



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La activación del receptor sensor de calcio atenúa
la vía de señalización del TGF-Beta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ONASIS VICENTE FERMÍN



TUTORA: DRA. GUADALUPE REYES CRUZ

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Reyes Cruz. Durante el desarrollo del mismo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) como asistente de proyecto IdAP 10618 dentro del proyecto P45957Q.

A papá, a mamá, a mi hermano,
a Epifania Martínez Martínez,
a Sócrates Vicente Martínez †,
a Facundo Martínez Vargas †,

con la más absoluta y sincera devoción.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis lo dedico de manera muy especial a las tres personas más importantes para mí las cuales han estado detrás de todo lo que he hecho en mi vida. Al *Sr. Aquiles Vicente Martínez*, mi padre. Estoy agradecido contigo por ser la persona más importante que me ha ayudado de muchas formas a alcanzar los objetivos que me he planteado. Quiero decir además que para mí eres el ejemplo más grande de sencillez, diligencia, fidelidad y responsabilidad. Tengo la fortuna de tener en casa un ejemplo de esta magnitud. A la *Sra. Herlinda Fermín Simón*, mi madre. Gracias por esos nueve meses en los que tu vientre fue para mí una cuna. Casi toda mi esencia moral te la debo a ti. Desde hace muchos años te convertiste en la principal fuerza motriz que me ha permitido enfrentarlo todo, aguantarlo todo, salir prácticamente solo en la vida, volverme responsable de mí mismo desde muy corta edad. En tu ausencia he experimentado más de una vez lo que es andar errante y solo, como un leñador sin bosque. A *Sócrates Vicente Fermín*, mi hermano. Sin duda los duros golpes que la vida me ha dado los he sobrellevado mucho más fácil gracias a tu compañía. Prácticamente lo hemos vivido todo juntos. Eres el único testigo al que le consta todo lo que he pasado para que llegara este momento. Podría decir muchas cosas pero para qué, lo sabes todo sobre mí.

A la *Sra. Epifania Martínez Martínez*, mi abuela paterna. Además de ser mi abuela es usted mi segunda madre. Con el paso de los años he comprendido que este trabajo es un eslabón de una cadena que usted empezó hace muchos años. Quién iba a decir que sus decisiones pasadas iban a beneficiar a uno de sus nietos casi 50 años después.

Al *Sr. Sócrates Vicente Martínez†*, mi tío. Usted fue un padre para sus cuatro hermanos, incluyendo a mi propio padre. Para mí usted también es una inspiración porque aunque no lo conocí físicamente sí conozco parte de su legado, mismo que no ha llegado a mí por sí sólo, yo lo he buscado. Es para mí un orgullo tener como familiar a alguien como usted.

A la familia Martínez Sánchez. Estoy muy agradecido con el *Sr. Facundo Martínez Vargas†*, *Sra. Herminia Sánchez Reyes*, *Sandra Martínez Sánchez*, *Julio Martínez Sánchez*, *Armando Martínez Sánchez* y *Nadia Jenny Martínez Sánchez*, todos mis tíos. Les agradezco el que nos hayan abierto las puertas de su casa a mi hermano y a mí y que nos hayan considerado dos miembros más de la familia. Quiero expresar de manera especial mi agradecimiento y admiración por el *Sr. Facundo Martínez Vargas†*, quien es una de las personas a las que nunca voy a olvidar. Quienes lo conocimos sabemos lo que su nombre significa. Me parece que usted además de ser una gran personalidad es una verdadera institución por la que han pasado cientos de personas dentro de las cuales me incluyo, lo cual es un orgullo para mí. Usted está vivo en la mente y corazón de todos nosotros.

A ustedes dedico el presente trabajo,
con la más absoluta y sincera devoción.

