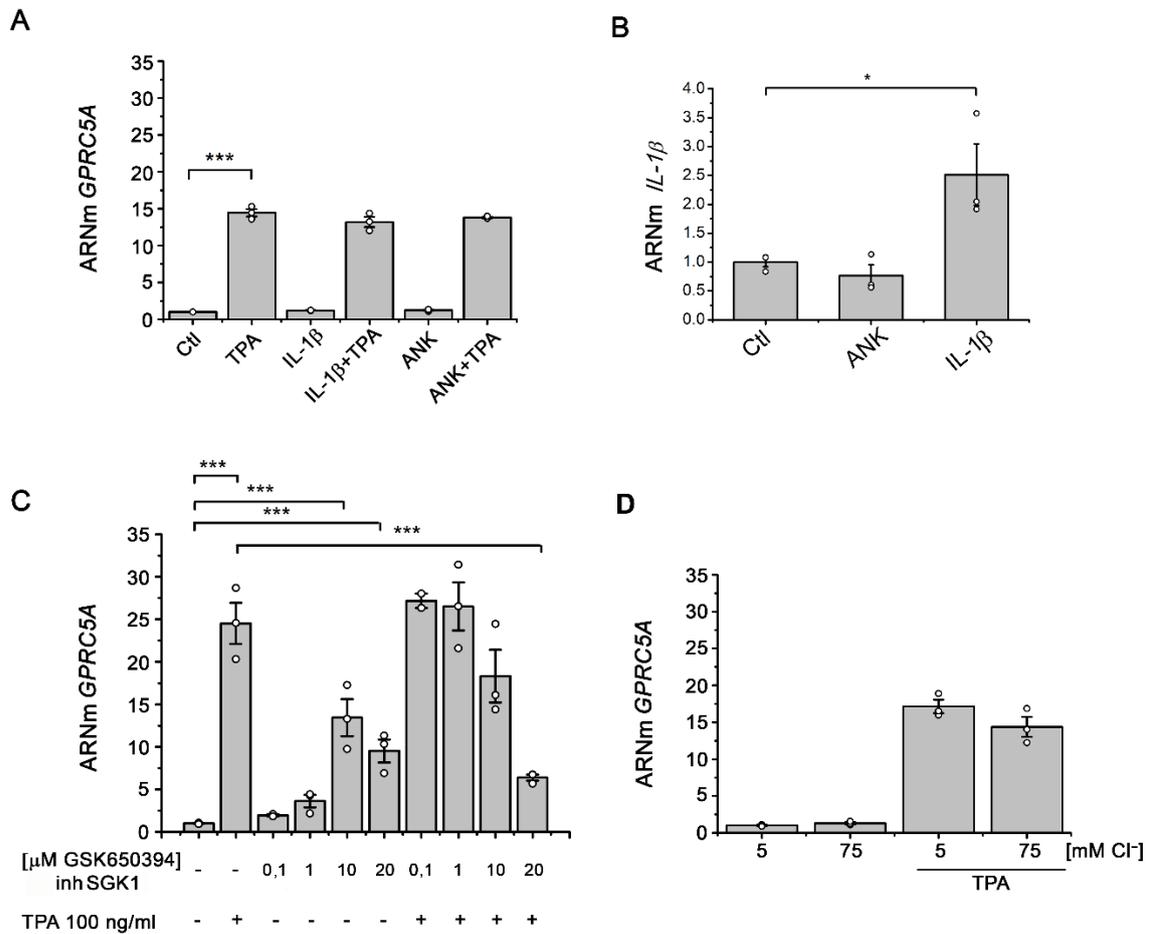


Figura 31: IL-1 β y Cl⁻ no están implicados en la regulación de GPRC5A, pero sí SGK1. Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero, y a continuación se incubaron durante 4 h con distintos factores, con o sin TPA (100 ng/ml) según corresponda. Se determinaron los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. **A:** Expresión del ARNm de *GPRC5A*. IL-1 β (5 ng/ml) y anakinra/IL1RN (ANK) (10 ng/ml). **B:** Expresión del ARNm de *IL-1 β* ; IL-1 β (5 ng/ml) y anakinra/IL1RN (ANK) (10 ng/ml) **C:** Expresión del ARNm de *GPRC5A*. Curva de concentración con el inhibidor de SGK1 GSK650394 (0,1;1;10 y 20 μ M) **D:** Técnica de doble ionóforo con 5 y 75 mM de ión Cl⁻. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* p<0.05; *** p<0,001).

FIGURA A	Ctl	Tratamientos				
		TPA	IL-1 β	IL-1 β +TPA	ANK	ANK+TPA
	1,00 \pm 0,02	14,44 \pm 0,50	1,20 \pm 0,026	13,20 \pm 0,68	1,22 \pm 0,082	13,81 \pm 0,094
FIGURA C			Inhibidor SGK1 (μ M)			
	Ctl	TPA	0,1	1	10	20
	1,00 \pm 0,04	24,52 \pm 2,42	1,95 \pm 0,13	3,62 \pm 0,73	13,43 \pm 2,17	9,52 \pm 1,34
			Inhibidor SGK1 (μ M) + TPA			
			0,1	1	10	20
			27,17 \pm 0,83	26,51 \pm 2,84	18,32 \pm 3,10	6,39 \pm 0,36

FIGURA B	Ctl	ANK	IL-1 β	
		1,00 \pm 0,08	0,76 \pm 0,18	2,51 \pm 0,53
FIGURA D	Cloruro (mM)			
	5	75	5	75
			+TPA	
	1,00 \pm 0,07	1,30 \pm 0,14	17,14 \pm 0,90	14,38 \pm 1,35

Tabla 12: Datos de la Figura 31 A-D. Valores de la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3).

3. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE ROS POR TPA

Como se vio que TPA puede actuar como un promotor de tumores, su participación en el estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiada en células fagocíticas. TPA induce la liberación de ROS en leucocitos polimorfonucleares

[443], macrófagos peritoneales [446] y neutrófilos [453]. Sin embargo, el efecto de TPA sobre la producción de ROS en células epiteliales humanas está poco estudiado [479]. Debido a que la producción de ROS se encuentra involucrada en los procesos tumorales, nos interesó estudiar si TPA inducía un aumento de los niveles de ROS celular y/o mitocondrial en células de cáncer de colon T84 y los posibles efectos sobre la modulación de la expresión de GPRC5A. También estudiar si podría existir el efecto contrario, la posible modulación de los niveles de ROS por GPRC5A, ya que esto podría explicar los efectos de GPRC5A en la progresión tumoral.

3.1 Efecto del TPA en la producción de ROS celular

Para medir el nivel de producción celular total de ROS (ROS celular, cROS) en células T84 tratadas con 100 ng/ml de TPA, se utilizó la sonda DCFH-DA (10 μ M, 60 min). Al ingresar a la célula, esta sonda pierde los grupos acetato (DA) por la acción de esterasas intracelulares para quedar como DCFH. Cuando el DCFH se oxida por la acción de las ROS forma el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que se distribuye por toda la célula [524]. Por lo tanto, el aumento en la intensidad de la fluorescencia emitida refleja la concentración de cROS, la cual fue medida mediante citometría de flujo y por espectrofluorimetría.

Como se muestra en la Figura 32 A (a-b), se observó por citometría de flujo que los niveles de cROS aumentaron en las células T84 incubadas con 100 ng/ml de TPA ($5,95 \pm 0,75$, $n=2$; $p<0,05$) durante 4 h, en comparación con células T84 control sin tratar ($1,00 \pm 0,02$, $n=2$). Para realizar las citometrías las células epiteliales, cultivadas en placas, fueron levantadas con tripsina; este tratamiento podría alterar la fisiología celular y por lo tanto, los resultados se corroboraron mediante espectrofluorimetría. Como se muestra en la Figura 32 B, de nuevo se obtuvo un aumento significativo de ROS en las células tratadas con TPA ($1,75 \pm 0,07$; $p<0,01$; $n=3$) en comparación con los controles ($1,00 \pm 0,12$; $n=3$), en las mismas condiciones de incubación. El valor promedio de la fluorescencia en las células T84 sin tratar (controles) fue tomada como 1 y el resto de los niveles de fluorescencia fueron normalizados con respecto a este valor. Las diferencias medidas mediante citometría fueron mucho mayores, de 5,95:1 comparado con

1,75:1 con las placas. Es decir, las células suspendidas respondieron mucho más que las que estaban formando monocapas.

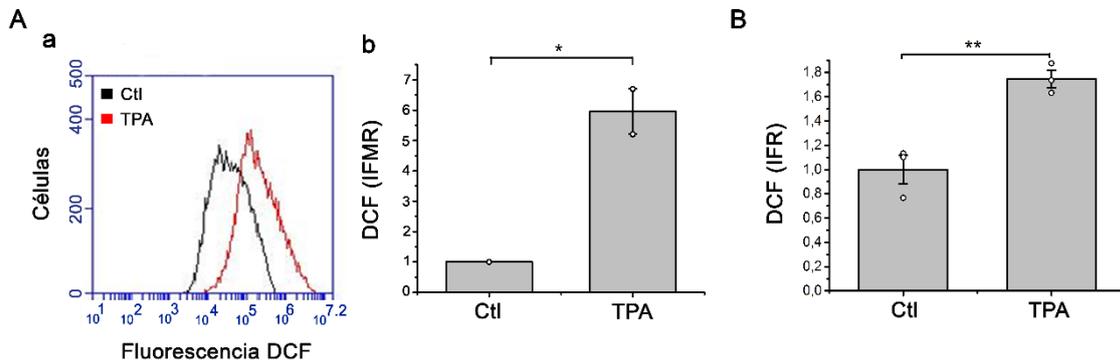


Figura 32: TPA produce un aumento en los niveles de ROS celular. Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero. A continuación, se incubaron con TPA (100 ng/ml) durante 4 h. Posteriormente se incubaron durante 60 min con la sonda DCFH-DA (20 μ M) en solución amortiguadora Hanks. **A:** Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia de DCF (a). La curva roja muestra las células tratadas con TPA y la curva negra las células control. Gráfico representativo de dos ensayos independientes (n=2). (b) Análisis estadístico de la IFMR de DCF. **B:** Análisis estadístico de la fluorescencia de DCF por espectrofluorimetría. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). (* p < 0,05 y ** p < 0,01). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). IFMR: Intensidad de fluorescencia media relativa. IFR: Intensidad de fluorescencia relativa.

3.2. Efecto del TPA en la producción de ROS mitocondrial

Con el fin de medir la producción de ROS mitocondrial (mROS) en células T84 tratadas con TPA (100 ng/ml), se utilizó la sonda MitoSOX, que es una sonda selectiva para la detección de superóxido mitocondrial. Luego de ingresar a la célula y dentro de la mitocondria, al entrar en contacto con el superóxido el MitoSOX se oxida. El producto de oxidación es altamente fluorescente (rojo) al unirse al ADN. Por lo tanto, el aumento en la intensidad de la fluorescencia emitida refleja la concentración mROS.

Como se muestra en la Figura 33 A (a-b), mediante el uso de la sonda MitoSOX (5 μ M, 10 min en solución amortiguadora Hank's), se pudo observar por citometría de flujo un aumento significativo en la producción de ROS mitocondrial en células tratadas con TPA ($2,35 \pm 0,26$; $p < 0,05$; n=2), con

respecto a las células control ($1,00 \pm 0,13$; $n=2$). Estos datos fueron confirmados por fluorimetría de las células cultivadas en placas (sin removerlas), observándose también un aumento significativo de ROS mitocondrial en las células tratadas con TPA ($3,45 \pm 0,63$; $p<0,05$; $n=2$), con respecto a las células controles ($1,00 \pm 0,25817$; $n=2$) (Figura 33 B). El valor promedio de la fluorescencia en las células T84 sin tratar (controles) fue tomada como 1 y el resto de los niveles de fluorescencia fueron normalizados con respecto a este valor. En este caso fue un poco más sensible el método en placas.

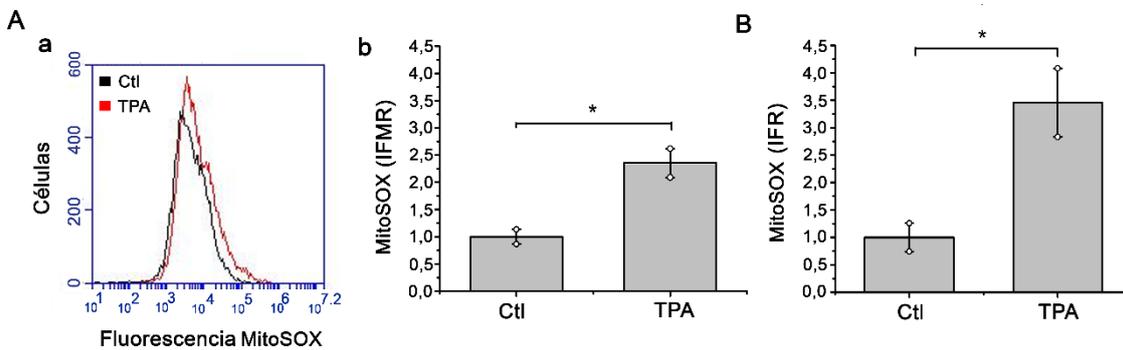


Figura 33: TPA produce un aumento en los niveles de ROS mitocondriales. Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero. A continuación, se incubaron con TPA (100 ng/ml) durante 4 h, y posteriormente se incubaron durante 15 min con la sonda MitoSOX (5 μ M) en solución amortiguadora Hanks. **A:** Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia de MitoSOX (a) La curva roja muestra las células tratadas con TPA y la curva negra las células control. Gráfico representativo de dos ensayos independientes ($n=2$). (b) Análisis estadístico de la IFMR de MitoSOX. **B:** Análisis de la fluorescencia de MitoSOX por fluorimetría. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de dos experimentos independientes. * indica $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). IFMR: Intensidad de fluorescencia media relativa. IFR: Intensidad de fluorescencia relativa.

4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE *GPRC5A* POR ROS

Las vías de señalización que responden a ROS están elevadas en muchos tipos de cáncer, donde participan en el crecimiento/proliferación celular, diferenciación, síntesis de proteínas, metabolismo de la glucosa, supervivencia celular e inflamación [225]. Las especies reactivas de oxígeno, particularmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pueden actuar como segundos mensajeros en

la señalización celular [227-231]. El H_2O_2 regula la actividad de las proteínas oxidando de manera reversible a los grupos sulfhidrilo y de manera irreversible a otros grupos funcionales [225, 232, 233]. Entre las proteínas que regulan están incluidas las tirosina-fosfatasa, las tirosina-quinasa, los receptores tirosina-quinasa y los factores de transcripción [225, 232, 233]. Está comprobado que varias isoformas de PKC son activadas por H_2O_2 [234, 235]. De manera indirecta, el H_2O_2 afecta la fosforilación de su sitio activo, y se cree que es por medio de la inhibición de las fosfatasa. El H_2O_2 es un oxidante suave que puede oxidar los residuos de cisteína en las proteínas. Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) contienen un residuo de cisteína esencial en el sitio activo característico que es importante para la función catalítica. Por lo tanto, los PTP experimentan una inactivación mediada por H_2O_2 debido a la oxidación de estos importantes residuos de cisteína [236-238].

Para estudiar si la expresión del ARNm de *GPRC5A* podría estar modulada por las ROS, se incubaron las células T84 con dos antioxidantes por separado: inhibidor de la enzima NADPH oxidasa 2 citoplasmática (GSK 2795039) y N-acetil-L-cisteína (NAC), en presencia o ausencia de TPA (100 ng/ml, 4 h). La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 , formando el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es convertido rápidamente a H_2O_2 , radical hidroxilo y ácido hipocloroso [573]. NAC es un antioxidante que se cree que actúa por diversos mecanismos (ver Figura 14 en la sección Introducción). En la Figura 34, se muestra la medición de la expresión de *GPRC5A* por RT-PCR en tiempo real luego del tratamiento con el inhibidor de NOX GSK 2795039 (10 μ M) y con NAC (5 mM). No se observaron cambios en la expresión del ARNm de *GPRC5A*. Estos resultados sugieren que las ROS no participan de la regulación de la expresión de *GPRC5A*. Esto concuerda con los resultados que indican que la vía de $IL-1\beta$ (que incluye la activación de ROS [274, 574]) no está involucrada en la regulación de *GPRC5A*. Los valores de la media \pm SE se detallan en la Tabla 13.

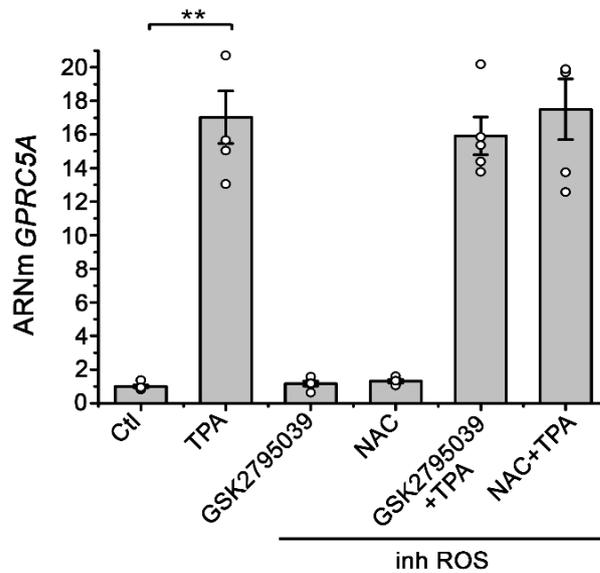


Figura 34: GPRC5A no es modulado por ROS. Células T84 se preincubaron 24 h en medio libre de suero y a continuación se incubaron con o sin TPA (100 ng/ml) durante 4 h en presencia de dos antioxidantes por separado, iNOX: inhibidor de la enzima NADPH oxidasa citoplasmática, GSK2795039 (10 μ M) y NAC: N-acetil-L-cisteína (5 mM). Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles (Ctl). Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de cinco experimentos independientes (n=5). (** $p < 0,01$). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis).

Ctl	TPA	iNOX	NAC	iNOX	NAC
				+TPA	
1,00 \pm 0,10	17,03 \pm 1,56	1,16 \pm 0,15	1,31 \pm 0,11	15,91 \pm 1,13	17,50 \pm 1,81

Tabla 13: Datos de la Figura 34. Valores de la media \pm SE de cinco experimentos independientes (n=5).

5. SILENCIAMIENTO GÉNICO DE GPRC5A POR LA TÉCNICA CRISPR/Cas9

Con el fin de iniciar estudios funcionales sobre la proteína GPRC5A, decidimos realizar un *knock-out* (KO) del gen *GPRC5A* por medio del sistema de edición génica CRISPR/Cas9. Con este fin se transfectaron células T84 con cuatro plásmidos pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro (ABM) (cada uno por separado), tres de ellos con distintas secuencias ARN guía (ARNg): pARNg1,

pARNg2 y pARNg3; y el cuarto plásmido con una construcción ARNg aleatoria no codificante como control: pCtl (las secuencias se indican en la Figura 22, sección M&M, pág. 80). El uso de tres construcciones distintas por separado aumenta la probabilidad de obtener el *KO* de *PEIG-1/GPRC5A*.

5.1. Validación del silenciamiento del ARNm de *GPRC5A*

Con el objetivo de comprobar el funcionamiento de la técnica CRISPR/Cas9 en células T84, se midió la expresión del ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR en tiempo real. Células conteniendo la construcción CRISPR/Cas9, deberían presentar una expresión de *GPRC5A* nula, en el caso que fuese total el silenciamiento. TPA no debería tener efectos en la expresión del gen.

Como se muestra en la Figura 35 A, mediante RT-PCR en tiempo real, luego de 12 pasajes, se pudo observar una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) en la expresión del ARNm de *GPRC5A* en las células T84 transfectadas con los plásmidos pARNg1, pARNg2 y pARNg3, con respecto a las células sin transfectar. Además, no se observaron cambios en los niveles de ARNm de *GPRC5A* en células T84 transfectadas con el plásmido control (pCtl) respecto a las células T84 sin transfectar, lo que significa que el plásmido sin una secuencia ARNg codificante no interfiere en la expresión del gen.

Los ensayos posteriores se realizaron con la nueva línea celular T84, transfectada con el plásmido CRISPR/Cas9 conteniendo la secuencia ARNg3 (T84/pARNg3) y con las células T84 transfectadas con el plásmido control (T84/pCtl). Las razones de la elección de esta línea celular fueron la disminución del 60 % de la expresión del ARNm de *GPRC5A*, luego de 60 días de selección (pasajes a partir del 12) con el antibiótico puromicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y el mejor estado de las células (menos dañadas por la electroporación) comparadas con las células T84/pARNg2 que también presentaron una disminución en la expresión del 60 %.

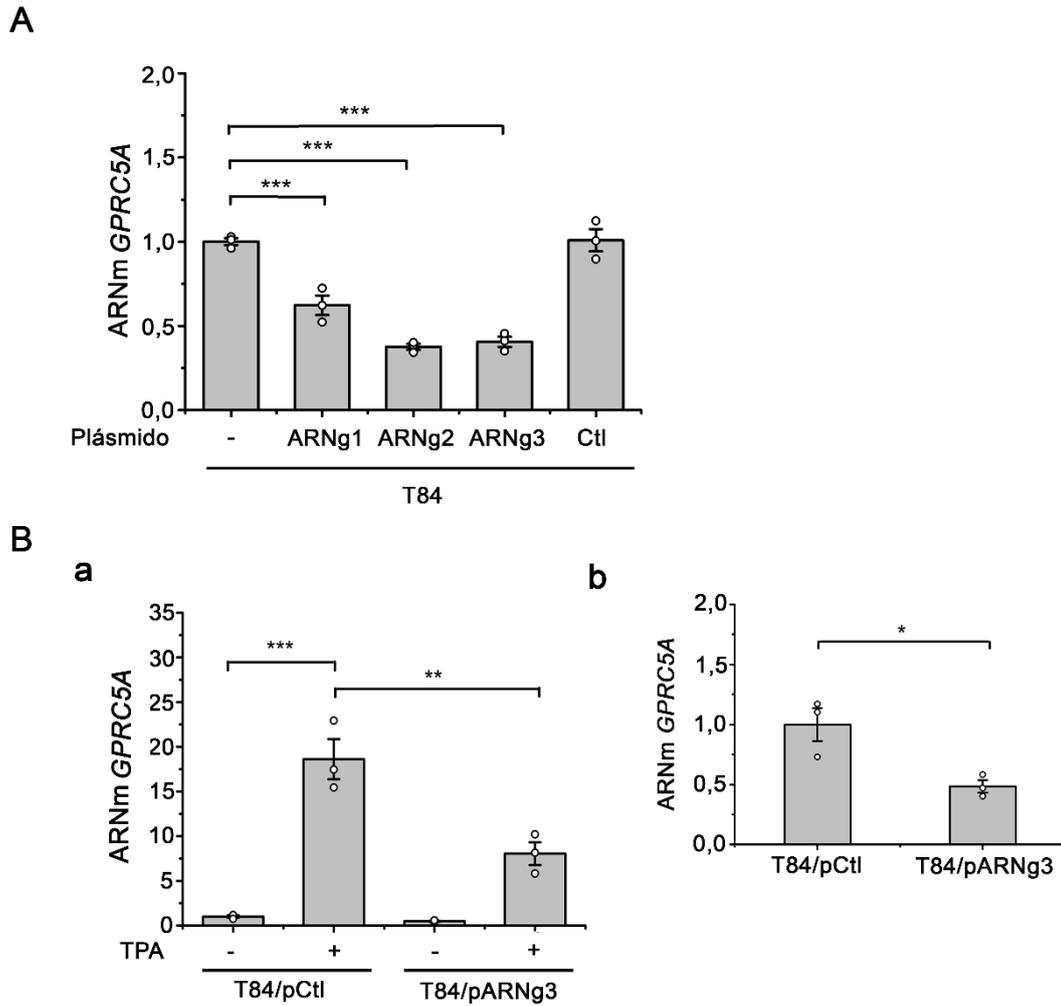


Figura 35: Reducción de los niveles de ARNm en células T84 por la técnica CRISPR/Cas9. Medición de la expresión del ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR en tiempo real. **A:** Células T84 transfectadas con plásmidos que contienen la construcción CISPR/Cas9 y una secuencia ARN guía (ARNg) diferente para cada plásmido (pARNg1, pARNg2 y pARNg3), y un plásmido control el cual tiene una secuencia ARNg aleatoria no codificante (pCtl) y células T84 sin transfectar. **B:** (a) Células T84 trasfectadas con el plásmido pARNg3 y células T84 transfectadas con el plásmido control pCtl, tratadas con o sin TPA. (b) Diferencias en los niveles basales del ARNm de *GPRC5A* en las células T84/pCtl y T84/pARNg3. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles. Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis).

El paso siguiente fue estudiar el efecto de TPA sobre estas células. Células T84/pARNg3 y células control T84/pCtl, luego de la incubación durante 24 h en medio sin suero, fueron tratadas con TPA (100 ng/ml) durante 4 h.