Onasis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el honor de formar parte de esta máxima casa de estudios donde estoy consagrando uno de los sueños más grandes tanto personal como familiar. Ingresar y egresar de la UNAM ha sido hasta el momento la prueba más difícil, y sin embargo la satisfacción más grande que he tenido como persona; es mi sueño americano. He pagado un alto precio por mi 403079184, número indeleble en mi mente. Agradezco sobremanera a mi muy querida Facultad de Ciencias, sitio que me acogió por más de cinco años, que me dio grandes maestros y, por si fuera poco, grandes amigos también. Durante mi estancia en la Facultad de Ciencias procuré tomar lo mejor que en ella hay, por tanto, a continuación mencionaré a algunos maestros a quienes agradezco el conocimiento y experiencia que en mí depositaron. Agradezco a Ana María Velasco Velasco (Biología de Procariontes), Vladimir Alberto Cachón Guillén (Historia y Filosofía de la Biología), Aída Nelly García Arguez (Química I), Laura del Carmen Vargas Parada (Biología Molecular de la Célula I), Ana Lidia Pérez Castorena (Química Orgánica), Amira Arciniegas Arciniegas (Química Orgánica), Álvaro Chaos Cador (Sistemática I y Evolución), Jesús Serrano Lomelí (Bioestadística), Aurora Zlotnik Espinosa (Biología de Plantas I), Sara Frías Vázquez (Biología Molecular de la Célula III), Ana Lilian Martín Del Pozo (Ciencias de la Tierra), Sigfrido Sierra Galván (Biología de Hongos), Nelly Diego Pérez (Biología de Plantas II), Miguel Ángel Meneses Pérez (Genética I), Víctor Manuel Valdés López (Biología Molecular) y Marina Macías Silva (Biología Celular). Siempre tuve la certeza de que para ser un buen biólogo habría que tomar clase con los mejores maestros, no me equivoqué. A ustedes les debo mi formación como profesionista. No los defraudaré.

Este espacio lo dedico a mis más grandes amigos y compañeros de trabajo, ambos importantes en este recuento de lo andado. A toda la familia Flores Meléndez por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como un miembro más de la familia. Hoy por hoy me considero un Flores Meléndez. A María Concepción Flores Meléndez, Magali Iraís Lara Sedeño, Arturo Pérez De la Cruz, Oscar García González, Janet García Pillado, Aurora Esther Camacho Bocanegra, Christian Cariño Cerón Martínez, Azalea Guadalupe Acosta Carreón, Juana Patricia Hernández Pérez, Jorge Arturo Castillo Arellano, Adriana Martínez Jurado, Adrián Manuel Martínez Rojas, Marina Ruíz Boites, Juan Pablo Yáñez García, Miguel Kou Silva Zusuki, Liliana del Carmen Valdés Arenas, Emmanuel Zeno Lira, Gabriela García Jiménez, Claudia Mireya Chilón González, Rosbi Darany Ruíz Interiano, Rafael Alejandro León Flores, Jesús Alonso Muñoz Escobar, Gabriela Gordillo Gallegos, Luís Ángel Rizo Toledo, José Alberto Ruíz Barrera, Martín Alejandro Zúñiga Aguilar, Prisma Ruíz Aguilar, Luz Palestina Llamas Guzmán, Citlalli Fuentes Granados, Gabriela Zárraga Granados, Anet Rivera Osorio, Arturo Mendoza Martínez, Érika Iris Puente Guzmán, Andrea Campuzano Chávez-Peón, Abril Vázquez De los Reyes, Abril Angélica Escamilla Ayala, Mónica Díaz Coranguéz, María Evangelina Ávila Muñoz, Gabriela Morales Luque, Carlos Alberto Río Zamorano, Carlos Mauricio Belman Ramos, Martha Xóchitl Segura Guzmán, Marycarmen Jiménez De Loera, Roxana Bautista Arredondo, Rosa María Del Carmen Gómez Pérez, Raúl Gómez Porras y Miguel Ángel Cruz Espíndola. Estoy agradecido con cada uno de ustedes por su amistad o por ser grandes compañeros de trabajo (o ambas cosas). Ha sido un placer haber coincidido en tiempo y espacio. Ante la enorme cantidad de personas que de una u otra manera se me han fijado en

la mente estoy seguro que omití sin querer a más de uno, espero merecer su absolución.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Muchas gracias por sus enseñanzas, por la confianza que depositó en mí y por su gran compromiso con este trabajo. Me esmeré por corresponder con lo mejor, y de hecho lo único que tengo, mi fuerza laboral. A la Biol. Margarita Valadez Sánchez por el apoyo técnico brindado al presente proyecto. Muchas gracias por enseñarme a trabajar “como Dios manda” y por tu amistad y paciencia para conmigo. Agradezco también a todos los estudiantes del laboratorio que de muchas maneras me apoyaron. Gracias a Alma Patricia Reyes Ibarra, Ismael Bracho Valdés, Alejandro García Regalado, Iliana Ramírez Rangel, Evelyn Robles Molina, Liseth Aldaba Muruato, Alicia Toledo González, Diana Yuridia Organista Juárez, Marco Antonio Hernández Bedolla, Mario Ortega Olvera e Israel Valencia Martínez. Muchas gracias además a Omar Hernández García y Jaime Estrada Trejo por el apoyo técnico brindado durante la realización de la presente tesis, sin ustedes no sé qué sería de todos los estudiantes en el laboratorio.

Estoy muy agradecido con la Dra. Marina Macías Silva por ser una de las personas más importantes en mi formación en esta apasionante área de la ciencia que es la Transducción de Señales. Muchas gracias además por la confianza que depositó en mí y por el apoyo incondicional que le dio a este trabajo; me esforcé por no defraudarla. Agradezco de manera especial a la Biol. Marcela Sosa Garrocho por el apoyo técnico brindado para el desarrollo del presente proyecto. Para mí eres una verdadera “Ada madrina” en el sentido más amplio de la palabra. Gracias a todos los estudiantes del laboratorio 225N, sin ninguna excepción, y especialmente a Marco Antonio Briones Orta y Ángeles Concepción Tecalco Cruz por todo el apoyo y orientación que me dieron durante la realización de mi tesis, estoy muy agradecido con ustedes. También agradezco al médico Valentín Mendoza Rodríguez por el apoyo técnico brindado durante la realización de la primera etapa de este trabajo. Con tu ayuda y amistad fue mucho más fácil cumplir con el primer objetivo planteado y estoy muy agradecido por eso.

Agradezco de manera especial a mis sinodales. A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, Dra. Marina Macías Silva, Dra. Laura Kawasaki Watanabe, Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y Dr. Alfonso José Vilchis Peluyera. Muchas gracias por la revisión de mi tesis y, por supuesto, por sus comentarios que contribuyeron a afinar y corregir el trabajo escrito.

Finalmente quiero agradecer al Dr. José Vázquez Prado por mantener las puertas abiertas de su laboratorio para conmigo. Muchas gracias por todo el apoyo que me brindó. Estoy convencido de que usted también está detrás del desarrollo y éxito del presente trabajo. Agradezco a Estanislao Escobar Islas, Oscar Casas Mejía y David Pérez Rangel por el apoyo técnico que me brindaron durante la realización de mi tesis de licenciatura así como a todos los estudiantes del laboratorio 35 de la sección externa de farmacología.

A todos ustedes muchas gracias y un saludo.
Ah! y un beso a mi madre, uno por mejilla.
México, D.F., en mi habitación, fin de año.

Onasis

*“A quienes están en las dos orillas,
porque ninguna bandera, ninguna frontera
puede más que la familia.”*

FOTO DE FAMILIA

**Autor: Carlos Varela
Álbum: Como los peces**



Detrás de todos estos años,
detrás del miedo y el dolor,
vivimos añorando algo,
algo que nunca más volvió.

Detrás de los que no se fueron,
detrás de los que ya no están,
hay una foto de familia
donde lloramos al final.

Tratando de mirar
por el ojo de una aguja.
Tratando de vivir
dentro de una misma burbuja.
Solos.

Detrás de toda la nostalgia,
de la mentira y la traición,
detrás de toda la distancia,
detrás de la separación.