Posteriormente, se midió la expresión del ARNm de *GPRC5A* por RT-PCR en tiempo real (Figura 35 B). Células T84/pARNg3 con tratamiento con TPA ($8,05 \pm 1,27$; $p < 0,01$; $n=3$) redujeron ~60 % la expresión del ARNm de *GPRC5A* con respecto a las células control T84/pCtl también tratadas con TPA ($18,61 \pm 2,24$; $n=3$). Aproximadamente esta misma disminución fue observada en los tratamientos sin TPA, donde las células T84/pARNg3 ($0,48 \pm 0,05$; $p < 0,05$; $n=3$) redujeron ~60 % la expresión de *GPRC5A* con respecto a las células controles T84/pCtl ($1,00 \pm 0,14$; $n=3$). Los valores de la media \pm SE ($n=3$) de la Figura 35 A se detallan en la Tabla 14.

Sin plásmido	Plásmidos			
	ARNg1	ARNg2	ARNg3	Ctl
$1,00 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,06^{***}$	$0,37 \pm 0,02^{***}$	$0,40 \pm 0,03^{***}$	$1,00 \pm 0,06$

Tabla 14: Datos de la **Figura 35 A**. Valores de la expresión del ARNm de *GPRC5A* expresado como la media \pm SE de tres experimentos independientes ($n=3$). *** Indica $p < 0,001$ con respecto a las células sin plásmido.

5.2. Silenciamiento de la expresión proteica de GPRC5A

Para estudiar si la técnica de edición génica CRISPR/Cas9, además de una reducción en los niveles de ARNm, produjo una reducción en los niveles de proteína de *GPRC5A*, se utilizaron tres técnicas distintas: WB, microscopía confocal y citometría de flujo.

En la Figura 36 A, se puede observar por WB una importante reducción de los niveles de proteína *GPRC5A* en células T84/pARNg3 tratadas con TPA, con respecto a las células T84/pCtl tratadas con TPA. Como era de esperarse, el *KO* del gen *GPRC5A* fue eficiente ya que no se observó inducción con TPA. Debido a los bajos niveles basales de proteína en las células control T84/Ctl, no se pudo observar la banda correspondiente a *GPRC5A*.

Para corroborar los resultados anteriores y estudiar la localización de *GPRC5A*, se realizó inmunofluorescencia en células T84/pARNg3 y células T84/pCtl crecidas en portaobjetos e incubadas con anti-*GPRC5A* (ver M&M), en presencia o ausencia de TPA (100 ng/ml, 4 h). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Figura 36 B). Cualitativamente, se puede observar un

aumento de proteína GPRC5A en células T84/pCtl tratadas con TPA, con respecto a las mismas células sin tratamiento con TPA. Por otro lado, se observa una disminución de los niveles basales de proteína en células T84/pARNg3 comparadas con las células T84/pCtl. En el caso de las células T84/pARNg3 incubadas con TPA, se puede observar un menor nivel de marcación comparadas con las células T84/Ctl tratadas con TPA, aunque presentaron un leve aumento en los niveles de la proteína comparadas con las células T84/pARNg3 sin TPA. La razón de este leve aumento se puede deber a que las células no fueron aún clonadas, por lo que podría existir una pequeña proporción de células no silenciadas para la expresión de GPRC5A. Sin embargo, el silenciamiento alcanzado fue muy importante. Un dato interesante, obtenido a partir de estas imágenes de inmunofluorescencia, es la localización subcelular mayoritaria de GPRC5A en el borde celular.

Para confirmar la edición génica mediante una técnica cuantitativa, se midió la expresión de GPRC5A por citometría de flujo (Figura 36 C). En concordancia con los resultados anteriores, se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia media de la señal de anti-GPRC5A-FITC en células T84/pARNg3 ($0,54 \pm 0,04$; $p < 0,05$; $n=3$) con respecto a las células T84/pCtl ($1,00 \pm 0,04$; $n=3$). Se observó una diferencia similar (~50 % de inhibición) en las células T84/pARNg3 tratadas con TPA ($0,82 \pm 0,07$; $p < 0,01$; $n=3$), comparadas con las células T84/pCtl con TPA ($1,52 \pm 0,14$; $n=3$).

En todos los ensayos, el valor promedio de cada medición de las células T84/pCtl sin tratar fue tomada como 1 y el resto de las mediciones fueron normalizados con respecto a este valor.

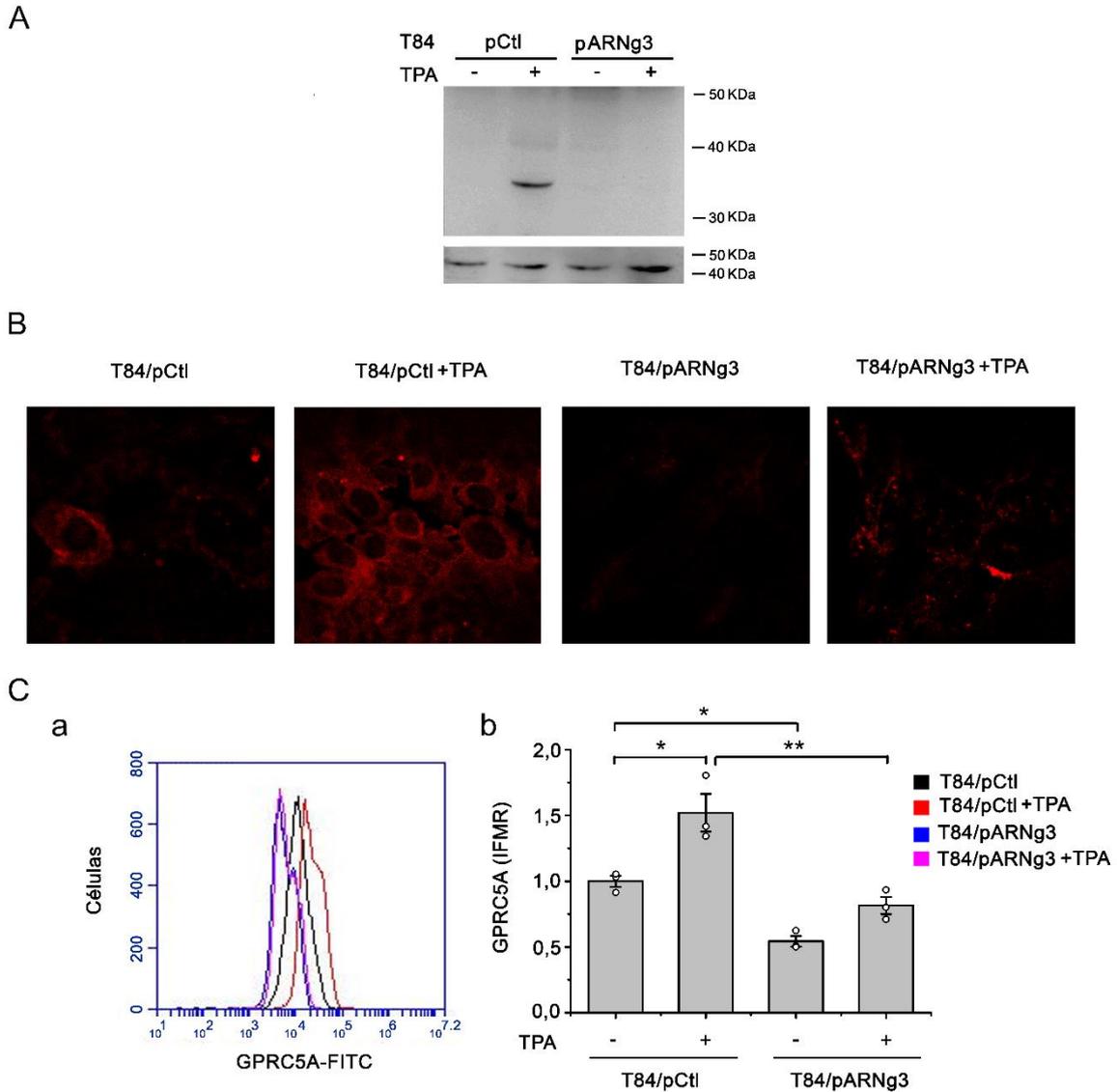


Figura 36: Reducción de los niveles de proteína de GPRC5A por la técnica CRISPR/Cas9.

Se generó un *KO* del gen *GPRC5A* por la técnica CRISPR/Cas9 y se midió por tres técnicas distintas los niveles de proteína GPRC5A en células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con TPA (100 ng/ml) durante 4 h. **A:** Western Blot (WB), Anti-GPRC5A. Calle 1: células T84/pCtl sin TPA; Calle 2: células T84/pCtl con TPA; Calle 3: células T84/pARNg3 sin TPA; Calle 4: células T84/pARNg3 con TPA. **B:** Microscopía confocal. **C:** Citometría de flujo. (a) Citometría representativa de células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con 100 ng/ml de TPA. (b) Intensidad de fluorescencia media relativa (IFMR) de tres citometrías. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles. Las mediciones se realizaron por triplicado. La medición del panel A y B se realizaron por duplicado (n=2). Los datos del panel C (b) se expresaron como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6. ROL DE *GPRC5A* EN LOS NIVELES DE ROS INDUCIDOS POR TPA

Como se demostró anteriormente, el tratamiento con TPA indujo un aumento significativo en la producción de cROS y de mROS, aunque este aumento no estuvo involucrado en la inducción de la expresión de *GPRC5A*. Debido a que la función de *GPRC5A* es muy poco conocida, hipotetizamos que *GPRC5A* podría estar involucrada en la inducción de la producción de ROS mediada por TPA. De este modo, *GPRC5A* podría cumplir una función en la regulación de ROS. Aprovechando el modelo de *knock-out* de *GPRC5A* por CRISPR/Cas9 que generamos, decidimos estudiar la posible función de *GPRC5A* como modulador de la producción de ROS celular.

6.1. Medición de los niveles de ROS celular en células T84/pARNg3

Para estudiar si *GPRC5A* está implicado en el aumento de cROS inducido por TPA, células T84/pARNg3 y células T84/pCtl se incubaron con la sonda DCFH-DA, como se describió anteriormente en M&M, en presencia o ausencia de TPA. Como control positivo se utilizaron dos concentraciones diferentes de H₂O₂, 250 μM y 500 μM [526]. Como se muestra en la Figura 37 A, obtenida por citometría de flujo, no hubo diferencias significativas en la producción de cROS en células T84/pARNg3 tratadas con TPA. Los niveles basales de T84/pARNg3, comparadas con las células control, tampoco presentaron cambios. Mediante otra técnica, espectrofluorimetría en placa, se obtuvieron iguales resultados donde tampoco se pudo observar diferencias significativas en la producción de cROS en células T84/pARNg3 tratadas con TPA ($1,20 \pm 0,05$; $p < 0,05$; $n=3$) respecto sin TPA ($0,73 \pm 0,06$; $p < 0,05$; $n=3$).

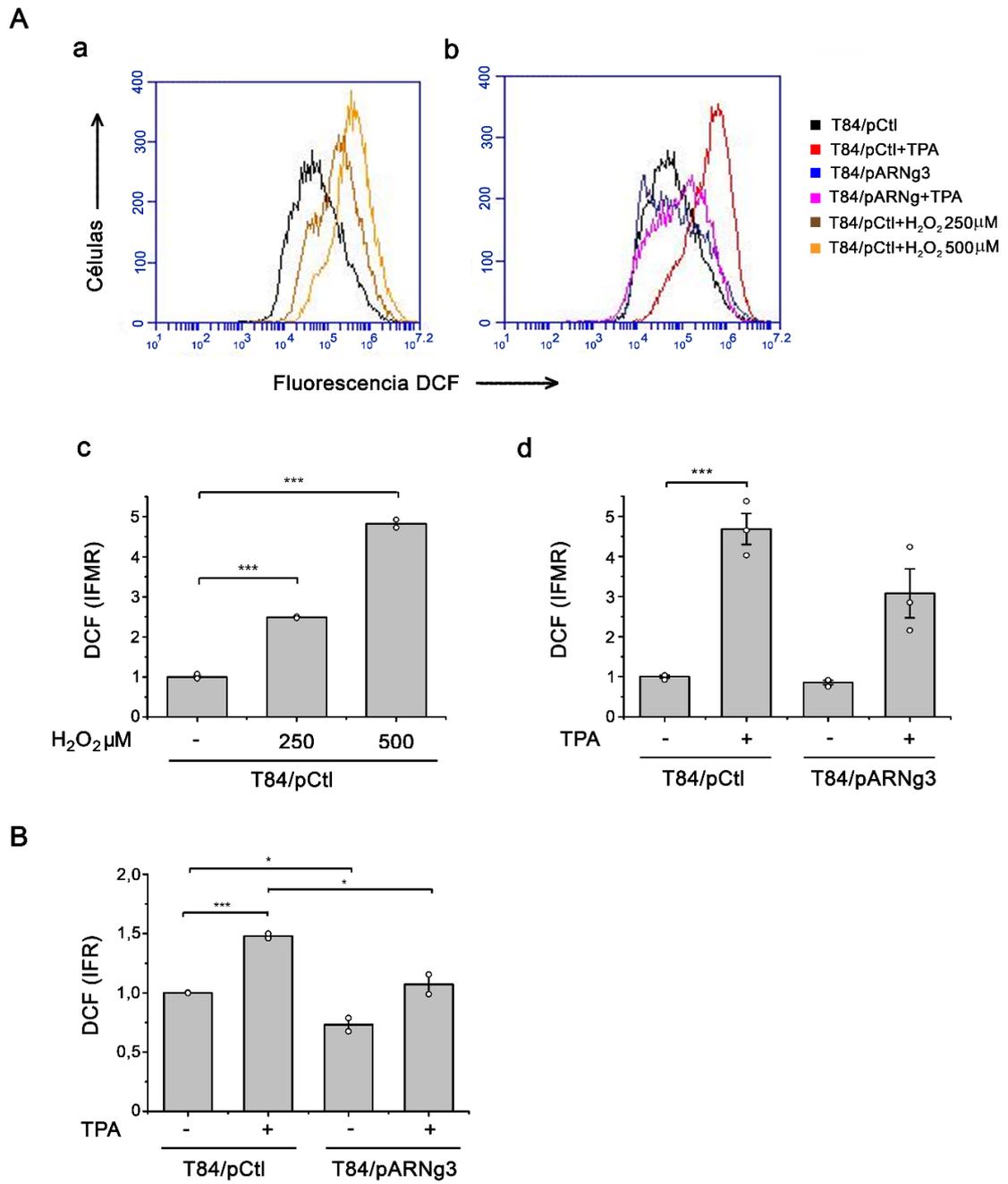


Figura 37: Disminución de los niveles de ROS celular en células T84/pARNg3 de GPRC5A. Células T84/pARNg3 y células que expresan GPRC5A T84/pCtl se preincubaron 24 h en medio libre de suero. A continuación, se incubaron con TPA (100 ng/ml) durante 4 h, y posteriormente se incubaron durante 60 min con la sonda DCFH-DA (20 μ M) en solución amortiguadora Hanks. **A:** Citometría de flujo. (a) Citometría representativa de células T84/pCtl tratadas con 250 y 500 μ M de H₂O₂. (b) Citometría representativa de células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con 100 ng/ml de TPA. (c) Intensidad de fluorescencia media relativa (IFMR) de tres citometrías de células T84/pCtl tratadas con 250 y 500 μ M de H₂O₂. (d) IFMR de tres citometrías de células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con 100 ng/ml de TPA. **B:** Espectrofluorimetría. Intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de tres mediciones fluorométricas. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles. Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

A diferencia de la citometría, sí fue posible observar una disminución significativa ($p < 0,05$) en la producción de cROS, en los niveles basales de células T84/pARNg3 en comparación con T84/pCtl ($1,00 \pm 0,01$; $n=3$) (Figura 37 B). En conclusión, fue necesaria la presencia del receptor GPRC5A para que se evidencie un aumento de las cROS inducido por TPA, es por ello que en células KO no fue posible ver cambios de cROS en tratamientos con TPA. GPRC5A estaría mediando la inducción de ROS por el éster de forbol.

T84/pCtl+H2O2 (μ M)			T84/pCtl		T84/pARNg3	
-	250	500	-	TPA	-	TPA
$1,00 \pm 0,04$	$2,49 \pm 0,02$	$4,83 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,04$	$4,68 \pm 0,39$	$0,85 \pm 0,05$	$3,08 \pm 0,61$

Tabla 15: Datos de la Figura 37 A (c y d). Valores de la media \pm SE de tres experimentos independientes ($n=3$). *** Indica $p < 0,001$ con respecto a las células sin plásmido.

6.2. Medición de los niveles de ROS mitocondriales en células T84/pARNg3

Para estudiar si GPRC5A está implicado en la regulación de mROS, las células T84/pARNg3 y las células que expresan GPRC5A T84/pCtl fueron incubaron con la sonda MitoSOX, como se describió anteriormente en M&M, y

con TPA (100 ng/ml, 4 h). Como control positivo se utilizó rotenona (10 μ M), un inhibidor del complejo I mitocondrial, lo que genera un aumento en la generación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) [575]. Como control negativo se utilizó el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa citoplasmática 2 (NOX-2) GSK 2795039 (10 μ M) [287]. En la Figura 38, se observa que las células T84/pARNg3 tratadas con TPA ($2,85 \pm 0,05$; $p < 0,001$; $n=2$) no tuvieron cambios significativos en la producción de mROS comparadas con las células T84/pARNg3 sin TPA ($1,37 \pm 0,03$; $n=2$). Es decir, TPA no pudo inducir el aumento de mROS observado en las células que si expresan GPRC5A ($4,11 \pm 0,08$; $n=2$). No se evidenciaron cambios en los niveles basales entre las células T84/pARNg3 y T84/pCtl ($1,00 \pm 0,04$; $n=2$). Estos resultados sugieren que GPRC5A podría participar de la modulación de mROS inducida por TPA.

Los valores de la media \pm SE ($n=2$) se detallan en la Tabla 16.

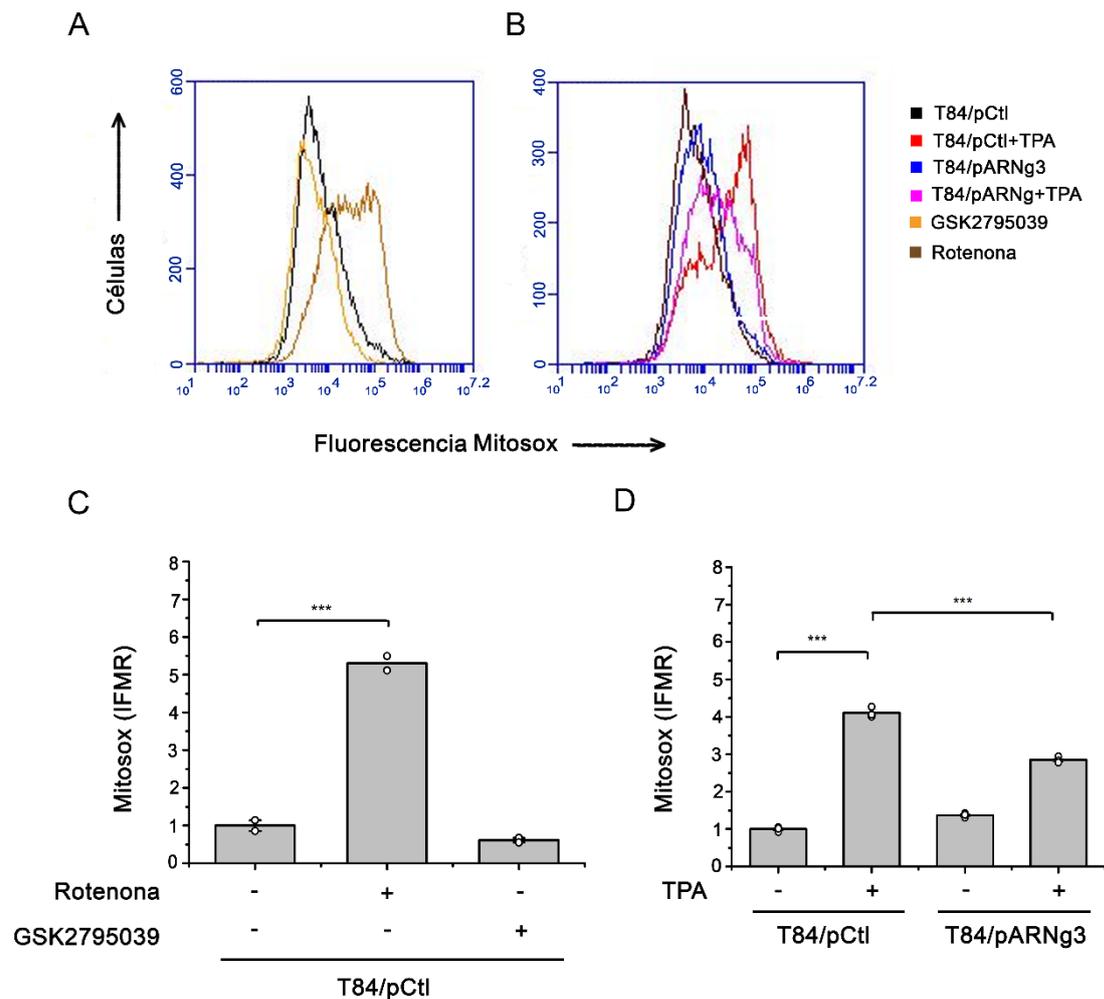


Figura 38: Disminución de los niveles de ROS mitocondriales en células T84/pARNg3.

Células T84/pARNg3 y células que expresan GPRC5A T84/pCtl, se preincubaron 24 h en medio libre de suero. Luego se incubaron con TPA (100 ng/ml) durante 4 h, y posteriormente se incubaron durante 15 min con la sonda Mitosox (5 µM) en solución amortiguadora Hanks. Se midió la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. **A:** Citometría representativa de células T84/pCtl tratadas con rotenona (10 uM) y el inhibidor de NOX GSK 2795039 (10 uM). **B:** Citometría representativa de células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con 100 ng/ml de TPA. **C:** Intensidad de fluorescencia media relativa (IFMR) de MitoSOX de tres citometrías de células T84/pCtl tratadas rotenona (10 uM) y el inhibidor de NOX GSK 2795039 (10 uM). **D:** IFMR de MitoSOX de tres citometrías de células T84/pARNg3 y T84/pCtl tratadas con 100 ng/ml de TPA. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles. Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresan como la media ± SE de dos experimentos independientes (n=2). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (***) $p < 0,001$.

T84/pCtl+inh ROS			T84/pCtl		T84/pARNg3	
-	Rotenona	iNOX	-	TPA	-	TPA
1,00 ± 0,14	5,30 ± 0,19	0,61 ± 0,06	1,00 ± 0,14	4,11 ± 0,08	1,37 ± 0,03	2,85 ± 0,05

Tabla 16: Datos de la Figura 38 C-D. Valores de la media ± SE de dos experimentos independientes (n=2).

7. ROL DE GPRC5A EN LA APOPTOSIS CELULAR

7.1. Evaluación de la apoptosis con anexina V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD)

La anexina V, en presencia de Ca^{2+} , se une a la fosfatidilserina que se externaliza en la membrana plasmática de las células en apoptosis. La anexina V también puede teñir las células necróticas porque estas células tienen membranas rotas que permiten que la anexina V acceda a toda la membrana plasmática. Sin embargo, las células apoptóticas se pueden distinguir de las células necróticas mediante la tinción conjunta con 7-amino-actinomicina D (7-AAD), porque el 7-AAD ingresa a las células necróticas donde se ha alterado la permeabilidad, pero no a las células apoptóticas. A diferencia del yoduro de propidio (PI), el espectro de emisión del 7-AAD permite que se use junto con otros fluorocromos (por ejemplo FITC) con una superposición mínima de

emisión de fluorescencia [576, 577]. Al teñir las células con anexina V unida a un fluoróforo (FITC) y 7-AAD se pueden diferenciar las células sanas (anexinaV⁻/7-AAD⁻), en apoptosis temprana (anexinaV⁺/7-AAD⁻), células en apoptosis tardía (anexinaV⁺/7-AAD⁺) y células necróticas (anexinaV⁻/7-AAD⁺).

Células T84/pARNg3 (células *KO GPRC5A*) y células T84/pCtl que expresan GPRC5A, fueron incubadas con TPA (100 ng/ml), como se describió anteriormente, e incubadas con anexinaV-FITC y 7-AAD como se detalla en M&M.

El gráfico anexinaV-FITC vs 7-AAD (Figura 39 A), es representativo de tres ensayos independientes. Se indica en cada cuadrante el porcentaje de cada población. En el cuadrante inferior izquierdo (“lower left”, LL), se observa la población sana anexinaV⁻/7-AAD⁻, la cual no está en apoptosis ni en necrosis. En el cuadrante inferior derecho (“lower right”, LR), se observa la población anexinaV⁺/7-AAD⁻, es decir, células en apoptosis temprana, donde se puede observar que el tratamiento de las células T84/pCtl con TPA disminuyó la población, con respecto a las T84/pCtl, pasando de un 43,3 % a un 15,7 %. Pero este efecto por TPA no fue observado en las células T84/pARNg3, donde el porcentaje fue del 50,0 % y 50,3 % en células T84/pARNg3 sin y con TPA respectivamente. Si se comparan los niveles basales en las células T84/pCtl y T84/pARNg3, en éstas últimas hubo un aumento en la apoptosis temprana, pasando de una población del 43,3 % a 50,0 %. En el cuadrante superior derecho (“upper right”, UR), se observa la población anexinaV⁺/7-AAD⁺, células en apoptosis tardía, donde las células T84/pCtl comparadas con las T84/pCtl con TPA, presentaron una leve disminución en la apoptosis tardía, siendo para las células T84/pCtl del 10,2 % y para las T84/pCtl con TPA del 6,7 %. Por otro lado, se observó un leve aumento de esta población en células T84/pARNg3 con TPA (17,2 %) comparadas con las células T84/pARNg3 sin TPA (14,8 %). El cuadrante superior izquierdo (“upper left”, UL) corresponde a la población en necrosis donde no se observaron, en las distintas líneas celulares ni tampoco en los tratamientos con TPA, variaciones significativas.

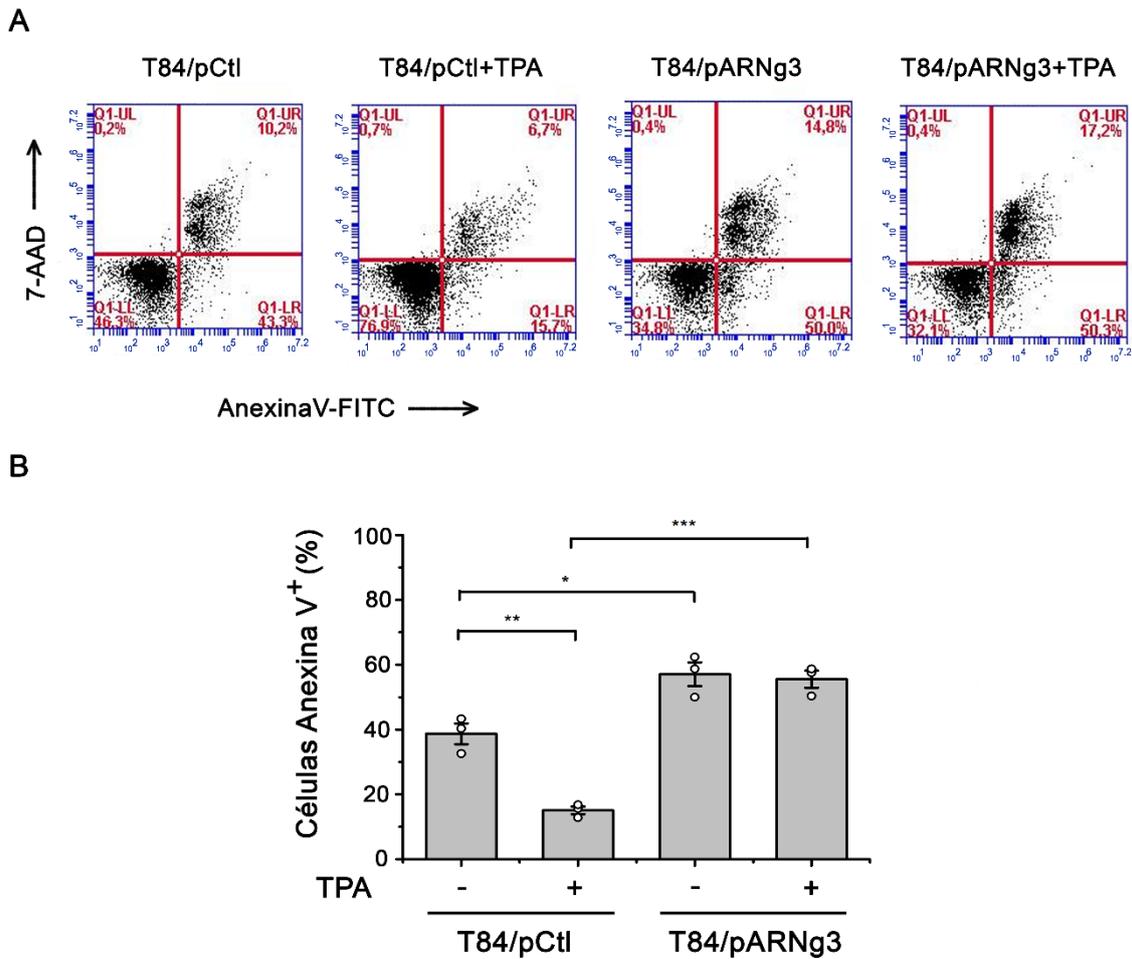


Figura 39: Medición de la apoptosis con anexina V y 7-AAD. Células T84/pARNg3 y células que expresan GPRC5A T84/pCtl, se preincubaron 24 h en medio libre de suero. Luego se incubaron con 100 ng/ml de TPA durante 4 h, y posteriormente se incubaron 15 min con anexina V unida al fluorocromo FITC y 5 min con 7-AAD. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. Parte de los eventos del cuadrante inferior derecho se encuentran sobre el eje al ser 7-AAD⁻, lo que no permite visualizarlos. **A:** Citometría representativa de células T84/pCtl y T84/pARNg3 tratadas con y sin TPA. **B:** Porcentaje de células anexinaV⁺/7-AAD⁻ de tres citometrías de células T84/pCtl y T84/pARNg3 tratadas con y sin TPA. Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media ± SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (**p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001).

La Figura 39 B muestra el porcentaje de células AnexinaV⁺/7-ADD⁻ en apoptosis (cuadrante inferior derecho) de tres experimentos independientes. Se analizaron solo las células marcadas con AnexinaV⁺ debido a que las células en necrosis también pueden llegar a presentar tinción con Anexina y ser

confundidas con las células en apoptosis tardía. El tratamiento con TPA en células T84/pCtl ($15,1 \pm 1,19$ %; $p < 0.01$; $n=3$) disminuyó significativamente el porcentaje de células anexinaV⁺, es decir el número de células que presentaron fosfatidilserina externalizada, comparado con las células T84/pCtl sin TPA ($38,73 \pm 3,19$ %; $n=3$). Con respecto a las células T84/pARNg3, que tienen disminuida la expresión de *GPRC5A*, se vio que el tratamiento con TPA ($55,53 \pm 2,63$ %; $n=3$) no afectó el porcentaje de células anexinaV⁺, con respecto a las células T84/pARNg3 sin TPA ($57,03 \pm 3,67$ %; $n=3$). Si se comparan los niveles basales de las células T84/pCtl y T84/pARNg3, estas últimas presentaron un mayor nivel basal de fosfatidilserina expuesta. Por lo tanto, TPA en células control indujo una disminución de la apoptosis, pero esto no fue posible en células que no presentan el receptor *GPRC5A*. Con respecto a los niveles basales, las células T84/pARNg3 presentaron mayor apoptosis que las células T84/pCtl.

7.2. Medición del potencial de membrana mitocondrial

Cuando las células entran en apoptosis, se produce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) que se puede evaluar con la sonda TMRE. El TMRE ingresa dentro de las mitocondrias, y al tener carga positiva, se acumula en el interior de las mitocondrias activas con carga negativa, por lo que fluoresce. Al disminuir el potencial en células en apoptosis, disminuye la acumulación de la sonda, y por lo tanto disminuye el nivel de fluorescencia de las mitocondrias. Como controles positivos se utilizaron carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) y carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), dos compuestos que aumentan la permeabilidad de protones a través de las membranas internas mitocondriales, reduciendo así el potencial transmembrana y despolarizando las mitocondrias [578].

La Figura 40, obtenida mediante citometría de flujo, muestra un aumento de la fluorescencia de TMRE en células T84/pCtl tratadas con TPA, en comparación con la misma línea celular sin tratamiento con TPA. Por otro lado, la ausencia de *GPRC5A* en células T84/pARNg3 evitó el aumento tan pronunciado en la marca de TMRE inducido por TPA observado en los controles. No hubo variaciones significativas en los niveles basales en ambas líneas celular. Estos resultados sugieren que TPA genera una menor despolarización de la membrana

mitocondrial (mayor marca de TMRE) en células donde está presente el receptor GPRC5A, pero no en células T84/pARNg3. Es decir, es necesaria la presencia del receptor GPRC5A, para que TPA pueda inducir este cambio. Por otro lado, no hubo variaciones del Ψ_m en los niveles basales de ámbas líneas celulares comparadas entre ellas. Los valores de la media \pm SE (n=3) se detallan en la Tabla 17.

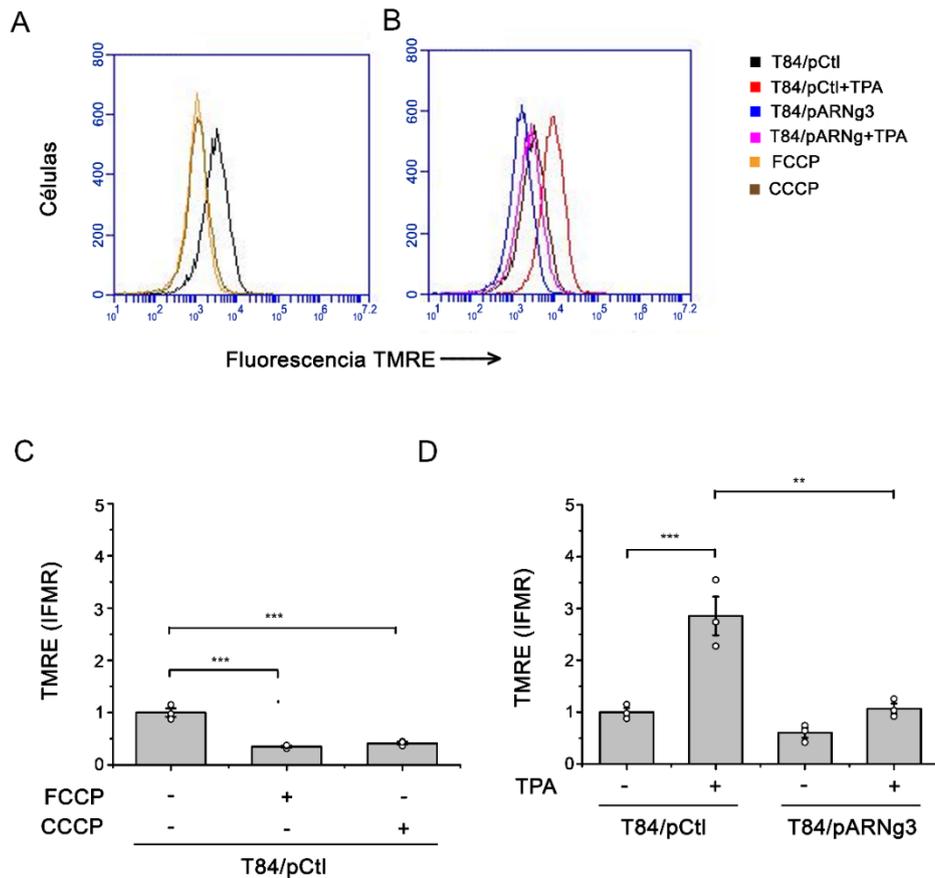


Figura 40: Medición de la apoptosis a través de la evaluación del potencial mitocondrial.

Células T84/pARNg3 y células que expresan GPRC5A T84/pCtl, se preincubaron 24 h en medio libre de suero. Luego se incubaron con 100 ng/ml de TPA durante 4 h, y posteriormente se incubaron con la sonda TMRE. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. **A:** Citometría representativa de células T84/pCtl tratadas con FCCP y CCCP, dos agentes despolarizantes mitocondriales. **B:** Citometría representativa de células T84/pCtl y T84/pARNg3 tratadas con TPA. **C:** Intensidad de fluorescencia media relativa (IFMR) de TMRE de tres citometrías de células T84/pCtl y T84/pARNg3 tratadas con FCCP y CCCP. **(D)** IFMR de TMRE de tres citometrías de células T84/pCtl y T84/pARNg3 tratadas con TPA. Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

T84/pCtl			T84/pCtl		T84/pARNg3	
-	FCCP	CCCP	-	TPA	-	TPA
1,00 ± 0,08	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,03	1,00 ± 0,08	2,85 ± 0,37	0,60 ± 0,09	1,06 ± 0,10

Tabla 17: Datos de la Figura 40. Valores de la media ± SE de tres experimentos independientes (n=3).

7.3. Medición de la actividad caspasa 3, 8 y 9 mediante ensayos fluorimétricos

Durante el proceso de apoptosis se produce la activación, por clivaje, de diversas enzimas denominadas caspasas, que desencadenan los eventos que llevan a la muerte celular. Entre estas podemos diferenciar a la caspasa-9 (vía intrínseca), la caspasa-8 (vía extrínseca) y a la caspasa-3 (efectora) [312]. La evaluación de la actividad caspasa se realizó por fluorimetría, utilizando los sustratos fluorogénicos específicos Ac-AFC-DEVD (sustrato de la caspasa-3), Ac-IETD-AFC (sustrato de la caspasa-8) y Ac-LEHD-AFC (sustrato de la caspasa-9). Estos sustratos, al ser clivados por caspasas activas, liberan la fluorescencia del AFC. Para evitar la interferencia de otras proteasas celulares en la medición de la fluorescencia, se utilizaron los inhibidores de las caspasas: Ac-DEVD-CHO, inhibidor de la caspasa 3 y 9 [534, 535] y Ac-IETD-CHO inhibidor de la caspasa 8 [536].

Células T84/pCtl y T84/pARNg3, fueron incubadas con los sustratos e inhibidores específicos para evaluar cada caspasa y con TPA como se detalla en M&M. Como se puede observar en la Figura 40 A, los niveles basales de las células T84/pARNg3 presentaron un aumento significativo ($p < 0,001$) en la actividad de la caspasa 3, en comparación con las células T84/pCtl. El aumento en la actividad de la caspasa 3 refleja un aumento en la apoptosis mediada por caspasa. No se pudo ver una diferencia significativa de la actividad en los tratamientos con o sin TPA en las líneas T84/pARNg3 y T84/pCtl. La actividad de las caspasas 9 y 8 no se vieron afectadas en las dos líneas celulares, como así tampoco con el tratamiento con TPA (Figura 41 B y C). Estos resultados

sugieren un rol antiapoptótico de GPRC5A, mientras que TPA no tuvo efecto en la actividad de las caspasas.

Los valores de la media \pm SE (n=2) se detallan en la Tabla 18.

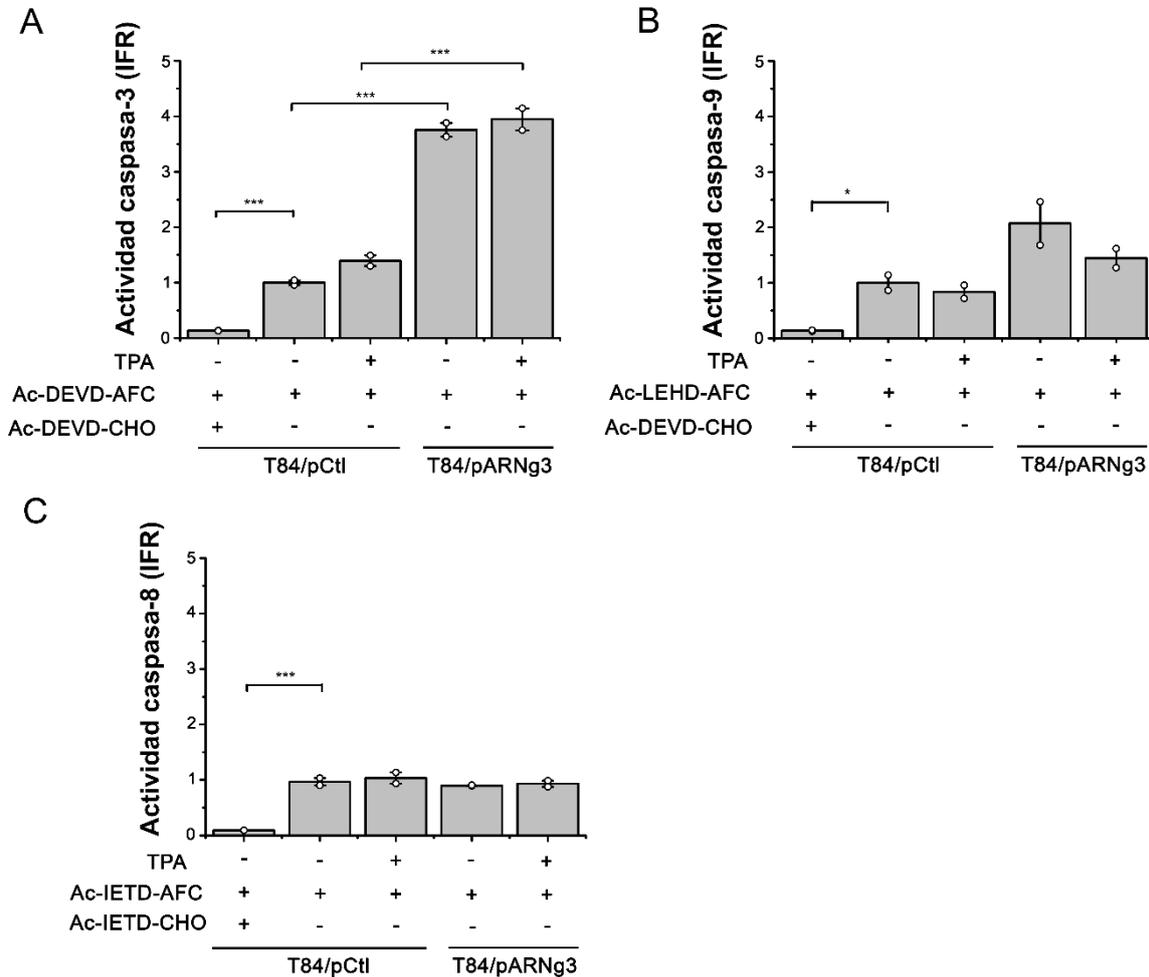


Figura 41. Medición de la actividad caspasa 3, 8 y 9 mediante ensayos fluorimétricos.

Células T84/pCtl y T84/pARNg3 se preincubaron 24 h en medio libre de suero y luego se incubaron con 100 ng/ml de TPA durante 4 h. Posteriormente los lisados celulares de estas células fueron tratados con sustratos e inhibidores de las caspasas 3, 8 y 9 y por ensayos fluorimétricos se midió la actividad de las caspasas en cada lisado. **A:** Evaluación de la actividad de la caspasa 3. Se utilizó el sustrato Ac-DEVD-AFC y el inhibidor Ac-DEVD-CHO. **B:** Medición de la actividad de la caspasa 9. Se utilizó el sustrato Ac-LEHD-AFC y el inhibidor Ac-DEVD-CHO. **C:** Medición de la actividad de la caspasa 8. Se utilizó el sustrato Ac-IETD-AFC y el inhibidor Ac-IETD-CHO. Los resultados se expresaron en relación con los valores de los controles sin TPA. Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm SE de dos experimentos independientes (n=2). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis). (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Intensidad de fluorescencia relativa (IFR)

Figura A	T84/pCtl			T84/pARNg3	
	-	-	TPA	-	TPA
	Ac-DEVD-AFC	Ac-DEVD-AFC	Ac-DEVD-AFC	Ac-DEVD-AFC	Ac-DEVD-AFC
	Ac-DEVD-CHO	-	-	-	-
	0,13 ± 0,03	1,00 ± 0,04	1,39 ± 0,10	3,76 ± 0,12	3,94 ± 0,20
Figura B	T84/pCtl			T84/pARNg3	
	-	-	TPA	-	TPA
	Ac-LEHD-AFC	Ac-LEHD-AFC	Ac-LEHD-AFC	Ac-LEHD-AFC	Ac-LEHD-AFC
	Ac-DEVD-CHO	-	-	-	-
	0,15 ± 0,01	1,00 ± 0,14	0,84 ± 0,12	2,07 ± 0,39	1,44 ± 0,17
Figura C	T84/pCtl			T84/pARNg3	
	-	-	TPA	-	TPA
	Ac-IETD-AFC	Ac-IETD-AFC	Ac-IETD-AFC	Ac-IETD-AFC	Ac-IETD-AFC
	Ac-IETD-CHO	-	-	-	-
	0,09 ± 0,01	1,00 ± 0,06	1,03 ± 0,10	0,90 ± 0,01	0,93 ± 0,05

Tabla 18: Datos de la Figura 41 A-C. Valores de la media ± SE de dos experimentos independientes (n=2).

8. ROL DE GPRC5A EN LOS NIVELES DE IL-1β

Anteriormente comprobamos que IL-1β no modula a *GPRC5A*. Como TPA aumenta los niveles de *GPRC5A*, y está reportado que también aumenta los de IL-1β en monocitos [568], nos interesó estudiar si TPA induce un aumento en la secreción de IL-1β en células T84 y si era modulado por *GPRC5A*. Por otro lado, se conoce que las especies reactivas de oxígeno modulan positivamente a IL-1β [579, 580], como también IL-1β modula los niveles de ROS [274, 278]. Como vimos anteriormente, como *GPRC5A* modula a las ROS, podría estar regulando también los niveles de IL-1β.

Por medio de la técnica de ELISA, se midieron los niveles de IL-1β en sobrenadantes de cultivos celulares de T84/pCtl y T84/pARNg3, previamente incubados 4 h con 100 ng/ml de TPA. En la Figura 42, se puede observar que no hay diferencias significativas en los niveles de IL-1β en las líneas celulares T84/pCtl (1,00 ± 0,12; n=3) y T84/pARNg3 (1,04 ± 0,24; n=3), como tampoco en los tratamientos de estas células con TPA (1,43 ± 0,53 y 0,81 ± 0,10; n=3, respectivamente). Por lo tanto, *GPRC5A* no estaría implicado en la regulación

de la secreción de IL-1 β , como tampoco TPA estaría induciendo el aumento de esta citoquina proinflamatoria en la línea celular T84.

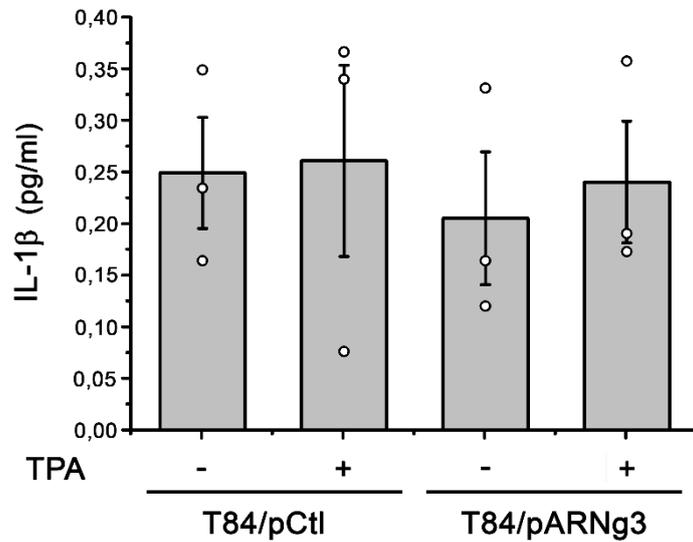


Figura 42: Rol de GPRC5A en los niveles de IL-1 β . Se midió por ELISA (BD OptEIA™ - BD Biosciences) los niveles de IL-1 β en sobrenadantes de cultivos celulares de T84/pCtl y T84/pARNg3, previamente incubados 4 h con 100 ng/ml de TPA. Los resultados se expresaron en valores de pg/ml de IL-1 β . Las mediciones se realizaron por duplicado y los datos se expresan como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron por ANOVA (Tukey análisis).

DISCUSIÓN

1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA Y ARNm DE GPRC5A POR TPA

Este trabajo de tesis, como se comentó anteriormente, se inició a partir de los resultados obtenidos en un DD (Figura 24 A), realizado con el objetivo de entender los mecanismos por los que el TPA induce una disminución en la expresión del gen *CFTR* [537]. Dicho trabajo permitió identificar un gen regulado positivamente por TPA. El mismo fue clonado, secuenciado y nombrado por nuestro laboratorio como PEIG-1 “Phorbol Esther Induced Gene 1” en 1996 [122, 123]. Más tarde la “Human Genome Organization” (HUGO) le asignó el símbolo oficial *GPRC5A*, receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro A. Luego Robbins y col. descubrieron dos miembros más de la familia, *GPRC5B* y *C* [126]. Finalmente, Brauner-Osborne y col. descubrieron el cuarto miembro de la familia, *GPRC5D* [127, 128].

TPA es un compuesto utilizado en una amplia gama de estudios biológicos. El TPA tiene múltiples efectos en diversos tejidos y/o líneas celulares. Se lo ha estudiado como inductor de varios procesos como la carcinogénesis en piel de roedores [400], como un inductor de la migración celular en varios tipos de cáncer a través de la activación de PKC [405-410] y como modelo para igualar las características patológicas de la psoriasis [436], entre otros. Estos efectos ocurren a través de la inducción o inhibición de una amplia variedad de genes y/o factores de transcripción. A pesar de que la mayoría de las investigaciones le otorgan a TPA un rol como inductor de la tumorigénesis, algunos estudios sugieren un rol opuesto. Varios trabajos muestran un efecto de TPA que resulta inhibitorio de la proliferación celular [411, 427, 432, 438] e inductor de la diferenciación celular en células hematopoyéticas [412-415, 417].