Detrás de todos los gobiernos,
de las fronteras y la religión,
hay una foto de familia,
hay una foto de los dos.

Tratando de mirar
por el ojo de una aguja.
Tratando de vivir
dentro de una misma burbuja.
Solos.

Detrás de todos estos años,
detrás del miedo y el dolor,
vivimos añorando algo
y descubrimos con desilusión,
que no sirvió de nada.
De nada
“o casi nada
que no es lo mismo...
pero es igual.”

“La ciencia es una estrategia, es una forma de atar la verdad, es algo más que materia
pues el misterio se oculta detrás.”
LUIS EDUARDO AUTE, *De paso.*

“Hay hombres que luchan un día
y son buenos.
Hay otros que luchan un año
y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida,
esos son los imprescindibles!”
**BERTOLT BRECHT, En *Sueño con serpientes*
de Silvio Rodríguez.**

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Importancia del calcio en el cuerpo humano y su homeostasis.....	2
2.2 Receptores acoplados a proteínas G.....	4
2.3 El receptor sensor de calcio extracelular (CaR).....	5
2.3.1 Estructura del CaR.....	6
a) Dominio de atrapamoscas (VFT).....	6
b) Dominio rico en cisteínas.....	7
c) Los 7TMD y el dominio intracelular.....	7
d) Unión del agonista.....	7
e) Dimerización del VFT.....	8
2.4 Vías de señalización activadas por el CaR.....	10
2.5 Mutaciones activantes e inactivantes del CaR y su relevancia fisiológica y patológica.....	11
2.5.1 Mutaciones inactivantes en FHH y NSPHT.....	12
2.5.2 Mutaciones activantes en ADH.....	14
2.6 Mecanismo de señalización del TGF- β	15
2.6.1 Mecanismo de activación del receptor para TGF- β	16
2.6.2 Regulación de la activación del receptor para TGF- β	18
2.6.3 Características de las proteínas Smad.....	19
2.6.4 Regulación del acceso de las R-Smad al receptor activado...	21
2.6.5 Señalización de las proteínas Smad.....	21
2.6.6 Términación de la señalización de las Smad.....	24
2.7 Importancia de la comunicación cruzada entre la vía de señalización del TGF- β y la del CaR.....	25
III. ANTECEDENTES	27
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Cultivo de células HEK293.....	33
6.2 Transfección.....	33
6.3 Ensayo de la actividad de la luciferasa.....	35
6.4 Detección de Smad2 fosforilada por Western Blot.....	36
6.5 RT-PCR del gen <i>smad7</i>	38
6.6 Análisis de resultados.....	40
VII. RESULTADOS	41
7.1 La activación del CaR disminuye la actividad transcripcional de la vía de señalización del TGF- β	41
7.2 La activación del CaR disminuye la fosforilación de las proteínas Smad2.....	46

7.3 La activación del CaR no afecta la expresión del gen <i>smad7</i>	49
VIII. DISCUSIÓN	51
IX. CONCLUSIONES	58
X. PERSPECTIVAS	59
XI. ANEXOS	61
XII. BIBLIOGRAFÍA	65

FIGURAS

	Página
1. Homeostasis del calcio extracelular.....	3
2. Clasificación de la superfamilia de GPCRs.....	5
3. Estructura del CaR.....	9
4. Vías de señalización activadas por el CaR.....	11
5. Mutaciones activantes e inactivantes del CaR.....	13
6. Representación esquemática de los receptores para TGF- β	17
7. Esquema representativo de las principales estructuras de las proteínas Smads.....	20
8. Mecanismo general de activación del receptor para TGF- β y de las proteínas Smads.....	22
9. Células HEK293.....	33
10. Efecto de la activación del CaR WT en la actividad transcripcional de la vía del TGF- β	42
11. Efecto de la activación de la L125P en la actividad transcripcional de la vía del TGF- β	43
12. Efecto de la presencia de la E297K en la actividad transcripcional de la vía del TGF- β	44
13. Comparación del efecto sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β promovido por el CaR WT y las mutantes L125P y la E297K.....	45
14. Efecto de la activación del CaR WT en la fosforilación de Smad2.....	47
15. Efecto de la presencia de la E297K en la fosforilación de Smad2.....	48
16. Efecto de la activación del CaR WT en la expresión del gen <i>smad7</i> ...	50
17. Representación esquemática del posible mecanismo de atenuación de la vía de señalización del TGF- β por activación del CaR en células de la glándula paratiroides.....	57

TABLAS

	Página
1. Vectores utilizados para los ensayos de la actividad de la luciferasa.....	34
2. Lista de anticuerpos primarios y secundarios para la detección por Western Blot de Smad2 fosforilada.....	37
3. Componentes para la síntesis de cDNA de los genes <i>β-galactosidasa</i> y <i>smad7</i>	39
4. Componentes para la amplificación de los cDNA de los genes <i>β-galactosidasa</i> y <i>smad7</i>	40

ABREVIATURAS

7TMD	Siete dominios transmembranales (del inglés <i>7-Transmembranal domain</i>)
ADH	Hipocalcemia dominante autosómica (del inglés <i>Autosomal dominant hypocalcemic</i>)
APMc	Adenosina monofosfato cíclico (del inglés <i>Adenosine monophosphate cyclic</i>)
BMP	Proteína morfogénica de hueso (del inglés <i>Bone morphogenetic protein</i>)
CaR	Receptor sensor de calcio extracelular (del inglés <i>Calcium-sensing receptor</i>)
ECD	Dominio extracelular (del inglés <i>Extracellular domain</i>)
ECF	Fluido extracelular (del inglés <i>Extracellular fluid</i>)
FHH	Hipercalcemia hipocalciuria familiar (del inglés <i>Familial hypocalciuric hypercalcemia</i>)
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G (del inglés <i>G protein-coupled receptor</i>)
MAPK	Cinasa de proteínas activadas por mitógenos (del inglés <i>Mitogen activated protein kinase</i>)
NLS	Dominio de localización nuclear (del inglés <i>Nuclear localization sequences</i>)
NSHPT	Hiperparatiroidismo neonatal severo (del inglés <i>Neonatal severe hyperparathyroidism</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A (del inglés <i>Protein kinase A</i>)
PKC	Proteína cinasa C (del inglés <i>Protein kinase C</i>)
PLCβ	Fosfolipasa-C β (del inglés <i>Phospholipase-C β</i>)
PTH	Hormona paratiroidea (del inglés <i>Parathyroid hormone</i>)

SBE	Elemento de unión a Smad (del inglés <i>Smad binding element</i>)
SMA	Proteínas específicas de músculo liso (del inglés <i>Smooth muscle actin</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β (del inglés <i>Transforming growth factor β</i>)
VFT	Dominio de atrapamoscas (del inglés <i>Venus fly trap structure</i>)

Palabras clave: CaR, TGF- β , comunicación cruzada, atenuación.