El primer objetivo de esta tesis fue corroborar los resultados previos, donde se encontró que TPA regulaba positivamente al ARNm de *GPRC5A* en la línea celular de cáncer de colon T84. El pico de estimulación de *GPRC5A* había sido observado luego de la incubación durante 4 h con 100 ng/ml de TPA. Este aumento de la expresión fue determinado en un primer paso con la técnica DD, seguida por la técnica NB (Figura 24 B-C). Estos resultados fueron corroborados en esta tesis por la técnica RT-PCR cuantitativa en tiempo real, donde se determinó un pico de estimulación (un aumento de 20 veces aproximadamente)

del ARNm de *GPRC5A* en las mismas condiciones de incubación, a las 4 h con 100 ng/ml de TPA (Figura 25 A-B). Hasta el momento, no se sabía el efecto que tendría el TPA en los niveles de la proteína GPRC5A, motivo que nos llevó a medir su expresión por diferentes técnicas: WB, microscopía confocal y citometría de flujo. Los tres métodos demostraron que los niveles de proteína de GPRC5A también son modulados positivamente por el tratamiento con TPA (Figura 26). La expresión de la proteína fue evaluada en la condición de mayor expresión de ARNm, 100 ng/ml de TPA (o 162 uM). Además, el WB permitió observar distintas modificaciones postraduccionales de GPRC5A, mientras que por microscopía confocal, se observó su localización en el contorno celular sugiriendo localización en membrana plasmática como ha sido observado previamente en muestras de tejidos de cáncer de colon [358]. Para confirmar esta localización hará falta realizar otros ensayos.

Para evaluar si el aumento de los niveles de GPRC5A por TPA era independiente del modelo celular empleado, se utilizó otra línea celular de cáncer de colon, las células Caco-2. En esta otra línea, también se estudiaron los niveles de ARNm y proteína de GPRC5A. En concordancia con los resultados obtenidos en la línea T84, las células Caco-2 también presentaron un aumento del ARNm y proteína de GPRC5A, evaluado por RT-PCR cuantitativa en tiempo real y WB respectivamente, luego del tratamiento con TPA (100 ng/ml, 4 h) (Figura 27). En células Caco-2 se observó un aumento de aproximadamente 8,5 veces del ARNm inducido por TPA, bastante menor que en células T84 que fue de aproximadamente 20 veces. Esta diferencia en el nivel de inducción de la expresión de GPRC5A entre ambas líneas celulares de cáncer de colon podría deberse a numerosos factores, como el origen distinto de estas líneas celulares y condiciones de crecimiento. Más allá de esta diferencia, ambas líneas celulares de cáncer de colon mostraron el mismo efecto de inducción de GPRC5A por TPA, lo que confirma los resultados obtenidos previamente.

Con respecto a las diferentes bandas que se observaron en los WB de GPRC5A en las células T84 y Caco-2 (Figura 26 A y 27 B, respectivamente), corresponden a las que Lotan y col. asignaron a diferentes grado de glicosilación de la proteína GPRC5A. Un potencial sitio de glicosilación se encuentra en el residuo 158 del péptido GPRC5A en un “loop” extracelular entre los dominios

transmembrana IV y V [125]. En las células Caco-2 se observó una variante de bajo peso molecular (aproximadamente 17 KDa), no observada en células T84.

En resumen, estos resultados confirman que el TPA es capaz de inducir un aumento de la transcripción de ARNm de *GPRC5A* en líneas celulares de cáncer de colon, lo que confirma los resultados previos obtenidos por DD, y aporta nuevos resultados que indican que dicho aumento en la expresión de ARNm es acompañado por un aumento en la traducción de dicha proteína.

El conocimiento del mecanismo por el que TPA aumenta la expresión del ARNm de *GPRC5A* en células T84, y las consecuencias biológicas de este aumento, nos permitirá contribuir al estudio del rol de TPA y *GPRC5A* en cáncer de colon.

2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE *GPRC5A* POR TPA

Con el fin de estudiar las vías de señalización involucradas en la modulación positiva del ARNm de *GPRC5A* mediada por TPA, las células T84 fueron incubadas con diferentes inhibidores de vías de señalización. Las vías estudiadas activan factores de transcripción con sitios de unión al promotor de *GPRC5A* (según análisis *in silico* [150]) o se encuentran relacionadas con TPA.

Es muy poco lo que se sabe sobre la regulación de este gen, su función y su rol en cáncer. Algunos trabajos demuestran que *GPRC5A* es regulado por ácido retinoico (AR) [138, 139], AMPc [143] y p53 [144], pero no hay mayor información sobre el resto de las numerosas vías de señalización que podrían estar involucradas de acuerdo al análisis de su promotor [150]. De este modo, nos encontramos con un amplio campo de estudio para explorar la regulación transcripcional de esta proteína.

2.1. Efecto de la inhibición de PKC, Ca²⁺, MEK1 / 2 y PKA sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA

La vía de señalización más estudiada de TPA es la de PKC, ya que se sabe que TPA activa a esta quinasa uniéndose directamente a su dominio C1 [378]. Es por ello, que uno de los usos más frecuentes de TPA es utilizarlo como

activador de PKC, para luego estudiar el efecto de esta activación en diferentes procesos celulares [383, 384]. Los efectos de TPA sobre PKC resultan distintos a los que se obtienen con uno de los activadores naturales de las isoformas convencionales y nóveles (α , β _I, β _{II}, γ , δ , ϵ , η y θ) de PKC, el diacilglicerol (DAG) [581]. Los ésteres de forbol como el TPA, se cree que son mucho más potentes que el DAG, ya que se unen a PKC con mayor afinidad y, además, no se metabolizan fácilmente [381, 582]. La unión de menor afinidad del DAG permite que la señalización de PKC se revierta rápidamente [583], mientras que el tratamiento con éster de forbol da como resultado una activación crónica [584] que, dependiendo de la isoforma de PKC activada, se cree que puede provocar cáncer o inhibición del crecimiento y apoptosis [543]. Al igual que lo que ocurre con el DAG, los ésteres de forbol se insertan en la zona hidrofílica de los dominios C1, cubriendo el dominio C1 con una superficie hidrófoba que mantiene el dominio C1 de PKC unido a la membrana plasmática [585, 586]. Sin embargo, otros estudios proponen que el DAG se une a un sitio distinto al que se une TPA, induciendo distintas formas activadas de la enzima [581, 587].

Al conocerse el fuerte efecto de TPA sobre PKC, y la posible activación de esta quinasa a factores de transcripción que se unirían al promotor de *GPRC5A*, se investigó si el efecto de TPA sobre *GPRC5A* era regulado por esta quinasa. Para ello, se usó el inhibidor de PKC Gö6983, que inhibe las isoformas PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ y PKC ζ pero no la PKC μ . El tratamiento con el inhibidor redujo un ~50 % la expresión del ARNm de *GPRC5A* en los niveles basales y un ~80 % en el tratamiento con TPA (Figura 28 A). Se sabe que TPA y DAG activan las mismas isoformas de PKC, pero TPA las activa con mayor intensidad [14]. Es posible que TPA active en mayor medida a la isoforma activadora de *GPRC5A*, de modo que al inhibir a PKC en los tratamientos con TPA se observe una mayor reducción de la expresión del ARNm de *GPRC5A* que lo que se observa en los niveles basales. En conclusión, TPA activa la expresión de *GPRC5A* mediante la vía de señalización de PKC: TPA → **PKC** → *GPRC5A*.

Las isoformas de PKC α , β y γ son las únicas que dependen de Ca^{2+} para su activación [387, 588]. El Ca^{2+} intracelular se une directamente al dominio C2 de las enzimas PKC sensibles al Ca^{2+} para dirigir el dominio a la membrana plasmática activando diversas vías de señalización [14]. Para poder determinar

qué clase de isoformas de PKC, las dependientes o no de Ca^{2+} , regulan la expresión del ARNm de *GPRC5A*, se utilizó el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA. Se conoce que BAPTA bloquea la translocación a la membrana de PKC- α [589]. Los tratamientos con BAPTA redujeron la expresión del ARNm de *GPRC5A* tanto en los niveles basales (~55 %) como en los tratamientos con TPA (~55 %) (Figura 28 B). A pesar de la elevada concentración de BAPTA utilizada, no llegó a inhibir por completo la expresión de *GPRC5A*. El porcentaje de inhibición de *GPRC5A* fue el mismo tanto con el inhibidor de PKC como con BAPTA (cerca del 50 %), lo que permite suponer que la regulación de *GPRC5A* a nivel basal está mediada en parte por las PKC dependientes de Ca^{2+} , y que el 50 % restante podría estar regulado por una vía independiente de PKC. Con respecto al tratamiento con TPA, el inhibidor de PKC redujo la expresión un ~80 %, mientras que el BAPTA la redujo en un ~55 %. El mayor efecto con el inhibidor de PKC puede deberse a que TPA esté estimulando la activación de las PKC dependientes de Ca^{2+} y que éstas, junto con las no dependientes de Ca^{2+} y otras vías, regulen a *GPRC5A*. Hace falta de más estudios para poder confirmar esta hipótesis. En conclusión, la modulación de la expresión de *GPRC5A* por TPA estaría en parte mediada por las isoenzimas de PKCs dependientes de Ca^{2+} .

Debido a que PKC estimula MEK en tratamientos con TPA [590], quisimos estudiar si la quinasa MEK estaba involucrada en la regulación de *GPRC5A* por TPA. Para ello, se utilizó el inhibidor de MEK UO126, el cual redujo ~55 % los niveles basales del ARNm de *GPRC5A*, mientras que en los tratamientos con TPA la reducción fue de ~60 % (Figura 28 D). Por lo tanto la vía de señalización de MEK regularía a *GPRC5A*, queda estudiar si esta vía está mediada por PKC (vía TPA \rightarrow PKC \rightarrow **MEK** \rightarrow *GPRC5A*).

Por otra parte, se ha descrito que cerca del sitio de inicio de la transcripción de *GPRC5A* existen elementos de respuesta a AMPc (CRE) [150], y se vio que el aumento de AMPc induce la transcripción de *GPRC5A* [143]. PKA es una enzima dependiente de AMPc, y está descrito que PKA y TPA activan al factor de transcripción CREB [591, 592], el cual se une a sitios CRE en el promotor [541, 542]. Por ello, estudiamos si PKA se encuentra involucrada en la regulación de *GPRC5A* mediante la vía de señalización TPA \rightarrow PKA \rightarrow *GPRC5A*. Los tratamientos con el inhibidor de PKA H-89, redujeron aproximadamente un 40 % la expresión del ARNm de *GPRC5A* tanto en los niveles basales como con TPA

(Figura 28 C). Aunque esta inhibición no fue menor que con el inhibidor de PKC, permitió conocer otra vía de señalización que regula a *GPRC5A*. Esto permite concluir que TPA regula la expresión del ARNm de *GPRC5A* a través de la vía TPA → **PKA** → *GPRC5A*. No se tiene conocimiento de que el AMPc sea activado por TPA, queda por determinar si la activación de PKA está mediada por PKC.

Estos resultados en conjunto sugieren que TPA regula la expresión de *GPRC5A* a través de las vías de PKC/Ca²⁺, PKA y MEK.

2.2. Efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA

Con el fin de estudiar otras vías reguladas por la quinasa PKC, nos interesó estudiar la vía de señalización de JNK [547, 548] ya que *GPRC5A* tiene sitios predichos en su promotor para los factores de transcripción p53 y c-Jun [150], ambos regulados por JNK [549, 593-595]. Se sabe que JNK induce la ubiquitinación de p53 provocando su degradación [596, 597]. Por otra parte, se ha reportado que TPA induce la localización nuclear de p53 [598] y en cáncer de pulmón, la sobreexpresión del factor de transcripción p53 induce un aumento en la expresión de *GPRC5A*, donde *GPRC5A* sería un mediador de la actividad antitumoral de p53 [145]. Dado estos antecedentes, nos interesó estudiar la posible regulación de la vía de JNK en la expresión del ARNm de *GPRC5A*.

En nuestro estudio, observamos que los tratamientos con el inhibidor de JNK SP600125 produjeron un aumento en la expresión del ARNm de *GPRC5A*. En el caso de los niveles basales el aumento fue de ~110 %, mientras que en el tratamiento con TPA fue de ~70 % (Figura 29). Este resultado fue contrario a lo que esperábamos, porque el inhibidor de MEK, una quinasa que normalmente activa AP-1 a través de JNK [599], inhibía la acción del TPA sobre *GPRC5A*. Entonces esperábamos que un inhibidor de JNK inhibiese la estimulación de *GPRC5A* por TPA. Pero el resultado fue el contrario a lo esperado. Una posible explicación del resultado obtenido es que JNK podría regular al factor de transcripción p53, y no a AP-1, induciendo su degradación y así disminuyendo la expresión de *GPRC5A*. TPA tendría un efecto inverso, al aumentar los niveles de p53 activado, por lo que disminuiría esta inhibición por JNK. Es decir, en el tratamiento con TPA la disminución sería menor debido a que p53 se encontraría

activado por TPA. Sin embargo, a nivel basal esta inhibición es mayor ya que p53 no se encuentra estimulado por TPA. Esto sugiere un posible rol del factor de transcripción p53 en la regulación de *GPRC5A* por TPA, que deberá ser estudiado en trabajos futuros. Estos resultados sugieren que la vía de señalización sería: TPA → JNK --| *GPRC5A*.

Una mayor profundización será necesaria en el futuro para estudiar mediante “gel-shifts”, “supershifts”, clonado del promotor y su análisis, el mecanismo de activación de AP-1 y p53 y determinar si estos factores de transcripción aumentan o reducen la expresión de *GPRC5A* y su mecanismo.

2.3. Efecto de la inhibición de AKT, p38 e IKK2 sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA

Para profundizar un poco más nuestro estudio sobre las vías de señalización involucradas en la regulación de *GPRC5A* por TPA, analizamos la vía de AKT que regula a los factores de transcripción AP-1 y p53 [552, 553], y la vía de señalización p38 que regula también a los factores de transcripción p53 y AP-1 [550, 554-556], como también a MYC/MAX y CREB [557, 558]. Además, estudiamos el efecto de la inhibición del factor de transcripción NF-κB, el cual se sabe que es activado por la PKA [559], quinasa que regula positivamente a *GPRC5A*, como determinamos anteriormente.

Los tratamientos con los inhibidores de las quinasas AKT (GSK690693), p38 (SB203560) e IKK (IκB quinasa, BM5345541) no tuvieron efectos en la regulación de la expresión del ARNm de *GPRC5A* inducida por TPA. Sin embargo, observamos que el inhibidor de AKT produjo un aumento significativo en los niveles basales del ARNm de *GPRC5A*, aproximadamente unas dos veces respecto al control sin tratar (Figura 30). Esto se encuentra en concordancia con reportes que indican que AKT actuaría como un activador de JNK [600] y como un inhibidor del factor de transcripción p53 [553]. De este modo, la activación de AKT podría activar JNK y conducir a una disminución de p53, lo que regularía la expresión de *GPRC5A* de manera negativa. Por lo tanto, podemos proponer el estudio futuro de las posibles vías de regulación de *GPRC5A*: **AKT** --| p53 → *GPRC5A* y/o **AKT** → JNK--| p53 → *GPRC5A*.

2.4. Efecto de IL-1 β , ion Cl⁻ y la inhibición de SGK1 sobre la expresión de GPRC5A inducida por TPA

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce la fosforilación de GPRC5A por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que interactúa y lo fosforila en el extremo C-terminal. GPRC5A es fosforilado en dos motivos conservados de doble tirosina (TYR), TYR-317 / TYR-320 y TYR347 / TYR-350, inactivando su función supresora de tumores en cáncer de pulmón. Estudios demostraron que GPRC5A no estaba fosforilada en el tejido pulmonar normal, mientras que estaba altamente fosforilado en tirosinas en tejidos de cáncer de pulmón [155]. Por otro lado, también se conoce una regulación recíproca, donde también se ha visto que GPRC5A regula a EGFR manteniendo un equilibrio complejo. GPRC5A ubicado en la membrana del retículo endoplásmico (ER) suprimió la síntesis de la proteína oncogénica EGFR, lo que evitó la tumorigénesis pulmonar inducida por radiación ionizante (IR) en línea celular de pulmón [356]. Otros estudios demostraron que en líneas celulares de cáncer de mama, células que expresan EGFR, la eliminación de GPRC5A promovió la formación de colonias, el crecimiento celular, la migración celular y la capacidad de invasión, pero no tuvo este efecto en la línea celular de cáncer de mama MCF7 que no expresan EGFR [376].

Hace tiempo nuestro laboratorio estudia la citoquina proinflamatoria IL-1 β , donde se vio que su señalización activó la expresión de uno de los ligandos del receptor EGFR, EREG (“epiregulin”), conduciendo al aumento en la actividad de dicho receptor [279]. Por lo tanto, nos interesó estudiar si IL-1 β está implicada en la regulación de GPRC5A. Además, hay estudios que indican que IL-1 β es inducida por TPA [568], por lo que IL-1 β podría ser un blanco de estudio interesante en la regulación de *GPRC5A* (TPA \rightarrow IL-1 β \rightarrow *GPRC5A*). Sin embargo, los tratamientos con IL-1 β no tuvieron efectos sobre la modulación de la expresión basal del ARNm de *GPRC5A* ni sobre la expresión estimulada por TPA (Figura 31 A). Estos resultados estuvieron en concordancia con aquellos obtenidos con el inhibidor de NF- κ B, en los que tampoco se observó cambios en la expresión del ARNm de *GPRC5A* (Figura 30C). NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción regulados por IL-1 β en la respuesta inflamatoria [263, 601]. Como era de esperar, ya que comprobamos que la

expresión de GPRC5A no es regulada por IL-1 β , tampoco hubo variación en la expresión de GPRC5A en células tratadas con el antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL1RN) (10 ng/ml, 4 h) (Figura 31A), tratamiento que inhibe un posible “loop” de IL-1 β . Este “loop” es un mecanismo en el cual las células en estado basal secretan IL-1 β y esa IL-1 β activa a su receptor estimulando nuevamente la transcripción de la citoquina en la célula. IL1RN/anakinra cumpliría la función de inhibir el ingreso de la IL-1 β liberada al medio extracelular por la célula [274]. Este “loop” fue observado en células con actividad CFTR disminuída (células IB3-1 o células Caco-2 / pRS26) [274]. Para verificar que la IL-1 β recombinante añadida a los cultivos y la señalización de IL1R1 estaban activas, las células T84 se incubaron con 5 ng/ml de IL-1 β y se midió la expresión del ARNm de *IL-1 β* (Figura 31B). Los resultados indican que las células T84 responden correctamente a la estimulación con IL-1 β recombinante añadida (esta citoquina estimula su propio ARNm). Además, en presencia de IL1RN / anakinra (10 ng/ml) se observó una reducción pequeña pero no estadísticamente significativa, lo que sugiere que en condiciones basales el “loop” de IL-1 β no tiene una respuesta significativa sobre la expresión basal de IL-1 β , como ocurre en células con actividad CFTR disminuída.

Por otra parte, se ha reportado recientemente que TPA modula positivamente al gen “serum and glucocorticoid-regulated kinase 1” *SGK1* [570, 602], una quinasa que tiene una gran homología con PKC y PKA en su secuencia del dominio catalítico [569], por lo que nos pareció otro blanco de regulación de GPRC5A muy interesante. Nuestros resultados mostraron un comportamiento complejo con la inhibición de SGK1 (Figura 31 C). Por un lado, el tratamiento con el inhibidor de SGK1 GSK650394 produjo un aumento en la expresión basal de *GPRC5A* en forma bifásica, pero por otro lado, el tratamiento con este inhibidor junto con TPA redujo la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA. Este mecanismo contrapuesto deberá ser mejor estudiado, pero si dejamos de lado el efecto en los niveles basales (que pueden estar modulados por muchas vías paralelas), está claro que SGK1 está involucrada en el mecanismo de estimulación de GPRC5A por TPA.

SGK1 es un gen regulado por el ion Cl⁻ [571]. Estudios recientes de nuestro laboratorio sugieren que el Cl⁻ tiene un rol como segundo mensajero o efector de señalización en la regulación de la expresión de diversos genes [572], incluyendo

IL-1 β [274, 275]. Esto, sumado a que la actividad de SGK1 es regulada por Cl⁻, nos llevó a interesarnos en estudiar si los cambios en la concentración de Cl⁻ intracelular podían modular al gen *GPRC5A*. Los tratamientos con diferentes concentraciones de Cl⁻ extracelular en presencia de los ionóforos nigericina y tributiltina, estrategia de doble ionóforo, no provocaron cambios en la expresión del ARNm de *GPRC5A* en los niveles basales como tampoco junto con el tratamiento con TPA (Figura 31 D). Por lo tanto, la expresión de *GPRC5A* no estaría regulada por cambios en la concentración intracelular de Cl⁻.

En resumen, la expresión del ARNm de *GPRC5A* no es regulada por IL-1 β , como así tampoco por cambios en la concentración intracelular de Cl⁻. Por otra parte, nuestros resultados sugieren un posible rol de la quinasa SGK1 en la modulación de la expresión de *GPRC5A*; esta regulación deberá ser estudiada con mayor profundidad en el futuro.

Las vías de señalización estudiadas en este trabajo involucradas en la regulación positiva de *GPRC5A* por TPA, se resumen en la Figura 43. Estos datos han sido recientemente publicados [130].

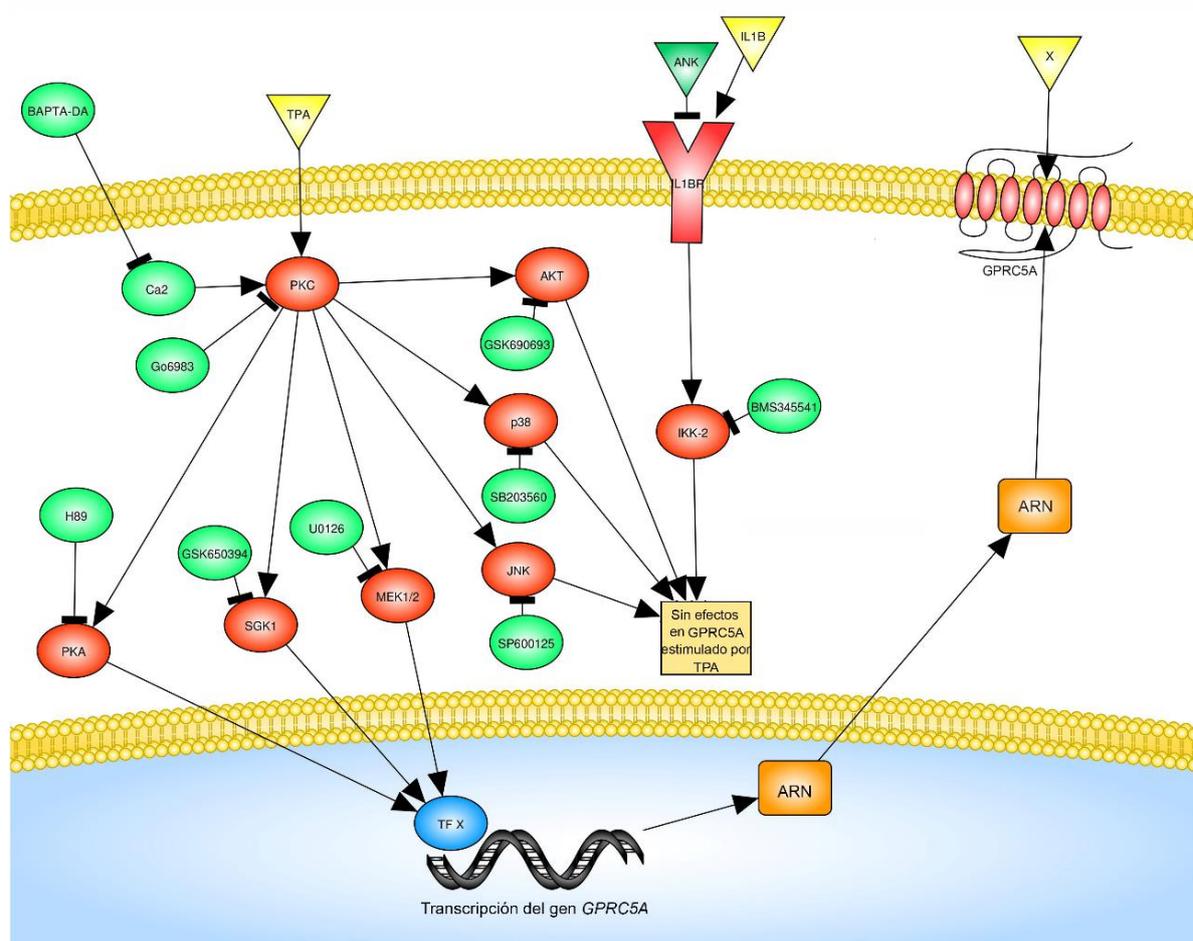


Figura 43: Resumen gráfico de las vías de señalización que regulan la transcripción del gen *GPRC5A* en tratamientos con TPA. Se propone la activación de ellas mediada por la activación de PKC, único receptor intracelular de TPA conocido hasta el momento. Abreviaturas: TF (factor de transcripción).

3. MODULACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR TPA

En células cancerosas son varios los procesos que pueden producir un aumento de especies reactivas de oxígeno (“reactive oxygen species”, ROS): el aumento de la actividad metabólica, la disfunción mitocondrial, la actividad del peroxisoma, el aumento de la señalización de receptores, la actividad oncogénica, la mayor actividad de las oxidasas, ciclooxigenasas y lipoxigenasas, entre otras [225, 226].

TPA ha sido estudiado ampliamente en la producción de ROS en células del sistema inmune [603], pero es poco lo que se sabe sobre la inducción de ROS por TPA en células epiteliales humanas [604]. Dado que TPA ha sido utilizado como promotor de tumores [605], así como también como promotor de la inflamación aguda [402], procesos relacionados directamente con niveles aumentados de ROS [225], se decidió estudiar si TPA promueve la producción de ROS en la línea celular T84. Para comprobar esta hipótesis, se midió el nivel de producción de ROS celular mediante la sonda fluorescente DCFH-DA utilizando dos técnicas, espectrofluorimetría y citometría de flujo. Como se esperaba, los niveles intracelulares de ROS se encontraron elevados en las células T84 tratadas con TPA (100 ng/ml, 162 nM) por ambas técnicas (Figura 32). Además, evaluamos el nivel de producción de ROS mitocondrial mediante la sonda MitoSOX. Los resultados encontrados en estas determinaciones fueron similares a los de producción de ROS celulares, aunque las diferencias halladas fueron menos pronunciadas (Figura 33). Esto sugiere que el TPA induce tanto la producción de ROS celular como mitocondrial en células T84. Estudios en la línea celular de leucemia U-937, han mostrado una dependencia de la generación de ROS por TPA con la isoforma PKC β II, así el silenciamiento de esta quinasa inhibió la generación de ROS inducida por TPA [478].

Estos resultados concuerdan con los de otros autores en distintos tipos celulares en los que se demuestra un aumento del estrés oxidativo en respuesta

a tratamientos con TPA. Podemos concluir que estamos en presencia de la vía $TPA \rightarrow cROS + mROS$.

4. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE *GPRC5A* POR ROS

Se sabe que ciertos ligandos de GPRCs activan la producción de ROS, y que este fenómeno no desencadena solo una respuesta tóxica o no específica, sino que la generación de ROS representa un elemento importante en las vías de señalización [229]. Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros regulando una amplia diversidad de genes [227-231]. Particularmente el H_2O_2 , puede actuar como un segundo mensajero intracelular [227-231], mediante la oxidación de los residuos de cisteína dentro de las proteínas. Los residuos de cisteína existen como un anión tiolato (Cys-S⁻) a pH fisiológico y son más susceptibles a la oxidación en comparación con la cisteína tiol protonada (Cys-SH). Durante la señalización redox, el H_2O_2 oxida inicialmente el anión tiolato a una forma sulfénica (Cys-SOH) para luego pasar a especies disulfuro (R-S-S-R) causando cambios alostéricos dentro de la proteína que alteran su función [606]. También el H_2O_2 modula el grado de fosforilación de proteínas, por oxidación de los residuos de serina, treonina o tirosina [225, 232, 233].

Teniendo en cuenta esta información, nos preguntamos si la alta expresión de *GPRC5A* inducida por TPA, en las células T84, podría ser inducida por la elevada concentración de ROS. Es por esto que estudiamos si las ROS modulan la expresión del gen *GPRC5A*.

Para esto hicimos estudios con inhibidores. En los tratamientos con el inhibidor de NOX GSK 2795039 y NAC, no se observaron modificaciones en los niveles de expresión del ARNm de *GPRC5A* (Figura 34). El estrés oxidativo activa NF- κ B a través de una variedad de vías de señalización distintas [262, 606]. NF- κ B es un sensor redox para el estrés oxidativo [260] y se activa con dosis bajas de H_2O_2 [261]. Otras de las vías activadas por ROS es la vía de señalización de AKT [245, 246], donde se vio que AKT fue activado por el H_2O_2 [244], como también la vía de señalización de p38 [607, 608]. Sin embargo, los resultados aquí obtenidos mostraron que inhibiendo las vías de señalización de NF- κ B (I κ B quinasa, BM5345541), AKT (GSK690693) y p38 (SB203560) junto con el tratamiento con TPA, la expresión del ARNm de *GPRC5A* no se modificó,

concluyendo que estas vías no regulan al gen *GPRC5A* en tratamientos con TPA. Esto puede ser una explicación de la falta de efectos de inhibidores de ROS en la expresión del gen. A pensar de que habíamos observado un efecto inhibitorio de AKT sobre la expresión basal del ARNm de *GPRC5A*, tampoco se observaron cambios en su expresión en tratamientos con iNOX GSK 2795039 y NAC. En suma, estos datos sugieren que la inducción de la expresión de *GPRC5A* por TPA no es mediada por ROS. Esto también coincide con la falta de respuesta a IL-1 β y a Cl $^-$, que median la producción de ROS como vimos en [274].

5. ROL DE *GPRC5A* EN LOS NIVELES DE ROS INDUCIDOS POR TPA

Estudiar los mecanismos de señalización que desencadenan el aumento de ROS celular es de gran importancia, ya que un estado oxidativo elevado es una característica en común de muchos tipos de cáncer [609]. Se conoce que las señales de proliferación sostenida, reprogramación del metabolismo energético y la inflamación promovida por el tumor, tres de los diez sellos distintivos del cáncer o “hallmarks” en inglés [8], requieren de la regulación de las ROS para llevar a cabo el proceso tumorigénico. Se ha visto que el aumento de ROS contribuye a la carcinogénesis [610-612], a la metástasis tumoral [225], a la angiogénesis [613] y a la quimioresistencia [614], entre otros.

5.1. Medición de los niveles de ROS celular en células T84/pARNg3

Como TPA genera un aumento de cROS, quisimos estudiar si *GPRC5A* participa de este aumento. Para ello, se midió el nivel de producción intracelular de ROS, mediante la sonda fluorescente DCFH-DA [523, 524], en las células deficientes del gen *GPRC5A* que preparamos con este fin utilizando la técnica de edición génica CRISPR/Cas9, las células T84/pARNg3 (Figura 35-36). Los resultados de fluorimetría mostraron una reducción en la producción de cROS basal en células T84/pARNg3 comparadas con las células que expresan *GPRC5A* (Figura 37), esta disminución no se observó por citometría de flujo, en las condiciones estudiadas. Con respecto a los tratamientos con TPA, en las células T84/pARNg3 el éster de forbol no indujo el aumento de cROS

evidenciado en las células que expresan GPRC5A. Es decir, es necesaria la presencia del receptor GPRC5A para que TPA pueda inducir el aumento de las cROS en la línea celular T84. Esto fue observado tanto por citometría de flujo como por espectrofluorimetría.

En la célula existen diversas fuentes de ROS celular (cROS): mitocondria, NADPH oxidasa (NOX), citocromo 450 en el retículo endoplásmico, lipoxigenasas, cicloxigenasas, xantina oxidasa y peroxisoma [280]. GPRC5A, al participar positivamente en la producción de cROS inducidas por TPA, podría estar modulando alguna de las fuentes mencionadas anteriormente. En células COS-7, HEK293 [479] y en fagocitos [573, 615-617] el tratamiento con TPA indujo un aumento del radical superóxido inducido por NOX2. Se conoce que GPRC5A regula a los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B [112, 159, 160, 169, 170] y en células T84 se determinó que la región 5' del gen *NOX1* humano contiene elementos de unión para los transductores de señales STAT y NF- κ B [618], moléculas reguladas por GPRC5A.

Como se vio en la introducción, la activación de los receptores GPCRs genera la activación de PKC por aumento en la concentración de Ca^{2+} y DAG en el citoplasma [4]. Un paso esencial para la activación de NOX2 es la fosforilación de serina de p47phox en los residuos 303, 304 y 328. Se ha sugerido que diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) están involucradas en este proceso [619]. Se conoce que GPRC5A regula los niveles de AMPc a través de la activación de la subunidad α de la proteína G (G_{α}), lo que genera la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) [143]. Varias publicaciones sugieren que cAMP / PKA son reguladores negativos de la actividad de NOX por fosforilación directa [619].

A pesar de que es necesario profundizar los estudios para determinar el mecanismo por el cual *GPRC5A* regula la generación de ROS, la regulación positiva de NOX por GPRC5A pareciera ser una opción.

5.2. Medición de los niveles de ROS mitocondriales en células T84/pARNg3

Para determinar si *GPRC5A* también tiene un rol en la generación de ROS mitocondrial (mROS), además de su rol en la generación de cROS, se utilizó la

sonda mitocondrial MitoSOX [527]. De este modo, pudimos observar por citometría de flujo que los tratamientos con TPA en células T84/pARNg3, no indujeron un aumento de mROS, a diferencia de los que ocurre en las células control donde se expresa el receptor GPRC5A (Figura 38). Con respecto a los niveles basales de mROS (sin tratamiento con TPA), las células T84/pARNg3 no presentaron diferencias con respecto a las control.

La mitocondria es una importante fuente de ROS. Se sabe que al menos nueve enzimas mitocondriales (citocromo b5 reductasa, monoamina oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, deshidrogenasa de α -glicerofosfato, succinato deshidrogenasa, aconitasa, complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa, NADH-ubiquinona oxidorreductasa (C-I), ubiquinona: citocromo c reductasa (C-III) en mamíferos son capaces de producir ROS, pero su capacidad para la producción, así como su expresión, varía mucho entre los tejidos y las especies [620]. Por lo tanto, determinar una sola fuente de ROS mitocondrial puede resultar difícil. Una de las funciones principales de las mitocondrias es la producción oxidativa de ATP durante el proceso de fosforilación oxidativa, donde el oxígeno se reduce para formar superóxido y este último se dismuta rápidamente en peróxido de hidrógeno [621]. Diversos estudios sugieren que el Complejo I mitocondrial produce superóxido exclusivamente en la matriz mitocondrial, mientras que el Complejo III produce superóxido tanto en el lado de la matriz como en el lado citosólico [295]. Lo cual hace muy complejo interpretar el rol de GPRC5A en la regulación de la producción de ROS celular y mitocondrial.

Estudios contrapuestos han relacionado a GPRC5A con un aumento en la expresión del factor de transcripción STAT3 [112], o por el contrario, con la inhibición de su fosforilación [169]. Aunque STAT3 se ha estudiado como un factor de transcripción durante décadas, se encontró un pequeño grupo de STAT3 (mitoStat3) localizado en matriz mitocondrial, donde funciona como un regulador positivo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial [622, 623]. Recientemente fue encontrado como un modulador de las mROS [622]. Se encontró que su deficiencia provoca una disminución de la actividad de los complejos I y II mitocondriales causando un aumento de las mROS en el complejo I [624]. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual STAT3 modula la actividad de la cadena de electrones mitocondrial no es bien conocido.

La activación de STAT3 se ha relacionado con la progresión de varios tipos de cáncer [625]. En queratinocitos, TPA indujo la traslocación de STAT3 hacia las mitocondrias, y la posterior unión al ADN mitocondrial posiblemente con el fin de regular la transcripción de genes, además participó de la regulación de la respiración mitocondrial [626]. Es necesario profundizar los estudios para determinar el mecanismo por el cual *GPRC5A* regula la generación de mROS, pero la regulación mediada por STAT3 pareciera ser una opción.

Identificar las proteínas diana para la modificación redox es clave para comprender cómo los oxidantes median procesos patológicos como la promoción de tumores.

6. ROL DE *GPRC5A* EN LA APOPTOSIS CELULAR

Como vimos anteriormente, *GPRC5A* es regulado por las vías de señalización PKC, PKA, MEK, SGK1, JNK y AKT, vías implicadas en la regulación de la apoptosis celular [627-634]. Además, se sabe que las ROS son uno de los factores por los cuales se inicia el proceso de apoptosis [635] y determinamos aquí que son reguladas, al menos en parte, por *GPRC5A*. Dado que *GPRC5A* es regulado por algunas vías de señalización que regulan la muerte celular programada y participa en la generación de cROS y mROS, quisimos estudiar si *GPRC5A* participa en la regulación de la apoptosis. Para ello, evaluamos la externalización de la fosfatidilserina, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9, características de células en apoptosis. Pudimos observar que TPA en células T84 que expresan *GPRC5A* indujo disminución en la externalización de la fosfatidilserina (Figura 39) y una menor pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 40), teniendo TPA un rol antiapoptótico en esta línea celular. Por otro lado, en nuestros estudios TPA no modificó la actividad de las caspasas estudiadas (Figura 41), lo que permite inferir que este rol antiapoptótico de TPA no es mediado por la vía de las caspasas. En células *KO GPRC5A*, TPA no indujo cambios en ninguno de los tres parámetros de la apoptosis que evaluamos (externalización de fosfatidilserina, potencial de membrana mitocondrial y actividad de las caspasas 3, 8 y 9). Por lo tanto, TPA induce estos efectos antiapoptóticos observados al menos en parte a través del receptor *GPRC5A* en células T84. Por otro lado, si analizamos los niveles basales sin tratamiento con

TPA, y comparamos estos parámetros en células *KO GPRC5A* con respecto a las células control T84/pCtl, observamos que las células *KO* presentaron mayor externalización de fosfatidilserina y un aumento en la actividad de la caspasa 3 efectora, pero no se vieron cambios en el potencial de membrana mitocondrial ni en la actividad de las caspasas 8 y 9. Como conclusión, el receptor GPRC5A tendría un rol antiapoptótico en células T84, es por ello que al perderse en células *KO*, presentan un mayor nivel basal de apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo que las células utilizan como una defensa en el desarrollo del cáncer [325, 337, 338]. A su vez, la apoptosis es atenuada a través de la desregulación de vías de señalización apoptóticas en aquellos tumores que han logrado progresar a estados de malignidad alto [325, 337]. En dos sellos distintivos del cáncer, la evasión de la muerte celular y la activación de inmortalidad replicativa, se describe la apoptosis como una característica regulada por las células tumorales para llevar a cabo el proceso tumorigénico [8].

Anteriormente en otros estudios se había visto un rol proapoptótico de TPA en pacientes con leucemia mieloide [423] y en líneas celulares de cáncer de hígado a través de un aumento en la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 [438]. Pero aquí pudimos observar un rol opuesto.

GPRC5A tiene roles contrapuestos en el desarrollo del tumor, dependiendo del tejido. En cáncer de colon, estudios sugieren que GPRC5A se encuentra sobreexpresado comparado con tejido de colon sano [111, 358, 359]. En líneas celulares de cáncer de colon, mientras llevábamos a cabo nuestro estudio se publicó que en condiciones de hipoxia (baja concentración de oxígeno, característica de los tumores sólidos [360]), aumentó la expresión de la proteína GPRC5A lo que causó la activación de la vía YAP (“yes-associated protein”) y finalmente, la activación del gen antiapoptótico *BCL2L1* (“Bcl-2-like 1”) [221]. Además, el silenciamiento de *GPRC5A* por la técnica ARNi aumentó los niveles de caspasa-3 en condiciones de hipoxia [221]. En concordancia con estos resultados, donde se observó un rol antiapoptótico de GPRC5A, en este trabajo pudimos determinar el mismo rol en la apoptosis celular de GPRC5A pero en condiciones normales de oxígeno. También pudimos observar un aumento de la actividad de la caspasa-3 en células *KO GPRC5A*. Por el contrario, en cáncer de pulmón, donde se ha visto que GPRC5A tiene un rol supresor de tumores, se

sobreexpresó el factor de transcripción p53, lo que indujo un aumento de GPRC5A y una posterior activación de la caspasa 3/7 [145].

En conclusión, el rol antiapoptótico de TPA en células T84 de cáncer de colon fue anulado a través del bloqueo de la actividad del receptor GPRC5A, teniendo este receptor un rol antiapoptótico en células T84.

Proponemos, al menos en parte, que podría ser a través de la modulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que GPRC5A module la apoptosis celular. Se sabe que las ROS regulan diversas vías de señalización implicadas en la modulación de la apoptosis. Por ejemplo, la vía de señalización de AKT es activada por las ROS, lo que genera que AKT fosforile al factor de transcripción FOXO inhibiendo la transcripción de proteínas proapoptóticas, reduciendo finalmente la apoptosis celular [248-252]. Planteamos la siguiente vía TPA→GPRC5A→ROS--| apoptosis. Se requerirán más estudios para determinar el mecanismo por el cual el receptor GPRC5A modula la apoptosis celular. El conocimiento de los mecanismos reguladores de la apoptosis no solo es importante para entender la causa del desarrollo del cáncer, sino también para futuros tratamientos.

7. ROL DE GPRC5A EN LOS NIVELES DE IL-1 β

Las células inflamatorias y sus mediadores están presentes en cada tumor, incluidos los que no se desarrollan a partir de la inflamación crónica [188]. El microambiente inflamatorio alrededor del tumor impulsa la progresión del tumor, y a menudo se caracteriza como uno de los sellos distintivos del cáncer [8]. En el cáncer de colon interleuquina-1 β (IL-1 β) tiene un rol pro-tumorigénico [636]. Se ha observado un aumento del ARNm de *IL-1 β* en pacientes con cáncer de colon metastásico [637]. Esta citoquina puede ser secretada por las células inmunes, estromales y tumorales [189]. Las citoquinas producidas por las células epiteliales pueden actuar de forma autócrina y/o parácrina, funcionando como señales para las células inmunes e inflamatorias vecinas, como también como factores de crecimiento autocrinos [638]. IL-1 β se une a su receptor IL1R1 que tiene un dominio citoplasmático que induce la activación de las vías de NF- κ B, JNK, AP-1 y p38 [639], vías de señalización claves para la tumorigénesis intestinal [640, 641]. El bloqueo *in vivo* de IL-1 β usando IL-1RA disminuyó

significativamente el desarrollo tumoral en un modelo murino [642]. En tejido pulmonar de ratones *KO GPRC5A*, donde GPRC5A tiene un rol atitumoral, se observó aumento en los niveles de IL-1 β a través de la activación de NF- κ B [159] como de STAT3 [169].

Como pudimos determinar en este trabajo, GPRC5A participa del aumento de los niveles de ROS, tanto mitocondrial como celular, como de la disminución de la apoptosis celular. Se conoce que la citoquina proinflamatoria IL-1 β induce la apoptosis aumentando los niveles de Bax, disminuye los niveles de Bcl-2, aumenta la liberación de citocromo C por parte de la mitocondria y disminuye el $\Delta\Psi$ m, factores que demuestran la inducción de la apoptosis por vía intrínseca [643]. Por otro lado, IL-1 β aumenta los niveles de ROS a través de la mitocondria y de las NOX [274, 574]. Con el fin de estudiar si GPRC5A se encuentra involucrado en la regulación de la secreción de IL-1 β , se midió la concentración de IL-1 β en sobrenadantes de cultivos celulares (Figura 42). Pudimos demostrar que la expresión de IL-1 β no depende de la expresión de GPRC5A en células T84. Por otro lado, estudios indican que TPA en la piel de ratones induce inflamación, a través de la inducción de diversas citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, and TNF- α [644]. En este trabajo, no se observó una inducción en los niveles de IL-1 β secretada por TPA en la línea celular de cáncer de colon T84.

• • •

Resumidamente, en este trabajo de tesis se pudo comprobar que en la línea celular T84 de cáncer de colon, TPA ejerce su efecto potenciamente oncogénico a través del receptor GPRC5A, el cual participa en el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la disminución de la apoptosis. Por otro lado, las células *knock-out GPRC5A*, independientemente de TPA, presentaron un mayor nivel basal apoptótico, comparadas con las células que sí expresan este receptor. Continuar con el estudio de su regulación podría ayudar a encontrar un nuevo blanco de terapia en cáncer.

Dadas las funciones amplias y diversas de los GPCRs en el cáncer, es importante comprender los mecanismos que conducen a la expresión y función aberrantes de GPCRs en la progresión tumoral para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Comprender la maquinaria molecular de los GPCRs

en el desarrollo de tumores puede contribuir al desarrollo de fármacos dirigidos a los receptores GPCRs o bien a sus ligandos.

CONCLUSIONES

1. Confirmamos los resultados previos sobre la inducción de la expresión del ARNm de *GPRC5A* mediada por el éster de forbol TPA. Así mismo, aquí demostramos que dicho aumento fue acompañado por un aumento en la expresión de su producto proteico, lo que sugiere que TPA podría ejercer algunos de sus efectos oncogénicos a través de este receptor acoplado a proteína G. De este modo, el estudio de su regulación podría ayudar a encontrar un nuevo blanco de terapia en cáncer.
2. TPA regula la expresión del ARNm de *GPRC5A* a través de las vías de señalización PKC/Ca²⁺, PKA y MEK1/2. Estas vías también participan de la regulación basal del ARNm de *GPRC5A*.
3. La vía de señalización de JNK se encuentra involucrada en la regulación de la expresión del ARNm de *GPRC5A*. Sin embargo, al contrario de las otras vías estudiadas, la vía de JNK tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión basal y sobre la expresión de *GPRC5A* inducida por TPA.
4. Las vías de señalización de AKT, p38 y NF-κB no se encuentran implicadas en la regulación del ARNm de *GPRC5A* mediada por TPA. Sin embargo, la vía de señalización de AKT estaría implicada en la regulación negativa de los niveles basales del ARNm de *GPRC5A* en ausencia de TPA.
5. Se descartó un posible rol de la citoquina IL-1β y de la concentración intracelular de Cl⁻ en la regulación de la expresión del ARNm de *GPRC5A*, tanto basales como inducidos por TPA.
6. La quinasa SGK1 mostró un efecto dual en la regulación de *GPRC5A* en presencia o ausencia de TPA. Esta quinasa induce una regulación negativa de la expresión de *GPRC5A* en condiciones basales, aunque en presencia de TPA mostró una regulación positiva. Sin duda, sería interesante continuar los estudios sobre la acción de esta quinasa sobre la regulación de *GPRC5A* en próximos trabajos.

7. Aquí demostramos por primera vez que TPA es capaz de producir un aumento en los niveles de ROS celulares y mitocondriales en células T84. Esto sugiere que la inducción de la producción de ROS podría ser uno de los mecanismos por los cuales el TPA ejerce su acción promotora de tumores.
8. No se observó que el aumento en los niveles de ROS por TPA se correlacionara con la inducción de la expresión del ARNm de *GPRC5A*.
9. Los estudios realizados con las células T84 *KO GPRC5A*, demostraron que *GPRC5A* participa en la inducción de ROS celulares y mitocondriales por TPA.
10. Demostramos que TPA induce una disminución de la apoptosis en células T84 y *GPRC5A* podría ser el efector en la regulación de dicho proceso independientemente de la modulación de la actividad de la caspasa 3, 8 y 9.
11. En resumen, podemos concluir que TPA ejerce su efecto como promotor de tumores, al menos en parte, a través de la regulación de la expresión de la proteína *GPRC5A*. El hecho de que TPA y la inducción de la expresión de *GPRC5A* induzcan la producción de ROS y disminuyan la apoptosis es un claro indicio de un posible efecto oncogénico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jiang, F. and J.A. Doudna, *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. Annu Rev Biophys, 2017. **46**: p. 505-529.
2. Freudenberg, J.M., et al., *Uncovering new disease indications for G-protein coupled receptors and their endogenous ligands*. BMC Bioinformatics, 2018. **19**(1): p. 345.
3. Hauser, A.S., et al., *Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(12): p. 829-842.
4. Antal, C.E. and A.C. Newton, *Spatiotemporal dynamics of phosphorylation in lipid second messenger signaling*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(12): p. 3498-508.
5. Suhaili, S.H., et al., *Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization*. Biophys Rev, 2017. **9**(4): p. 443-457.
6. Wang, J., C. Gareri, and H.A. Rockman, *G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease*. Circ Res, 2018. **123**(6): p. 716-735.
7. Cafferata, E.G.A., *REGULACION DEL GEN CFTR (AFECTADO EN FIBROSIS QUISTICA) EN CELULAS DE CARCINOMA DE COLON HUMANO T84*. 2002.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Massotte, D. and B. Kieffer, *Structure—Function Relationships in G Protein-Coupled Receptors*. 2005.
10. Jiang, X., et al., *GPRC5A: An Emerging Biomarker in Human Cancer*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 1823726.
11. Pickar-Oliver, A. and C.A. Gersbach, *The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(8): p. 490-507.
12. Nishimasu, H. and O. Nureki, *Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases*. Curr Opin Struct Biol, 2017. **43**: p. 68-78.
13. Li, L., et al., *Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi*. Annu Rev Microbiol, 2007. **61**: p. 423-52.
14. Wu-Zhang, A.X. and A.C. Newton, *Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox*. Biochem J, 2013. **452**(2): p. 195-209.
15. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 90-113.
16. Gether, U., et al., *Structural basis for activation of G-protein-coupled receptors*. Pharmacol Toxicol, 2002. **91**(6): p. 304-12.
17. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
18. Schoneberg, T., A. Schulz, and T. Gudermann, *The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2002. **144**: p. 143-227.
19. Luo, J., et al., *Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48*. Development, 2009. **136**(16): p. 2747-56.
20. Luo, J., et al., *LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption*. Nat Med, 2016. **22**(5): p. 539-46.
21. Jastrzebska, B., et al., *A G Protein-Coupled Receptor Dimerization Interface in Human Cone Opsins*. Biochemistry, 2017. **56**(1): p. 61-72.
22. Adler, E., et al., *A novel family of mammalian taste receptors*. Cell, 2000. **100**(6): p. 693-702.
23. Katidou, M., et al., *G-protein coupled receptors Mc4r and Drd1a can serve as surrogate odorant receptors in mouse olfactory sensory neurons*. Mol Cell Neurosci, 2018. **88**: p. 138-147.
24. Grammatopoulos, D.K., *Regulation of G-protein coupled receptor signalling underpinning neurobiology of mood disorders and depression*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **449**: p. 82-89.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

25. Sharma, N., A.S. Akhade, and A. Qadri, *Sphingosine-1-phosphate suppresses TLR-induced CXCL8 secretion from human T cells*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(4): p. 521-8.
26. Carbone, S.E., et al., *G protein-coupled receptor trafficking and signaling: new insights into the enteric nervous system*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019. **316**(4): p. G446-G452.
27. Hazell, G.G.J., et al., *G protein-coupled receptors in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei--serpentine gateways to neuroendocrine homeostasis*. Frontiers in neuroendocrinology, 2012. **33**(1): p. 45-66.
28. Dorsam, R.T. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 79-94.
29. Birnbaumer, L., J. Abramowitz, and A.M. Brown, *Receptor-effector coupling by G proteins*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1031**(2): p. 163-224.
30. Drews, J., *Drug discovery: a historical perspective*. Science, 2000. **287**(5460): p. 1960-4.
31. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *The druggable genome*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(9): p. 727-30.
32. Klabunde, T. and G. Hessler, *Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors*. Chembiochem, 2002. **3**(10): p. 928-44.
33. Ballesteros, J.A., & Weinstein, H., *Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors*. Methods Neurosci, 1994. **25**: p. 366-428.
34. McCudden, C.R., et al., *G-protein signaling: back to the future*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(5): p. 551-77.
35. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
36. Ross, E.M. and T.M. Wilkie, *GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 795-827.
37. Hurley, J.H., *Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7599-602.
38. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 281-312.
39. Cabrera-Vera, T.M., et al., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. Endocr Rev, 2003. **24**(6): p. 765-81.
40. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 669-72.
41. Khan, S.M., et al., *The expanding roles of Gbetagamma subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(2): p. 545-77.
42. Claing, A., et al., *Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(2): p. 61-79.
43. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 1-24.
44. Benovic, J.L., et al., *Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(9): p. 2797-801.
45. Strasser, R.H., et al., *Beta-agonist- and prostaglandin E1-induced translocation of the beta-adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylyl cyclase-coupled receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(17): p. 6362-6366.
46. Premont, R.T. and R.R. Gainetdinov, *Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 511-34.
47. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

48. Evron, T., T.L. Daigle, and M.G. Caron, *GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(3): p. 154-64.
49. Murphy, J.E., et al., *Endosomes: a legitimate platform for the signaling train*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(42): p. 17615-17622.
50. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(9): p. 521-33.
51. Walther, C. and S.S. Ferguson, *Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **118**: p. 93-113.
52. Marchese, A. and J. Trejo, *Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling*. Cell Signal, 2013. **25**(3): p. 707-16.
53. Urban, J.D., et al., *Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 1-13.
54. Wacker, D., R.C. Stevens, and B.L. Roth, *How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology*. Cell, 2017. **170**(3): p. 414-427.
55. Brady, A.E. and L.E. Limbird, *G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction*. Cell Signal, 2002. **14**(4): p. 297-309.
56. Kuemmerle, J.F. and K.S. Murthy, *Coupling of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase to Gi2 in human intestinal smooth muscle: Gbetagamma -dependent mitogen-activated protein kinase activation and growth*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7187-94.
57. Kolakowski, L.F., Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors Channels, 1994. **2**(1): p. 1-7.
58. Probst, W.C., et al., *Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily*. DNA Cell Biol, 1992. **11**(1): p. 1-20.
59. Attwood, T.K. and J.B. Findlay, *Fingerprinting G-protein-coupled receptors*. Protein Eng, 1994. **7**(2): p. 195-203.
60. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
61. Nordstrom, K.J., et al., *Independent HHsearch, Needleman--Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families*. Mol Biol Evol, 2011. **28**(9): p. 2471-80.
62. Hu, G.-M., T.-L. Mai, and C.-M. Chen, *Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 15495-15495.
63. Venkatakrishnan, A.J., et al., *Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region*. Nature, 2016. **536**(7617): p. 484-487.
64. DeVree, B.T., et al., *Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 182-6.
65. Bortolato, A., et al., *Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery*. British journal of pharmacology, 2014. **171**(13): p. 3132-3145.
66. Hollenstein, K., et al., *Insights into the structure of class B GPCRs*. Trends in pharmacological sciences, 2014. **35**(1): p. 12-22.
67. Liang, Y.L., et al., *Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex*. Nature, 2018. **555**(7694): p. 121-125.
68. Wootten, D., et al., *Allostery and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors*. Chem Rev, 2017. **117**(1): p. 111-138.
69. Kunishima, N., et al., *Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor*. Nature, 2000. **407**(6807): p. 971-7.
70. Geng, Y., et al., *Structural mechanism of ligand activation in human GABA(B) receptor*. Nature, 2013. **504**(7479): p. 254-9.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

71. Møller, T.C., Moreno- Delgado, D., Pin, J.-P. & Kniazeff, J., *Class C G protein- coupled receptors: reviving old couples with new partners*. Biophys. Rep. , 2017: p. 3, 57–63
72. Xue, L., et al., *Major ligand-induced rearrangement of the heptahelical domain interface in a GPCR dimer*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(2): p. 134-40.
73. Frangaj, A. and Q.R. Fan, *Structural biology of GABAB receptor*. Neuropharmacology, 2018. **136**(Pt A): p. 68-79.
74. Schioth, H.B. and R. Fredriksson, *The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective*. Gen Comp Endocrinol, 2005. **142**(1-2): p. 94-101.
75. Mazarati, A., U. Langel, and T. Bartfai, *Galanin: an endogenous anticonvulsant?* Neuroscientist, 2001. **7**(6): p. 506-17.
76. Brassai, A., et al., *Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity*. Brain Res Bull, 2015. **112**: p. 1-6.
77. Hamza, T.H., et al., *Glutamate receptor gene GRIN2A, coffee, and Parkinson disease*. PLoS genetics, 2014. **10**(11): p. e1004774-e1004774.
78. Wu, J., T. Tang, and I. Bezprozvanny, *Evaluation of clinically relevant glutamate pathway inhibitors in in vitro model of Huntington's disease*. Neurosci Lett, 2006. **407**(3): p. 219-23.
79. Elia, J., et al., *Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder*. Nat Genet, 2011. **44**(1): p. 78-84.
80. Vadasz, C., et al., *Glutamate receptor metabotropic 7 is cis-regulated in the mouse brain and modulates alcohol drinking*. Genomics, 2007. **90**(6): p. 690-702.
81. Schmeisser, M.J., et al., *Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 256-60.
82. Singh, A., J.J. Nunes, and B. Ateeq, *Role and therapeutic potential of G-protein coupled receptors in breast cancer progression and metastases*. Eur J Pharmacol, 2015. **763**(Pt B): p. 178-83.
83. Bar-Shavit, R., et al., *G Protein-Coupled Receptors in Cancer*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
84. O'Hayre, M., et al., *The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(6): p. 412-24.
85. Kan, Z., et al., *Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 869-73.
86. Kuzumaki, N., et al., *Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e44368.
87. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(8): p. 582-91.
88. Yang, M., et al., *G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 6027-32.
89. Chen, M., L.N. Towers, and K.L. O'Connor, *LPA2 (EDG4) mediates Rho-dependent chemotaxis with lower efficacy than LPA1 (EDG2) in breast carcinoma cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1927-33.
90. Bian, D., et al., *The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration*. Oncogene, 2006. **25**: p. 2234-44.
91. Szczesniak, A.M., et al., *Mechanical loading modulates glutamate receptor subunit expression in bone*. Bone, 2005. **37**(1): p. 63-73.
92. Luo, J., et al., *The role of GPCRs in bone diseases and dysfunctions*. Bone Res, 2019. **7**: p. 19.
93. Fasciolo, J.C., B.A. Houssay, and A.C. Taquini, *The blood-pressure raising secretion of the ischaemic kidney*. J Physiol, 1938. **94**(3): p. 281-93.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

94. Irving, L., *Claude Bernard's an introduction to the study of experimental medicine*. Med J Aust, 1965. **1**(193): p. 1043–1043.
95. Braun-Menendez, E., *La sustancia hipertensora de la sangre del riñón isquemiado*. Revista de la Sociedad Argentina de Biología, 1939. **15**: p. 420–425.
96. Fasciolo, J.C., *The experimental observation that led to discovery of angiotensin. 1939 Buenos Aires, Argentina*. Hypertension, 1990. **16**(2): p. 194-8.
97. Page, I.H. and O.M. Helmer, *A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR*. J Exp Med, 1940. **71**(1): p. 29-42.
98. Menendez, E.B., et al., *ANGIOTONIN OR HYPERTENSIN*. Science, 1943. **98**(2553): p. 495.
99. Smulyan, H. and D. Villarreal, *The Birth of Angiotensin: An International Compromise*. Am J Med Sci, 2019. **357**(3): p. 179-183.
100. Skeggs, L.T., Jr., et al., *The existence of two forms of hypertensin*. The Journal of experimental medicine, 1954. **99**(3): p. 275-282.
101. Skeggs, L.T., Jr., J.R. Kahn, and N.P. Shumway, *The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme*. J Exp Med, 1956. **103**(3): p. 295-9.
102. Zhang, C., S. Wu, and D. Xu, *Catalytic mechanism of angiotensin-converting enzyme and effects of the chloride ion*. J Phys Chem B, 2013. **117**(22): p. 6635-45.
103. Masuyer, G., et al., *Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence*. Biol Chem, 2014. **395**(10): p. 1135-49.
104. McCallum, L., S. Lip, and S. Padmanabhan, *The hidden hand of chloride in hypertension*. Pflugers Arch, 2015. **467**(3): p. 595-603.
105. Zhu, W., et al., *beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart: from bench to the bedside*. Curr Top Membr, 2011. **67**: p. 191-204.
106. Xie, H. and S.H. He, *Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(19): p. 2851-7.
107. Sexton, P.M. and A. Christopoulos, *To Bind or Not to Bind: Unravelling GPCR Polypharmacology*. Cell, 2018. **172**(4): p. 636-638.
108. Sriram, K. and P.A. Insel, *G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs?* Mol Pharmacol, 2018. **93**(4): p. 251-258.
109. Insel, P.A., et al., *G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Expression in Native Cells: "Novel" endoGPCRs as Physiologic Regulators and Therapeutic Targets*. Molecular pharmacology, 2015. **88**(1): p. 181-187.
110. Wang, J.J., et al., *Gpr97 is essential for the follicular versus marginal zone B-lymphocyte fate decision*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e853.
111. Zhang, L., et al., *Elevation of GPRC5A expression in colorectal cancer promotes tumor progression through VNN-1 induced oxidative stress*. Int J Cancer, 2017. **140**(12): p. 2734-2747.
112. Jahny, E., et al., *The G Protein-Coupled Receptor RAI3 Is an Independent Prognostic Factor for Pancreatic Cancer Survival and Regulates Proliferation via STAT3 Phosphorylation*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170390.
113. Fujimoto, J., et al., *G-protein coupled receptor family C, group 5, member A (GPRC5A) expression is decreased in the adjacent field and normal bronchial epithelia of patients with chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(12): p. 1747-1754.
114. Patel, H.H. and R.S. Ostrom, *An orphan GPCR finds a home in the heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H479-81.
115. Rimkus, T.K., et al., *Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors*. Cancers (Basel), 2016. **8**(2).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

116. Huang, Y., et al., *Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(309): p. 309ra164.
117. Overton, H.A., M.C.T. Fyfe, and C. Reynet, *GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity*. *British journal of pharmacology*, 2008. **153 Suppl 1**(Suppl 1): p. S76-S81.
118. Christopoulos, A., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(4): p. 918-47.
119. Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(5): p. 373-86.
120. Basith, S., et al., *Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design*. *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 128.
121. Miller, P.D., et al., *Effect of Abaloparatide vs Placebo on New Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis: A Randomized Clinical Trial*. *JAMA*, 2016. **316**(7): p. 722-33.
122. Cafferata, E.G., et al., *Identification by differential display of a mRNA specifically induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in T84 human colon carcinoma cells*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1996. **42**(5): p. 797-804.
123. Cafferata, E.G.A., *Regulación del Gen CFTR (Afectado en Fibrosis Quística) en Células de Carcinoma de Colon Humano T84*. in *Facultad de Farmacia y Bioquímica*. 2002, Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires, 2002: p. 99.
124. E. Cafferata, A.G.-G., O. Pivetta, T. Santa-Coloma, [*Identificación mediante "differential display" de genes específicamente regulados por diferentes factores que afectan la expresión del CFTR (canal de cloro afectado en Fibrosis Quística)*]. Abstract M99, 1995.
125. Cheng, Y. and R. Lotan, *Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(52): p. 35008-15.
126. Robbins, M.J., et al., *Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C)*. *Genomics*, 2000. **67**(1): p. 8-18.
127. Brauner-Osborne, H., et al., *Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1518**(3): p. 237-48.
128. Brauner-Osborne, H. and P. Krogsgaard-Larsen, *Sequence and expression pattern of a novel human orphan G-protein-coupled receptor, GPRC5B, a family C receptor with a short amino-terminal domain*. *Genomics*, 2000. **65**(2): p. 121-8.
129. Fagerberg, L., et al., *Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(2): p. 397-406.
130. Mori, C., et al., *Identification and characterization of human PEIG-1/GPRC5A as a 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) and PKC-induced gene*. *Arch Biochem Biophys*, 2020. **687**: p. 108375.
131. Gutierrez-Mazariegos, J., M. Schubert, and V. Laudet, *Evolution of retinoic acid receptors and retinoic acid signaling*. *Subcell Biochem*, 2014. **70**: p. 55-73.
132. Sun, S.Y. and R. Lotan, *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **41**(1): p. 41-55.
133. Lotan, R., *Retinoids and chemoprevention of aerodigestive tract cancers*. *Cancer Metastasis Rev*, 1997. **16**(3-4): p. 349-56.
134. Chen, S., et al., *Effect of all-trans-retinoic acid on enterovirus 71 infection in vitro*. *Br J Nutr*, 2014. **111**(9): p. 1586-93.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

135. Bocher, W.O., et al., *All-trans retinoic acid for treatment of chronic hepatitis C*. Liver Int, 2008. **28**(3): p. 347-54.
136. Surman, S.L., et al., *Oral retinyl palmitate or retinoic acid corrects mucosal IgA responses toward an intranasal influenza virus vaccine in vitamin A deficient mice*. Vaccine, 2014. **32**(22): p. 2521-2524.
137. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
138. Allenby, G., et al., *Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(1): p. 30-34.
139. Ye, X., et al., *Mechanisms underlying the induction of the putative human tumor suppressor GPRC5A by retinoic acid*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(10): p. 951-62.
140. Ghyselinck, N.B. and G. Duyster, *Retinoic acid signaling pathways*. Development, 2019. **146**(13).
141. Tang, X.H. and L.J. Gudas, *Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 345-64.
142. Chen, M.-C., et al., *Retinoic acid and cancer treatment*. BioMedicine, 2014. **4**(4): p. 22-22.
143. Hirano, M., et al., *Novel reciprocal regulation of cAMP signaling and apoptosis by orphan G-protein-coupled receptor GPRC5A gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(1): p. 185-91.
144. Wu, Q., et al., *Integrative genomics revealed RAI3 is a cell growth-promoting gene and a novel P53 transcriptional target*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12935-43.
145. Jin, E., et al., *Lung cancer suppressor gene GPRC5A mediates p53 activity in nonsmall cell lung cancer cells in vitro*. Mol Med Rep, 2017. **16**(5): p. 6382-6388.
146. Levy-Lahad, E. and E. Friedman, *Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. British journal of cancer, 2007. **96**(1): p. 11-15.
147. Sokolenko, A.P., et al., *High prevalence of GPRC5A germline mutations in BRCA1-mutant breast cancer patients*. Int J Cancer, 2014. **134**(10): p. 2352-8.
148. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
149. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
150. Zhou, H. and I. Rigoutsos, *The emerging roles of GPRC5A in diseases*. Oncoscience, 2014. **1**(12): p. 765-76.
151. Zhou, H. and I. Rigoutsos, *MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells*. RNA, 2014. **20**(9): p. 1431-9.
152. Shrestha, S., et al., *Integrated MicroRNA-mRNA Analysis Reveals miR-204 Inhibits Cell Proliferation in Gastric Cancer by Targeting CKS1B, CXCL1 and GPRC5A*. International journal of molecular sciences, 2017. **19**(1): p. 87.
153. Zhou, H., et al., *GPRC5A is a potential oncogene in pancreatic ductal adenocarcinoma cells that is upregulated by gemcitabine with help from HuR*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2294.
154. Brennan, C.M. and J.A. Steitz, *HuR and mRNA stability*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(2): p. 266-77.
155. Lin, X., et al., *EGFR phosphorylates and inhibits lung tumor suppressor GPRC5A in lung cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 233.
156. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
157. Hallam, S., et al., *Activated macrophages in the tumour microenvironment-dancing to the tune of TLR and NF-kappaB*. J Pathol, 2009. **219**(2): p. 143-52.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

158. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor downstream signaling*. *Arthritis research & therapy*, 2005. **7**(1): p. 12-19.
159. Deng, J., et al., *Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF-kappaB activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis*. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 2010. **3**(4): p. 424-437.
160. Liao, Y., et al., *Gprc5a-deficiency confers susceptibility to endotoxin-induced acute lung injury via NF-kB pathway*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2015. **14**(9): p. 1403-1412.
161. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
162. Bourguignon, L.Y., et al., *Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(2): p. 149-60.
163. Alexandrow, M.G., et al., *Curcumin: a novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer*. *Eur J Cancer Prev*, 2012. **21**(5): p. 407-12.
164. Anglesio, M.S., et al., *IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(8): p. 2538-48.
165. Takemoto, S., et al., *Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(6): p. 967-72.
166. Guo, C., et al., *Activation of Stat3 in renal tumors*. *American journal of translational research*, 2009. **1**(3): p. 283-290.
167. Sheen-Chen, S.M., et al., *Prognostic value of signal transducers and activators of transcription 3 in breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. **17**(9): p. 2286-90.
168. Mora, L.B., et al., *Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6659-66.
169. Chen, Y., et al., *Gprc5a deletion enhances the transformed phenotype in normal and malignant lung epithelial cells by eliciting persistent Stat3 signaling induced by autocrine leukemia inhibitory factor*. *Cancer Res*, 2010. **70**(21): p. 8917-26.
170. Liu, S., et al., *Repression of GPRC5A is associated with activated STAT3, which contributes to tumor progression of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Cell Int*, 2017. **17**: p. 34.
171. Reddig, P.J. and R.L. Juliano, *Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival*. *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(3): p. 425-39.
172. Makrilia, N., et al., *Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(10): p. 1023-37.
173. Berrier, A.L. and K.M. Yamada, *Cell-matrix adhesion*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(3): p. 565-73.
174. Desgrosellier, J.S. and D.A. Cheresh, *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(1): p. 9-22.
175. Hamadi, A., et al., *Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 19): p. 4415-25.
176. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(1): p. 21-33.
177. Bulanova, D.R., et al., *Orphan G protein-coupled receptor GPRC5A modulates integrin beta1-mediated epithelial cell adhesion*. *Cell Adh Migr*, 2017. **11**(5-6): p. 434-446.
178. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 633-43.
179. Huveneers, S. and E.H. Danen, *Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 8): p. 1059-69.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

180. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology (Bethesda, Md.), 2010. **25**(2): p. 85-101.
181. Davies, M.A. and Y. Samuels, *Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma*. Oncogene, 2010. **29**(41): p. 5545-55.
182. Burkhart, D.L. and J. Sage, *Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(9): p. 671-82.
183. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 103-12.
184. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation*. Int J Cancer, 2009. **125**(8): p. 1747-54.
185. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
186. Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 227-35.
187. R., V., *Die krankhaften Geschwülste*. Berlin: August Hirschwald, 1863.
188. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
189. Germano, G., P. Allavena, and A. Mantovani, *Cytokines as a key component of cancer-related inflammation*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 374-9.
190. Apte, R.N. and E. Voronov, *Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(4): p. 277-90.
191. Colasante, A., et al., *Transforming growth factor beta 1, interleukin-8 and interleukin-1, in non-small-cell lung tumors*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 968-73.
192. Bessler, H. and M. Djaldetti, *Role of the equilibrium between colon cancer and mononuclear cells in cytokine production*. Biomed Pharmacother, 2010. **64**(10): p. 706-11.
193. Kaler, P., et al., *The NF- κ B/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1 β* . Cancer Microenviron, 2009. **2**(1): p. 69-80.
194. Jedinak, A., S. Dudhgaonkar, and D. Sliva, *Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells*. Immunobiology, 2010. **215**(3): p. 242-9.
195. Kaler, P., L. Augenlicht, and L. Klampfer, *Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3*. Oncogene, 2009. **28**(44): p. 3892-3902.
196. Seyfried, T.N. and L.C. Huysentruyt, *On the origin of cancer metastasis*. Critical reviews in oncogenesis, 2013. **18**(1-2): p. 43-73.
197. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
198. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
199. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 445-76.
200. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
201. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
202. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
203. Cohen, J.J., et al., *Apoptosis and programmed cell death in immunity*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 267-93.
204. Hetts, S.W., *To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease*. Jama, 1998. **279**(4): p. 300-7.
205. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

206. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
207. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
208. Shestov, A.A., et al., *Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step*. Elife, 2014. **3**.
209. Estrella, V., et al., *Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion*. Cancer research, 2013. **73**(5): p. 1524-1535.
210. Gatenby, R.A. and E.T. Gawlinski, *A reaction-diffusion model of cancer invasion*. Cancer Res, 1996. **56**(24): p. 5745-53.
211. Colegio, O.R., et al., *Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid*. Nature, 2014. **513**(7519): p. 559-63.
212. Chang, C.H., et al., *Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression*. Cell, 2015. **162**(6): p. 1229-41.
213. Valdivieso, A.G., et al., *Impairment of CFTR activity in cultured epithelial cells upregulates the expression and activity of LDH resulting in lactic acid hypersecretion*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(8): p. 1579-1593.
214. Locasale, J.W. and L.C. Cantley, *Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 443-51.
215. Rodic, S. and M.D. Vincent, *Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype*. Int J Cancer, 2018. **142**(3): p. 440-448.
216. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
217. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 537-48.
218. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 51-6.
219. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
220. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 472-82.
221. Greenhough, A., et al., *Cancer cell adaptation to hypoxia involves a HIF-GPRC5A-YAP axis*. EMBO Mol Med, 2018. **10**(11).
222. Maeda, H. and T. Akaike, *Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer*. Biochemistry (Mosc), 1998. **63**(7): p. 854-65.
223. Rovin, B.H., E. Wurst, and D.E. Kohan, *Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture*. Kidney Int, 1990. **37**(6): p. 1509-14.
224. Liou, G.-Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free radical research, 2010. **44**(5): p. 479-496.
225. Storz, P., *Reactive oxygen species in tumor progression*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1881-96.
226. Sztatowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 794-8.
227. Sundaresan, M., et al., *Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction*. Science, 1995. **270**(5234): p. 296-9.
228. Colavitti, R., et al., *Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3101-8.
229. Finkel, T., *Redox-dependent signal transduction*. FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 52-4.
230. Hensley, K. and R.A. Floyd, *Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 377-83.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

231. Irani, K., *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling*. *Circ Res*, 2000. **87**(3): p. 179-83.
232. Chiarugi, P. and T. Fiaschi, *Redox signalling in anchorage-dependent cell growth*. *Cell Signal*, 2007. **19**(4): p. 672-82.
233. Rhee, S.G., et al., *Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation*. *Sci STKE*, 2000. **2000**(53): p. pe1.
234. Konishi, H., et al., *Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11233-7.
235. Konishi, H., et al., *Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6587-92.
236. Denu, J.M. and J.E. Dixon, *Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation*. *Current opinion in chemical biology*, 1998. **2**(5): p. 633-641.
237. Meng, T.-C., T. Fukada, and N.K. Tonks, *Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo*. *Molecular cell*, 2002. **9**(2): p. 387-399.
238. Blanchetot, C., L.G.J. Tertoolen, and J. den Hertog, *Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(4): p. 493-503.
239. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. *Biochimica et biophysica acta*, 2007. **1773**(8): p. 1263-1284.
240. Steelman, L.S., et al., *Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia*. *Leukemia*, 2008. **22**(4): p. 686-707.
241. Khavari, T.A. and J. Rinn, *Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(23): p. 2928-31.
242. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3291-310.
243. Wu, W.S., et al., *Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(10): p. 747-58.
244. Liu, L.Z., et al., *Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(10): p. 1521-33.
245. Park, S.A., et al., *4-hydroxyestradiol induces anchorage-independent growth of human mammary epithelial cells via activation of I κ B kinase: potential role of reactive oxygen species*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2416-24.
246. Burdick, A.D., et al., *Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7825-33.
247. Mochizuki, T., et al., *Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(26): p. 3699-707.
248. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
249. Pastorino, J.G., M. Tafani, and J.L. Farber, *Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(27): p. 19411-6.
250. Xin, M. and X. Deng, *Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(11): p. 10781-9.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

251. Qi, X.J., G.M. Wildey, and P.H. Howe, *Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 813-23.
252. Limaye, V., et al., *Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3169-77.
253. Bassères, D.S. and A.S. Baldwin, *Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6817-30.
254. Biswas, D.K. and J.D. Iglehart, *Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer*. J Cell Physiol, 2006. **209**(3): p. 645-52.
255. Biswas, D.K., et al., *NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10137-42.
256. Rayet, B. and C. Gélinas, *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6938-47.
257. Ahmed, K.M., N. Cao, and J.J. Li, *HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer*. Anticancer Res, 2006. **26**(6b): p. 4235-43.
258. Bourguignon, L.Y., W. Xia, and G. Wong, *Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2657-71.
259. Duffey, D.C., et al., *Inhibition of transcription factor nuclear factor-kappaB by a mutant inhibitor-kappaBalpha attenuates resistance of human head and neck squamous cell carcinoma to TNF-alpha caspase-mediated cell death*. Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1367-74.
260. Li, N. and M. Karin, *Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?* FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1137-43.
261. Schreck, R., K. Albermann, and P.A. Baeuerle, *Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)*. Free Radic Res Commun, 1992. **17**(4): p. 221-37.
262. Janssen-Heininger, Y.M., M.E. Poynter, and P.A. Baeuerle, *Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1317-27.
263. Li, Q. and J.F. Engelhardt, *Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1495-505.
264. Manna, S.K., et al., *Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13245-54.
265. Storz, P., H. Döppler, and A. Toker, *Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2614-26.
266. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. Science, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
267. Moon, D.O., et al., *Butein induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation*. Cancer Lett, 2010. **288**(2): p. 204-13.
268. Shi, Y., R.P. Sahu, and S.K. Srivastava, *Triphala inhibits both in vitro and in vivo xenograft growth of pancreatic tumor cells by inducing apoptosis*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 294.
269. Cadenas, E., *Mitochondrial free radical production and cell signaling*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(1-2): p. 17-26.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

270. Storz, P., *Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(1): p. 13-8.
271. Schroeter, H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 2): p. 359-69.
272. Tournier, C., et al., *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway*. Science, 2000. **288**(5467): p. 870-4.
273. Whitfield, J., et al., *Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release*. Neuron, 2001. **29**(3): p. 629-43.
274. Clazure, M., et al., *Disruption of interleukin-1beta autocrine signaling rescues complex I activity and improves ROS levels in immortalized epithelial cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99257.
275. Clazure, M., et al., *Intracellular Chloride Concentration Changes Modulate IL-1beta Expression and Secretion in Human Bronchial Epithelial Cultured Cells*. J Cell Biochem, 2017. **118**(8): p. 2131-2140.
276. Valdivieso, A.G., et al., *The Chloride Anion Acts as a Second Messenger in Mammalian Cells - Modifying the Expression of Specific Genes*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(1): p. 49-64.
277. Valdivieso, A.G., et al., *CFTR modulates RPS27 gene expression using chloride anion as signaling effector*. Archives of biochemistry and biophysics, 2017. **633**: p. 103-109.
278. Massip-Copiz, M.M., et al., *CFTR impairment upregulates c-Src activity through IL-1beta autocrine signaling*. Arch Biochem Biophys, 2017. **616**: p. 1-12.
279. Massip-Copiz, M., et al., *Epiregulin (EREG) is upregulated through an IL-1β autocrine loop in Caco-2 epithelial cells with reduced CFTR function*. J Cell Biochem, 2018. **119**(3): p. 2911-2922.
280. Chio, I.I.C. and D.A. Tuveson, *ROS in Cancer: The Burning Question*. Trends in molecular medicine, 2017. **23**(5): p. 411-429.
281. Starkov, A.A., *The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1147**: p. 37-52.
282. Raffaello, A. and R. Rizzuto, *Mitochondrial longevity pathways*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(1): p. 260-8.
283. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
284. Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef, *The neutrophil NADPH oxidase*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 342-4.
285. Banskota, S., S.C. Regmi, and J.A. Kim, *NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 123.
286. Juhasz, A., et al., *Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues*. Free radical research, 2009. **43**(6): p. 523-532.
287. Hirano, K., et al., *Discovery of GSK2795039, a Novel Small Molecule NADPH Oxidase 2 Inhibitor*. Antioxidants & redox signaling, 2015. **23**(5): p. 358-374.
288. Fisher, A.B., *Redox signaling across cell membranes*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1349-56.
289. Lloyd, R.V., P.M. Hanna, and R.P. Mason, *The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(5): p. 885-8.
290. Dizdaroglu, M. and P. Jaruga, *Mechanisms of free radical-induced damage to DNA*. Free Radic Res, 2012. **46**(4): p. 382-419.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

291. Halliwell, B. and C.E. Cross, *Reactive oxygen species, antioxidants, and acquired immunodeficiency syndrome. Sense or speculation?* Arch Intern Med, 1991. **151**(1): p. 29-31.
292. Fridovich, I., *Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters.* J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18515-7.
293. Iñarrea, P., et al., *Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase.* Biochem J, 2005. **387**(Pt 1): p. 203-9.
294. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species.* Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
295. Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen, *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane.* J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49064-73.
296. Sturtz, L.A., et al., *A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage.* J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38084-9.
297. Strålin, P., et al., *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 2032-6.
298. Couto, N., J. Wood, and J. Barber, *The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network.* Free Radic Biol Med, 2016. **95**: p. 27-42.
299. Perkins, A., et al., *Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling.* Trends in biochemical sciences, 2015. **40**(8): p. 435-445.
300. Nandi, A., et al., *Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases.* Oxidative medicine and cellular longevity, 2019. **2019**: p. 9613090-9613090.
301. Mirończuk-Chodakowska, I., A.M. Witkowska, and M.E. Zujko, *Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body.* Adv Med Sci, 2018. **63**(1): p. 68-78.
302. Valdivieso Á, G., et al., *N-acetyl cysteine reverts the proinflammatory state induced by cigarette smoke extract in lung Calu-3 cells.* Redox Biol, 2018. **16**: p. 294-302.
303. Kabil, O., N. Motl, and R. Banerjee, *H₂S and its role in redox signaling.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(8): p. 1355-66.
304. Libiad, M., et al., *Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway.* J Biol Chem, 2014. **289**(45): p. 30901-10.
305. Ezeriņa, D., et al., *N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H(2)S and Sulfane Sulfur Production.* Cell Chem Biol, 2018. **25**(4): p. 447-459.e4.
306. Kolber, M.A., K.O. Broschat, and B. Landa-Gonzalez, *Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation.* Faseb j, 1990. **4**(12): p. 3021-7.
307. Savill, J., et al., *Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1513-22.
308. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.* J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
309. Krahling, S., et al., *Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages.* Cell Death Differ, 1999. **6**(2): p. 183-9.
310. Piacentini, M., et al., *The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis).* Eur J Cell Biol, 1991. **54**(2): p. 246-54.
311. Arends, M.J., R.G. Morris, and A.H. Wyllie, *Apoptosis. The role of the endonuclease.* The American journal of pathology, 1990. **136**(3): p. 593-608.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

312. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
313. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, *TNF-induced signaling in apoptosis*. J Clin Immunol, 1999. **19**(6): p. 350-64.
314. Peter, M.E. and P.H. Kramer, *Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 545-51.
315. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8628-33.
316. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
317. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. Embo j, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
318. Reed, J.C., *Bcl-2 family proteins*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3225-36.
319. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
320. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
321. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
322. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-63.
323. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2060-71.
324. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 617-25.
325. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
326. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
327. Dewson, G. and R.M. Kluck, *Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 16): p. 2801-8.
328. Riley, J.S., et al., *Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis*. Embo j, 2018. **37**(17).
329. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
330. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
331. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
332. Kidd, V.J., *Proteolytic activities that mediate apoptosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 533-73.
333. Cryns, V. and J. Yuan, *Proteases to die for*. Genes Dev, 1998. **12**(11): p. 1551-70.
334. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
335. Butt, A.J., et al., *Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6763-8.
336. Fraser, A. and G. Evan, *A license to kill*. Cell, 1996. **85**(6): p. 781-4.
337. Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-15.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

338. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
339. Junttila, M.R. and G.I. Evan, *p53--a Jack of all trades but master of none*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 821-9.
340. Lüscher, B. and J. Vervoorts, *Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC*. Gene, 2012. **494**(2): p. 145-60.
341. Wang, Y.-Y., X.-L. Liu, and R. Zhao, *Induction of Pyroptosis and Its Implications in Cancer Management*. Frontiers in oncology, 2019. **9**: p. 971-971.
342. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
343. Tsapras, P. and I.P. Nezis, *Caspase involvement in autophagy*. Cell Death Differ, 2017. **24**(8): p. 1369-1379.
344. Mansilla, S., W. Priebe, and J. Portugal, *Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Cell Cycle, 2006. **5**(1): p. 53-60.
345. Jiménez Fernández, D. and M. Lamkanfi, *Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death*. Biol Chem, 2015. **396**(3): p. 193-203.
346. Beisner, D.R., et al., *Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3469-73.
347. Puccini, J., L. Dorstyn, and S. Kumar, *Caspase-2 as a tumour suppressor*. Cell death and differentiation, 2013. **20**(9): p. 1133-1139.
348. Bell, R.A.V. and L.A. Megeney, *Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth*. Cell death and differentiation, 2017. **24**(8): p. 1359-1368.
349. Yamaguchi, Y. and M. Miura, *Programmed Cell Death and Caspase Functions During Neural Development*. Curr Top Dev Biol, 2015. **114**: p. 159-84.
350. Shalini, S., et al., *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell death and differentiation, 2015. **22**(4): p. 526-539.
351. Zhong, S., et al., *Lung Tumor Suppressor GPRC5A Binds EGFR and Restrains Its Effector Signaling*. Cancer Res, 2015. **75**(9): p. 1801-14.
352. Tao, Q., et al., *Identification of the retinoic acid-inducible Gprc5a as a new lung tumor suppressor gene*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(22): p. 1668-82.
353. Deng, J., et al., *Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF-kappaB activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(4): p. 424-37.
354. Fujimoto, J., et al., *Comparative functional genomics analysis of NNK tobacco-carcinogen induced lung adenocarcinoma development in Gprc5a-knockout mice*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11847.
355. Barta, P., et al., *Enhancement of lung tumorigenesis in a Gprc5a Knockout mouse by chronic extrinsic airway inflammation*. Mol Cancer, 2012. **11**: p. 4.
356. Wang, J., et al., *GPRC5A suppresses protein synthesis at the endoplasmic reticulum to prevent radiation-induced lung tumorigenesis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11795.
357. Liu, S.L., et al., *Repression of G protein-coupled receptor family C group 5 member A is associated with pathologic differentiation grade of oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2013. **42**(10): p. 761-8.
358. Zougman, A., et al., *Retinoic acid-induced protein 3: identification and characterisation of a novel prognostic colon cancer biomarker*. Eur J Cancer, 2013. **49**(2): p. 531-9.
359. Kume, H., et al., *Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(6): p. 1471-84.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

360. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
361. Ruoslahti, E., *Specialization of tumour vasculature*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 83-90.
362. McIntyre, A. and A.L. Harris, *Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(4): p. 368-79.
363. Bottaro, D.P. and L.A. Liotta, *Cancer: Out of air is not out of action*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 593-5.
364. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
365. Cheng, L., et al., *Global gene expression and functional network analysis of gastric cancer identify extended pathway maps and GPRC5A as a potential biomarker*. Cancer Lett, 2012. **326**(1): p. 105-13.
366. Liu, H., et al., *GPRC5A overexpression predicted advanced biological behaviors and poor prognosis in patients with gastric cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(1): p. 503-10.
367. Liang, M., et al., *Elevated levels of hsa_circ_006100 in gastric cancer promote cell growth and metastasis via miR-195/GPRC5A signalling*. Cell Prolif, 2019. **52**(5): p. e12661.
368. Liu, B., et al., *The Effect of GPRC5a on the Proliferation, Migration Ability, Chemotherapy Resistance, and Phosphorylation of GSK-3beta in Pancreatic Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
369. Sawada, Y., et al., *GPRC5A facilitates cell proliferation through cell cycle regulation and correlates with bone metastasis in prostate cancer*. Int J Cancer, 2019.
370. Xin, H., et al., *Establishment and characterization of 7 novel hepatocellular carcinoma cell lines from patient-derived tumor xenografts*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85308.
371. Zheng, J., et al., *Overexpression of retinoic acid-induced protein 3 predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma*. Clin Transl Oncol, 2014. **16**(1): p. 57-63.
372. Subrungruanga, I., et al., *Gene expression profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(1): p. 557-63.
373. Nagahata, T., et al., *Identification of RAI3 as a therapeutic target for breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 65-73.
374. Jorissen, H., et al., *Production and characterisation of monoclonal antibodies against RAI3 and its expression in human breast cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 200.
375. Dairkee, S.H., et al., *Immutable functional attributes of histologic grade revealed by context-independent gene expression in primary breast cancer cells*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7826-34.
376. Yang, L., T. Ma, and J. Zhang, *GPRC5A exerts its tumor-suppressive effects in breast cancer cells by inhibiting EGFR and its downstream pathway*. Oncol Rep, 2016. **36**(5): p. 2983-2990.
377. Ma, X., et al., *Depletion of Gprc5a Promotes Development of Diabetic Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(6): p. 1679-1689.
378. Castagna, M., et al., *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
379. Newton, A.C., *Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(4): p. 175-7.
380. Igumenova, T.I., *Dynamics and Membrane Interactions of Protein Kinase C*. Biochemistry, 2015. **54**(32): p. 4953-4968.
381. Giorgione, J.R., et al., *Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1660-9.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

382. Dries, D.R., L.L. Gallegos, and A.C. Newton, *A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 826-30.
383. Techasen, A., et al., *Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via the protein kinase C-dependent pathway*. Cancer Sci, 2010. **101**(3): p. 658-65.
384. Park, H.Y., et al., *Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16470-8.
385. Hofmann, J., *The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C*. FASEB J, 1997. **11**(8): p. 649-69.
386. Mochly-Rosen, D. and L.M. Kauvar, *Modulating protein kinase C signal transduction*. Adv Pharmacol, 1998. **44**: p. 91-145.
387. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
388. Dent, P. and S. Grant, *Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(4): p. 775-83.
389. Franklin, R.A. and J.A. McCubrey, *Kinases: positive and negative regulators of apoptosis*. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2019-34.
390. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
391. Mochly-Rosen, D. and L.M. Kauvar, *Pharmacological regulation of network kinetics by protein kinase C localization*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 55-61.
392. O'Brian, C., et al., *Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue*. Cancer Res, 1989. **49**(12): p. 3215-7.
393. Bae, K.M., et al., *Protein kinase C epsilon is overexpressed in primary human non-small cell lung cancers and functionally required for proliferation of non-small cell lung cancer cells in a p21/Cip1-dependent manner*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6053-63.
394. Sharif, T.R. and M. Sharif, *Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples*. Int J Oncol, 1999. **15**(2): p. 237-43.
395. Nanos-Webb, A., et al., *PKC α promotes ovarian tumor progression through deregulation of cyclin E*. Oncogene, 2016. **35**(19): p. 2428-40.
396. Varga, A., et al., *Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas*. Eur Urol, 2004. **46**(4): p. 462-5.
397. Brenner, W., et al., *Protein kinase C ϵ is associated with progression of renal cell carcinoma (RCC)*. Anticancer Res, 2003. **23**(5A): p. 4001-6.
398. Blay, P., et al., *Protein kinase C θ is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4089-95.
399. Zhang, L.L., et al., *The protein kinase C (PKC) inhibitors combined with chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: meta-analysis of randomized controlled trials*. Clin Transl Oncol, 2015. **17**(5): p. 371-7.
400. Slaga, T.J., J.D. Scribner, and A. Viaje, *Epidermal cell proliferation and promoting ability of phorbol esters*. J Natl Cancer Inst, 1976. **57**(5): p. 1145-9.
401. Carlson, R.P., et al., *Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents*. Agents Actions, 1985. **17**(2): p. 197-204.
402. Rao, T.S., et al., *Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation*. Inflammation, 1993. **17**(6): p. 723-41.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

403. Ashendel, C.L. and R.K. Boutwell, *Prostaglandin E and F levels in mouse epidermis are increased by tumor-promoting phorbol esters*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. **90**(2): p. 623-7.
404. Furstenberger, G. and F. Marks, *Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of cell proliferation in mouse epidermis in vivo by the phorbol ester TPA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980. **92**(3): p. 749-56.
405. Lin, C.W., et al., *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKC α /ERK/NF- κ B-dependent MMP-9 expression*. *J Cell Physiol*, 2010. **225**(2): p. 472-81.
406. Lin, C.W., et al., *Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC δ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(9): p. 1807-15.
407. Johnson, M.D., et al., *Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness*. *Exp Cell Res*, 1999. **247**(1): p. 105-13.
408. Lii, C.K., et al., *Docosahexaenoic acid inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced fascin-1-dependent breast cancer cell migration by suppressing the PKC δ -and Wnt-1/beta-catenin-mediated pathways*. *Oncotarget*, 2016. **7**(18): p. 25162-79.
409. Singh, T., et al., *Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E(2) and prostaglandin E(2) receptors*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(1): p. 86-92.
410. Okabe, K., et al., *Induction of lysophosphatidic acid receptor-3 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulates cell migration of rat liver cells*. *Cancer Lett*, 2011. **309**(2): p. 236-42.
411. Alfredsson, C.F., et al., *Altered sensitivity to ellagic acid in neuroblastoma cells undergoing differentiation with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and all-trans retinoic acid*. *Biomed Pharmacother*, 2015. **76**: p. 39-45.
412. Huberman, E. and M.F. Callahan, *Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(3): p. 1293-7.
413. Lotem, J. and L. Sachs, *Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. **76**(10): p. 5158-5162.
414. Rovera, G., D. Santoli, and C. Damsky, *Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(6): p. 2779-83.
415. Koeffler, H.P., M. Bar-Eli, and M. Territo, *Phorbol diester-induced macrophage differentiation of leukemic blasts from patients with human myelogenous leukemia*. *J Clin Invest*, 1980. **66**(5): p. 1101-8.
416. Huberman, E. and M.F. Callahan, *Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. **76**(3): p. 1293-1297.
417. Zheng, X., et al., *Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(20): p. 4489-99.
418. Tonetti, D.A., et al., *Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(37): p. 23230-5.
419. Macfarlane, D.E. and L. Manzel, *Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(6): p. 4327-31.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

420. Han, Z.T., et al., *Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5357-61.
421. Strair, R.K., et al., *Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(8): p. 2512-8.
422. Schaar, D., et al., *A phase I clinical trial of 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **57**(6): p. 789-95.
423. Schaar, D.G., et al., *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced dual-specificity phosphatase expression and AML cell survival*. Leuk Res, 2005. **29**(10): p. 1171-9.
424. Meinhardt, G. and R. Hass, *Differential expression of c-myc, max and mx1 in human myeloid leukemia cells during retrodifferentiation and cell death*. Leuk Res, 1995. **19**(10): p. 699-705.
425. Garcia de Herreros, A., et al., *The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate blocks differentiation of HT-29 human colon cancer cells*. J Cell Sci, 1993. **105** (Pt 4): p. 1165-72.
426. Han, Z.T., et al., *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5362-5.
427. Zhu, G., et al., *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is anti-tumorigenic in liver cancer cells via inhibiting YAP through AMOT*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44940.
428. Blagosklonny, M.V., *Cell senescence and hypermitogenic arrest*. EMBO reports, 2003. **4**(4): p. 358-362.
429. Blagosklonny, M.V., *The mitogen-activated protein kinase pathway mediates growth arrest or E1A-dependent apoptosis in SKBR3 human breast cancer cells*. Int J Cancer, 1998. **78**(4): p. 511-7.
430. Blagosklonny, M.V., *Oncogenic resistance to growth-limiting conditions*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 221-5.
431. Leontieva, O.V., Z.N. Demidenko, and M.V. Blagosklonny, *MEK drives cyclin D1 hyper-elevation during geroconversion*. Cell Death Differ, 2013. **20**(9): p. 1241-9.
432. Leontieva, O.V. and M.V. Blagosklonny, *Tumor promoter-induced cellular senescence: cell cycle arrest followed by geroconversion*. Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12715-27.
433. Chang, M.S., et al., *Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways*. Cell Signal, 2005. **17**(3): p. 299-310.
434. Pahlman, S., et al., *Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. Int J Cancer, 1981. **28**(5): p. 583-9.
435. Pahlman, S., et al., *Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation*. Cell Differ, 1984. **14**(2): p. 135-44.
436. Gupta, A.K., et al., *Topical cyclosporine A inhibits the phorbol ester induced hyperplastic inflammatory response but not protein kinase C activation in mouse epidermis*. J Invest Dermatol, 1989. **93**(3): p. 379-86.
437. Nakao, Y., et al., *Inhibitors of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced multinucleated cell formation and HTLV-I p19 antigen expression in HTLV-I-infected T-cell line KH-2Lo*. Int J Cancer, 1986. **37**(6): p. 911-7.
438. Kolb, T.M. and M.A. Davis, *The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) provokes a prolonged morphologic response and ERK activation in Tsc2-null renal tumor cells*. Toxicol Sci, 2004. **81**(1): p. 233-42.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

439. Lee, W., P. Mitchell, and R. Tjian, *Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements*. *Cell*, 1987. **49**(6): p. 741-52.
440. Salge, U., et al., *Differentiation capacity of human non-small-cell lung cancer cell lines after exposure to phorbol ester*. *Int J Cancer*, 1990. **45**(6): p. 1143-50.
441. Lee, H.W., et al., *Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras, ERK, and NF-kappa B*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(36): p. 32624-31.
442. Matsuda, S., et al., *Plant-derived diterpene esters enhance HTLV-I-induced colony formation of lymphocytes in co-culture*. *Int J Cancer*, 1986. **38**(6): p. 859-65.
443. Goldstein, B.D., et al., *Stimulation of human polymorphonuclear leukocyte superoxide anion radical production by tumor promoters*. *Cancer Lett*, 1981. **11**(3): p. 257-62.
444. Frenkel, K. and K. Chrzan, *Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes*. *Carcinogenesis*, 1987. **8**(3): p. 455-60.
445. Sirak, A.A., A.J. Beavis, and F.M. Robertson, *Enhanced hydroperoxide production by peripheral blood leukocytes following exposure of murine epidermis to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. *Carcinogenesis*, 1991. **12**(1): p. 91-5.
446. Weinberg, J.B. and M.A. Misukonis, *Phorbol diester-induced H₂O₂ production by peritoneal macrophages. Different H₂O₂ production by macrophages from normal and BCG-infected mice despite comparable phorbol diester receptors*. *Cell Immunol*, 1983. **80**(2): p. 405-15.
447. Johnston, P.A., D.O. Adams, and T.A. Hamilton, *Regulation of respiratory burst in murine peritoneal macrophages: differential sensitivity to phorbol diesters by macrophages in different states of functional activation*. *Cell Immunol*, 1986. **100**(2): p. 400-10.
448. Khan, S.H., I. Emerit, and J. Feingold, *Superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages of New Zealand black mice*. *Free Radic Biol Med*, 1990. **8**(4): p. 339-45.
449. Keisari, Y., E. Flescher, and I. Geva, *Macrophage oxidative burst and related cytotoxicity. I. Differential activation by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters*. *Int J Cancer*, 1984. **34**(6): p. 845-8.
450. Lewis, J.G. and D.O. Adams, *Enhanced release of hydrogen peroxide and metabolites of arachidonic acid by macrophages from SENCAR mice following stimulation with phorbol esters*. *Cancer Res*, 1986. **46**(11): p. 5696-700.
451. Apte, R.N. and Y. Keisari, *Differential stimulation of mononuclear phagocyte IL 1 production and oxidative burst by tumor-promoting and non-tumor-promoting agents*. *Immunobiology*, 1987. **175**(5): p. 470-81.
452. Lewis, J.G. and D.O. Adams, *Inflammation, oxidative DNA damage, and carcinogenesis. Environmental health perspectives*, 1987. **76**: p. 19-27.
453. Weiss, S.J., M.B. Lampert, and S.T. Test, *Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity*. *Science*, 1983. **222**(4624): p. 625-8.
454. Twerdok, L.E. and M.A. Trush, *Neutrophil-derived oxidants as mediators of chemical activation in bone marrow*. *Chem Biol Interact*, 1988. **65**(3): p. 261-73.
455. Shacter, E., et al., *DNA damage induced by phorbol ester-stimulated neutrophils is augmented by extracellular cofactors. Role of histidine and metals*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(12): p. 6693-9.
456. Lim, J.S., K. Frenkel, and W. Troll, *Tamoxifen suppresses tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation by human neutrophils*. *Cancer Res*, 1992. **52**(18): p. 4969-72.
457. Van Rensburg, C.E., et al., *Hypochlorous acid potentiates hydrogen peroxide-mediated DNA-strand breaks in human mononuclear leucocytes*. *Mutat Res*, 1992. **265**(2): p. 255-61.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

458. Jackson, J.H., et al., *Damage to the bases in DNA induced by stimulated human neutrophils*. The Journal of clinical investigation, 1989. **84**(5): p. 1644-1649.
459. Frenkel, K., et al., *Radiation-like modification of bases in DNA exposed to tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes*. Cancer Res, 1986. **46**(11): p. 5533-40.
460. Emerit, I. and P.A. Cerutti, *Tumour promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage via indirect action*. Nature, 1981. **293**(5828): p. 144-6.
461. Birnboim, H.C., *Factors which affect DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate*. Can J Physiol Pharmacol, 1982. **60**(11): p. 1359-66.
462. Birnboim, H.C., *DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate*. Science, 1982. **215**(4537): p. 1247-9.
463. Przybyszewski, J., H.C. Box, and M. Kulesz-Martin, *Induction of reactive oxygen species without 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA of initiated mouse keratinocytes treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Carcinogenesis, 1998. **19**(8): p. 1467-74.
464. Lewis, J.G. and D.O. Adams, *Induction of 5,6-ring-saturated thymine bases in NIH-3T3 cells by phorbol ester-stimulated macrophages: role of reactive oxygen intermediates*. Cancer Res, 1985. **45**(3): p. 1270-5.
465. Shacter, E., et al., *Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells*. Carcinogenesis, 1988. **9**(12): p. 2297-304.
466. Bhimani, R.S., et al., *Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents*. Cancer Res, 1993. **53**(19): p. 4528-33.
467. Takeuchi, T., M. Nakajima, and K. Morimoto, *Establishment of a human system that generates O₂⁻ and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter*. Cancer Res, 1994. **54**(22): p. 5837-40.
468. Perchellet, E.M., N.L. Abney, and J.P. Perchellet, *Stimulation of hydroperoxide generation in mouse skins treated with tumor-promoting or carcinogenic agents in vivo and in vitro*. Cancer Lett, 1988. **42**(3): p. 169-77.
469. Perchellet, E.M. and J.P. Perchellet, *Characterization of the hydroperoxide response observed in mouse skin treated with tumor promoters in vivo*. Cancer Res, 1989. **49**(22): p. 6193-201.
470. Perchellet, E.M., D. Jones, and J.P. Perchellet, *Ability of the Ca²⁺ ionophores A23187 and ionomycin to mimic some of the effects of the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on hydroperoxide production, ornithine decarboxylase activity, and DNA synthesis in mouse epidermis in vivo*. Cancer Res, 1990. **50**(18): p. 5806-12.
471. Robertson, F.M., et al., *Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Cancer Res, 1990. **50**(18): p. 6062-7.
472. Frenkel, K., et al., *Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo*. Anal Biochem, 1991. **196**(1): p. 126-36.
473. Wei, H. and K. Frenkel, *In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin*. Cancer Res, 1991. **51**(16): p. 4443-9.
474. Wei, H. and K. Frenkel, *Suppression of tumor promoter-induced oxidative events and DNA damage in vivo by sarcophytol A: a possible mechanism of antipromotion*. Cancer Res, 1992. **52**(8): p. 2298-303.
475. Wei, H. and K. Frenkel, *Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters*. Carcinogenesis, 1993. **14**(6): p. 1195-201.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

476. Wei, L., H. Wei, and K. Frenkel, *Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage*. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(5): p. 841-7.
477. Hartley, J.A., et al., *Association of DNA strand breaks with accelerated terminal differentiation in mouse epidermal cells exposed to tumor promoters*. *Cancer Res*, 1985. **45**(10): p. 4864-70.
478. Datta, R., et al., *Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase β -dependent and required for SAPK activation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(52): p. 41000-3.
479. Takeya, R., et al., *Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(27): p. 25234-46.
480. Sambrook J, F.E., Maniatis T, *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. **1**: p. 1:82-1:84.
481. Clazure, M., *FUNCIÓN DE LA INTERLEUQUINA-1 α EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUÍSTICA*. 2013.
482. Herfs, M., et al., *Proinflammatory cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for chronic obstructive pulmonary disease therapy*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. **47**(1): p. 67-79.
483. Duncia, J.V., et al., *MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products*. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998. **8**(20): p. 2839-44.
484. Burke, J.R., et al., *BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-kappa B-dependent transcription in mice*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(3): p. 1450-6.
485. Pérez Ortiz, J.M., et al., *Reduction of protein kinase A-mediated phosphorylation of ATXN1-S776 in Purkinje cells delays onset of Ataxia in a SCA1 mouse model*. *Neurobiology of disease*, 2018. **116**: p. 93-105.
486. Kim, S.Y., et al., *PKC inhibitors RO 31-8220 and Go 6983 enhance epinephrine-induced platelet aggregation in catecholamine hypo-responsive platelets by enhancing Akt phosphorylation*. *BMB Rep*, 2011. **44**(2): p. 140-5.
487. Lark, D.S., et al., *Protein Kinase A Governs Oxidative Phosphorylation Kinetics and Oxidant Emitting Potential at Complex I*. *Frontiers in physiology*, 2015. **6**: p. 332-332.
488. Kachintorn, U., et al., *Activation by calcium alone of chloride secretion in T84 epithelial cells*. *British journal of pharmacology*, 1993. **109**(2): p. 510-517.
489. Krapf, R., C.A. Berry, and A.S. Verkman, *Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator*. *Biophys J*, 1988. **53**(6): p. 955-62.
490. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
491. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
492. Bustin, S. and J. Huggett, *qPCR primer design revisited*. *Biomolecular detection and quantification*, 2017. **14**: p. 19-28.
493. Wang, W., K. Chen, and C. Xu, *DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument*. *Anal Biochem*, 2006. **356**(2): p. 303-5.
494. Jansen, R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. *Mol Microbiol*, 2002. **43**(6): p. 1565-75.
495. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(6): p. 467-77.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

496. Mojica, F.J., et al., *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. J Mol Evol, 2005. **60**(2): p. 174-82.
497. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. Nature, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
498. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
499. Karvelis, T., et al., *crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in Streptococcus thermophilus*. RNA biology, 2013. **10**(5): p. 841-851.
500. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
501. Nishimasu, H., et al., *Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9*. Cell, 2015. **162**(5): p. 1113-26.
502. Anders, C., et al., *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease*. Nature, 2014. **513**(7519): p. 569-73.
503. Jiang, F., et al., *STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition*. Science, 2015. **348**(6242): p. 1477-81.
504. Singh, D., et al., *Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12778.
505. Nishimasu, H., et al., *Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA*. Cell, 2014. **156**(5): p. 935-49.
506. Jiang, F., et al., *Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage*. Science, 2016. **351**(6275): p. 867-71.
507. Sternberg, S.H., et al., *Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9*. Nature, 2015. **527**(7576): p. 110-3.
508. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9*. Nature, 2014. **507**(7490): p. 62-67.
509. Szczelkun, M.D., et al., *Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(27): p. 9798-803.
510. Josephs, E.A., et al., *Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(18): p. 8924-41.
511. Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin, *Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(12): p. 8096-8106.
512. Rudin, N., E. Sugarman, and J.E. Haber, *Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**(3): p. 519-534.
513. Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin, *Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(13): p. 6064-6068.
514. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
515. Dow, L.E., *Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9*. Trends Mol Med, 2015. **21**(10): p. 609-621.
516. Kim, H. and J.S. Kim, *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(5): p. 321-34.
517. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

518. Mojica, F.J., et al., *Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 3): p. 733-40.
519. Sambrook, J. and D.W. Russell, *DNA transfection by electroporation*. *CSH Protoc*, 2006. **2006**(1).
520. Valdivieso, A.G., *Modulación de la expresión del gen Modulación de la expresión del gen MTND4 mitocondrial mediada por la MTND4 mitocondrial mediada por la actividad del CFTR* 2009.
521. Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J.Biol.Chem*, 1951. **193**: p. 265- 275.
522. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. *Methods Mol Biol*, 2010. **594**: p. 57-72.
523. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. *Chem Res Toxicol*, 1992. **5**(2): p. 227-31.
524. Smith, J.A. and M.J. Weidemann, *Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 1993. **162**(2): p. 261-8.
525. Kauffman, M.E., et al., *MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS*. *React Oxyg Species (Apex)*, 2016. **2**(5): p. 361-370.
526. Miranda-Rottmann, S., et al., *Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(26): p. 7542-7.
527. Dikalov, S.I. and D.G. Harrison, *Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(2): p. 372-82.
528. Navarro, A., et al., *Effects of rotenone and pyridaben on complex I electron transfer and on mitochondrial nitric oxide synthase functional activity*. *J Bioenerg Biomembr*, 2010. **42**(5): p. 405-12.
529. Vance, J.E. and R. Steenbergen, *Metabolism and functions of phosphatidylserine*. *Progress in lipid research*, 2005. **44**(4): p. 207-234.
530. Crowley, L.C., et al., *Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(11).
531. Cossarizza, A., et al., *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **197**(1): p. 40-5.
532. Li, J. and J. Yuan, *Caspases in apoptosis and beyond*. *Oncogene*, 2008. **27**(48): p. 6194-6206.
533. Muglia, C.I., et al., *Inflammation Controls Sensitivity of Human and Mouse Intestinal Epithelial Cells to Galectin-1*. *Journal of cellular physiology*, 2016. **231**(7): p. 1575-1585.
534. Yoshimori, A., et al., *Structural and functional definition of the specificity of a novel caspase-3 inhibitor, Ac-DNLD-CHO*. *BMC pharmacology*, 2007. **7**: p. 8-8.
535. Garcia-Calvo, M., et al., *Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32608-13.
536. Smith, G.K., et al., *Expression, preparation, and high-throughput screening of caspase-8: discovery of redox-based and steroid diacid inhibition*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **399**(2): p. 195-205.
537. Trapnell, B.C., et al., *Down-regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(16): p. 10319-23.
538. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. *Molecular aspects of medicine*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

539. Jumarie, C. and C. Malo, *Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro*. Journal of cellular physiology, 1991. **149**(1): p. 24-33.
540. Niedel, J.E., L.J. Kuhn, and G.R. Vandenberg, *Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(1): p. 36-40.
541. Wang, H., et al., *cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia*. Frontiers in molecular neuroscience, 2018. **11**: p. 255-255.
542. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 599-609.
543. Griner, E.M. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 281-94.
544. Guerra, B. and O.-G. Issinger, *Natural Compounds and Derivatives as Ser/Thr Protein Kinase Modulators and Inhibitors*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2019. **12**(1): p. 4.
545. Ferlin, A., et al., *Profiling Insulin Like Factor 3 (INSL3) Signaling in Human Osteoblasts*. PloS one, 2011. **6**: p. e29733.
546. Beei, C., et al., *Activation of EGFR/MEK/ERK/AP-1 signaling mediated by 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary A549 cells*. J Toxicol Sci, 2013. **38**(5): p. 793-7.
547. Kawakami, Y., et al., *Multiple signaling pathways for the activation of JNK in mast cells: involvement of Bruton's tyrosine kinase, protein kinase C, and JNK kinases, SEK1 and MKK7*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1795-802.
548. Lopez-Bergami, P., et al., *Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma*. Cancer cell, 2007. **11**(5): p. 447-460.
549. Fuchs, S.Y., et al., *MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(18): p. 10541-10546.
550. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. J Mol Med (Berl), 1996. **74**(10): p. 589-607.
551. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(24): p. 13681-13686.
552. Peloponese, J.M., Jr. and K.T. Jeang, *Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8927-38.
553. Jeong, S.J., et al., *Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells*. Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6719-28.
554. Simon, C., et al., *The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation*. Exp Cell Res, 2001. **271**(2): p. 344-55.
555. Sanchez-Prieto, R., et al., *A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2464-72.
556. Ambrosino, C. and A.R. Nebreda, *Cell cycle regulation by p38 MAP kinases*. Biol Cell, 2001. **93**(1-2): p. 47-51.
557. Chen, S., Y. Qiong, and D.G. Gardner, *A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation*. Hypertension, 2006. **47**(2): p. 252-8.
558. Tan, Y., et al., *FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2*. Embo j, 1996. **15**(17): p. 4629-42.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

559. Zhong, H., et al., *The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism*. Cell, 1997. **89**(3): p. 413-24.
560. Kim, L., et al., *p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2005. **174**(7): p. 4178-4184.
561. Ashwell, J.D., *The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system*. Nature reviews. Immunology, 2006. **6**(7): p. 532-540.
562. Christian, F., E.L. Smith, and R.J. Carmody, *The Regulation of NF-kB Subunits by Phosphorylation*. Cells, 2016. **5**(1): p. 12.
563. Hu, Y., et al., *Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase*. Science, 1999. **284**(5412): p. 316-20.
564. Li, Z.W., et al., *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
565. Mercurio, F., et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science (New York, N.Y.), 1997. **278**(5339): p. 860-866.
566. Zandi, E., Y. Chen, and M. Karin, *Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1360-3.
567. Yang, J., et al., *BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 950-960.
568. Tiwari, R.L., et al., *IL-1R-associated kinase-1 mediates protein kinase Cdelta-induced IL-1beta production in monocytes*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2632-45.
569. Webster, M.K., et al., *Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(4): p. 2031-2040.
570. Chae, Y.-C., et al., *Ubiquitin-specific peptidase 3 induces TPA-mediated leukemia cell differentiation via regulating H2AK119ub*. Animal cells and systems, 2019. **23**(5): p. 311-317.
571. Zhang, Y.L., et al., *Increased intracellular Cl(-) concentration promotes ongoing inflammation in airway epithelium*. Mucosal Immunol, 2018. **11**(4): p. 1149-1157.
572. Valdivieso, A.G. and T.A. Santa-Coloma, *The chloride anion as a signalling effector*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019. **94**(5): p. 1839-1856.
573. DeLeo, F.R. and M.T. Quinn, *Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(6): p. 677-91.
574. Yang, D., et al., *Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells*. Exp Eye Res, 2007. **85**(4): p. 462-72.
575. Mehta, S.L. and P.A. Li, *Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(6): p. 1069-78.
576. O'Brien, M.C. and W.E. Bolton, *Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry*. Cytometry, 1995. **19**(3): p. 243-55.
577. Falzone, N., C. Huyser, and D.R. Franken, *Comparison between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assessment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome*. Andrologia, 2010. **42**(1): p. 20-6.
578. Perry, S.W., et al., *Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide*. BioTechniques, 2011. **50**(2): p. 98-115.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

579. Gabelloni, M.L., et al., *NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3324-35.
580. Arifa, R.D., et al., *Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice*. Am J Pathol, 2014. **184**(7): p. 2023-34.
581. Bazzi, M.D. and G.L. Nelsestuen, *Differences in the effects of phorbol esters and diacylglycerols on protein kinase C*. Biochemistry, 1989. **28**(24): p. 9317-23.
582. Mosior, M. and A.C. Newton, *Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids*. Biochemistry, 1996. **35**(5): p. 1612-23.
583. Codazzi, F., M.N. Teruel, and T. Meyer, *Control of astrocyte Ca(2+) oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C*. Curr Biol, 2001. **11**(14): p. 1089-97.
584. Koivunen, J., V. Aaltonen, and J. Peltonen, *Protein kinase C (PKC) family in cancer progression*. Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 1-10.
585. Zhang, G., et al., *Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester*. Cell, 1995. **81**(6): p. 917-24.
586. Dries, D.R. and A.C. Newton, *Kinetic analysis of the interaction of the C1 domain of protein kinase C with lipid membranes by stopped-flow spectroscopy*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7885-93.
587. Slater, S.J., et al., *Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C. Differences in effects of 1-alkanol inhibition, activation by phosphatidylethanolamine and calcium chelation*. J Biol Chem, 1994. **269**(25): p. 17160-5.
588. Newton, A.C., *Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2353-64.
589. Chow, J.Y.C., et al., *TGF-beta mediates PTEN suppression and cell motility through calcium-dependent PKC-alpha activation in pancreatic cancer cells*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2008. **294**(4): p. G899-G905.
590. Ueda, Y., et al., *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23512-9.
591. Hallenborg, P., et al., *Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation*. Cell Death Differ, 2012. **19**(8): p. 1381-9.
592. Ravnskjaer, K., et al., *Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression*. The EMBO journal, 2007. **26**(12): p. 2880-2889.
593. Pulverer, B.J., et al., *Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 670-4.
594. Smeal, T., et al., *Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73*. Nature, 1991. **354**(6353): p. 494-6.
595. Adler, V., et al., *Conformation-dependent phosphorylation of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1686-91.
596. Fuchs, S.Y., V.A. Fried, and Z. Ronai, *Stress-activated kinases regulate protein stability*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1483-90.
597. Fuchs, S.Y., et al., *JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells*. Genes & development, 1998. **12**(17): p. 2658-2663.
598. Robbins, D., et al., *Involvement of PTEN in TPA-mediated p53-activation in mouse skin epidermal JB6 cells*. FEBS Lett, 2012. **586**(23): p. 4108-13.
599. Karin, M. and M. Delhase, *JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action?* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(16): p. 9067-9069.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

600. Gazon, H., et al., *Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. **8**(2686).
601. Cafferata, E.G., et al., *NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 15441-4.
602. Lee, C.T., et al., *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the MAPK/ERK signaling pathway that mediates memory formation in rats*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(5): p. 1311-20.
603. Stein, J., et al., *Role of Protein Kinase C and Nox2-Derived Reactive Oxygen Species Formation in the Activation and Maturation of Dendritic Cells by Phorbol Ester and Lipopolysaccharide*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. **2017**: p. 4157213-4157213.
604. Kinnula, V.L., et al., *Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(6 Pt 1): p. L708-12.
605. Fürstenberger, G., et al., *Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981. **78**(12): p. 7722-7726.
606. Kumari, S., et al., *Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival*. *Biomarker insights*, 2018. **13**: p. 1177271918755391-1177271918755391.
607. Park, G.B., et al., *ROS-mediated JNK/p38-MAPK activation regulates Bax translocation in Sorafenib-induced apoptosis of EBV-transformed B cells*. *Int J Oncol*, 2014. **44**(3): p. 977-85.
608. Pan, J., et al., *Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells*. *Chemical research in toxicology*, 2010. **23**(3): p. 568-577.
609. Wu, W.S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(4): p. 695-705.
610. Isnaini, I., et al., *Oxidants-Antioxidants Profile in the Breast Cancer Cell Line MCF-7*. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 2018. **19**(11): p. 3175-3178.
611. Klaunig, J.E., et al., *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*. *Environmental health perspectives*, 1998. **106 Suppl 1**(Suppl 1): p. 289-295.
612. Emerit, I., *Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 1994. **16**(1): p. 99-109.
613. Maulik, N., *Redox signaling of angiogenesis*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(5): p. 805-15.
614. Xue, D.F., et al., *ROS enhances the cytotoxicity of cisplatin by inducing apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020. **122**: p. 105732.
615. DeLeo, F.R., et al., *NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis*. *J Immunol*, 1999. **163**(12): p. 6732-40.
616. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
617. Bokoch, G.M. and B.A. Diebold, *Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase*. *Blood*, 2002. **100**(8): p. 2692-6.
618. Kuwano, Y., et al., *Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(2): p. C433-43.
619. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **76**: p. 208-26.
620. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. *Biochemistry (Mosc)*, 2005. **70**(2): p. 200-14.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

621. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function*. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism, 2012. **26**(6): p. 711-723.
622. Wegrzyn, J., et al., *Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration*. Science, 2009. **323**(5915): p. 793-7.
623. Gough, D.J., et al., *Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5935): p. 1713-1716.
624. Handy, D.E. and J. Loscalzo, *Redox regulation of mitochondrial function*. Antioxidants & redox signaling, 2012. **16**(11): p. 1323-1367.
625. Lee, H., A.J. Jeong, and S.K. Ye, *Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy*. BMB Rep, 2019. **52**(7): p. 415-423.
626. Macias, E., et al., *Stat3 Binds to mtDNA and Regulates Mitochondrial Gene Expression in Keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology, 2014. **134**(7): p. 1971-1980.
627. Zhu, T., T. Tsuji, and C. Chen, *Roles of PKC isoforms in the induction of apoptosis elicited by aberrant Ras*. Oncogene, 2010. **29**(7): p. 1050-1061.
628. Insel, P.A., et al., *Cyclic AMP/PKA-promoted apoptosis: insights from studies of S49 lymphoma cells*. Horm Metab Res, 2014. **46**(12): p. 854-62.
629. Meng, J., et al., *Apoptosis induction by MEK inhibition in human lung cancer cells is mediated by Bim*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e13026.
630. Bai, J.A., et al., *SGK1 inhibits cellular apoptosis and promotes proliferation via the MEK/ERK/p53 pathway in colitis*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(20): p. 6180-93.
631. Liu, W., et al., *SGK1 inhibition induces autophagy-dependent apoptosis via the mTOR-Foxo3a pathway*. Br J Cancer, 2017. **117**(8): p. 1139-1153.
632. Pastore, D., et al., *SGK-1 protects kidney cells against apoptosis induced by ceramide and TNF- α* . Cell Death Dis, 2015. **6**(9): p. e1890.
633. Aoyama, T., et al., *Serum and glucocorticoid-responsive kinase-1 regulates cardiomyocyte survival and hypertrophic response*. Circulation, 2005. **111**(13): p. 1652-9.
634. Zhou, H., et al., *Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 483-94.
635. Redza-Dutordoir, M. and D.A. Averill-Bates, *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(12): p. 2977-2992.
636. Mager, L.F., et al., *Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer*. Frontiers in oncology, 2016. **6**: p. 96-96.
637. Elaraj, D.M., et al., *The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1088-96.
638. Stadnyk, A.W., *Cytokine production by epithelial cells*. Faseb j, 1994. **8**(13): p. 1041-7.
639. Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay, *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 20-38.
640. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-49.
641. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-899.
642. Guo, B., et al., *Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 36107-36107.
643. Shen, J., et al., *IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells*. Scientific reports, 2017. **7**: p. 41067-41067.
644. Xu, X., et al., *Evaluation of the anti-inflammatory properties of telmesteine on inflammation-associated skin diseases*. RSC Advances, 2017. **7**(55): p. 34699-34704.

ANEXOS

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-AFC	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina
Ac-DEVD-CHO	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído
Ac-LEHD-AFC	N-Acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina
Ac-IETD-AFC	N-Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina
Ac-IETD-CHO	N-Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-aldehído
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AKT/PKB	proteína quinasa B
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AMPK	“AMP activated protein kinase”
ANK	anakinra
AP-1	proteína activadora-1
ARNg	ácido ribonucleico guía
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-aminofenoxi) -etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético tetra-(acetoximetil) ester
Cas9	caspasa 9
CCCP	carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
CFTR	gen “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
CFTR	“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
CRE	“cAMP response elements”
CREB	“cAMP regulatory element-binding protein”
CRISPR	“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”
Ctl	control
DAG	diacilglicerol
DCF	compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DD	“differential display”
DMEM	medio de cultivo “Dulbecco Minimun Essential Medium”
DMSO	dimetil sulfóxido
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FCCP	carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato
FQ	fibrosis quística
GPRC5A	receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro A

HUGO	“Human Genome Organization”
ID	“Order license ID”
IFMR	intensidad de fluorescencia media relativa
IKK	quinasa I κ B
IL-1β	interleuquina 1 β o interleucina 1 β
IL-1RA	antagonista del receptor de IL-1
JNK	quinasas Jun N-terminal
LPS	lipopolisacárido bacteriano
MAPK	“mitogen-activated protein kinase”
MAX	“myc-associated factor X”
MEK/MAP2K1/2	“mitogen-activated protein kinase kinase”
MYC	“myelocytomatosis”
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NB	“Northern Blot”
NF-κB	factor de transcripción nuclear- κ B
PBS	“phosphate-buffered saline”
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEIG-1	“phorbol ester induced gene 1”
Pi	fósforo inorgánico
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
RAIG-1	“retinoic acid induced gene 1”
ROS	“reactive oxygen species”
RT-PCR	“reverse transcription - polimerase chain reaction”
SE	“Standard Error”
SFB	suero fetal bovino
SGK1	“Serine/threonine-protein kinase”
TBS	“Tris-buffered saline”
TGF-β	“Transforming growth factor β 1”
TMRE	tetrametilrodamina metil ester
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TPA/PMA	12 - O -tetradecanoilforbol-13-acetato
UA	unidades arbitrarias
7-AAD	7-aminoactinomycin D

AUTORIZACIONES

- Figura 2 (ID:1069594-1; 12-10-2020)
- Figura 4 (ID:1022603-1; 11-03-2020)
- Figura 5 (ID:1022605-1; 11-03-2020)
- Figura 6 (ID:1022605-1; 11-03-2020)
- Figura 7 (acceso abierto)
- Figura 8 (acceso abierto)
- Figura 9 (acceso abierto)
- Figura 10 (ID:1046872-1; 07-07-2020)
- Figura 15 (ID:1046870-1; 07-07-2020)
- Figura 17 (ID:1027188-2; 07-07-2020)
- Figura 18 (ID:1022614-1; 11-03-2020)
- Figura 19 (ID:1022615-1; 11-03-2020)
- Figura 20 (ID:1046873-1; 07-07-2020 / 1027188-1; 07-07-2020)
- Tabla 2: (acceso abierto)

ID: "Order license ID"