I. RESUMEN

El receptor sensor de calcio extracelular (CaR, por sus siglas en inglés, Calcium-sensing Receptor) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés, G Protein-Coupled Receptor) responsable de mantener los niveles normales de calcio extracelular, lo cual es de suma importancia para la mineralización de hueso, despolarización nerviosa, contracción muscular, coagulación sanguínea, entre otros procesos. La importancia fisiológica del CaR es incuestionable ante el hallazgo de enfermedades como la hipercalcemia hipocalciuria familiar (FHH, por sus siglas en inglés, Familial Hypocalciuric Hypercalcemia) y el hiperparatiroidismo neonatal severo (NSHPT, por sus siglas en inglés, Neonatal Severe Hyperparathyroidism), así como la hipercalcemia dominante autosómica (ADH, por sus siglas en inglés, Autosomal Dominant Hypocalcemic), causadas por mutaciones inactivantes y activantes del CaR, respectivamente. Mutaciones inactivantes del CaR causan una alteración radical en la inhibición de la secreción de la hormona paratiroidea (PTH, por sus siglas en inglés, Parathyroid Hormone) y en la estimulación de la excreción de calcio urinario, conduciendo a patologías como hipercalcemia e hipocalciuria. La expresión y actividad del CaR es una determinante importante de la función celular de la paratiroides, y su regulación anormal es importante para el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β , por sus siglas en inglés, Transforming Growth Factor- β) se expresa en la glándula paratiroides, predominantemente en las células endocrinas, y éste regula negativamente la proliferación celular y la producción de la PTH en estas células. La importancia de la comunicación cruzada entre las vías de señalización del CaR y la del TGF- β radica en que dado que ambos receptores se expresan en la glándula paratiroides y además, ambos regulan negativamente la proliferación celular y la secreción de la PTH; la atenuación de la señalización de un receptor por efecto de la activación del otro podría causar la proliferación inadecuada de las células de la paratiroides y, probablemente, contribuir al desarrollo de procesos tumorigénicos en esta glándula. En el presente trabajo demostramos que la activación del CaR regula negativamente la fosforilación de las proteínas Smad2 así como la actividad transcripcional de la vía del TGF- β , lo cual puede ser el inicio de una investigación que conduzca a encontrar posibles blancos terapéuticos que contrarresten el desarrollo de procesos tumorigénicos en la glándula paratiroides.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia del calcio en el cuerpo humano y su homeostasis

El calcio (Ca^{2+}) es un ión divalente esencial para muchos procesos importantes en el cuerpo humano. La mineralización de hueso, la despolarización nerviosa, la contracción muscular, la coagulación sanguínea y la formación de adhesiones intercelulares son algunos ejemplos de eventos fisiológicos que requieren calcio extracelular para funcionar normalmente. Por otro lado, en el contexto intracelular el calcio participa en eventos de permeabilidad y diferenciación celular, secreción de hormonas, metabolismo del glucógeno, proliferación y motilidad (Reyes Ibarra, 2007).

Es importante que el calcio se mantenga en una concentración normal de 10 mg / 100 ml de sangre, cuya molaridad equivalente es de 1.5 mM. El organismo mantiene estable dicha concentración de calcio a través de un sistema altamente organizado que involucra a las glándulas tiroideas y paratiroides, y a los sistemas renal, óseo y gastrointestinal. La disminución de calcio en sangre es detectada por la glándula paratiroidea la cual responde a este estímulo secretando la hormona paratiroidea (PTH, por sus siglas en inglés, Parathyroid Hormone) al torrente sanguíneo. Tres órganos blanco responden a PTH: los riñones, huesos e intestino, mismos que expresan receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés, G Protein-Coupled Receptor) específicos para PTH en la superficie de las células del túbulo renal, osteoblastos y células del epitelio intestinal, respectivamente. Los GPCRs para PTH se acoplan a $\text{G}\alpha_i$ inhibiendo la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc, por sus siglas en inglés, Cyclic Adenosine Monophosphate), un segundo mensajero importante que regula la fosforilación de proteínas intracelulares. En el riñón la PTH tiene tres efectos principales; incrementa la reabsorción del calcio por estimulación activa del túbulo distal tortuoso; incrementa la excreción de iones fosfato; y estimula la 1α -hidroxilasa que activa a la vitamina D. En los huesos la PTH causa la degradación de éstos liberando iones calcio y fosfato. Finalmente, en los intestinos el principal efecto de la PTH es a través de la activación de la vitamina D la cual eleva la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal. Todos los eventos ya descritos conllevan al incremento de calcio en sangre y, por lo tanto, al restablecimiento de su concentración normal. Una vez que el nivel de calcio es restaurado la secreción de PTH es inhibida. Por otro lado, el exceso de calcio por encima del nivel normal es detectado por la glándula

tiroides la cual responde a este estímulo secretando calcitonina, a través de sus células parafoliculares, al torrente sanguíneo. El efecto que tiene la calcitonina en el organismo es la reducción del nivel de calcio. La calcitonina actúa en riñón y hueso, sitios que presentan GPCRs específicos para esta hormona. Los GPCRs para calcitonina incrementan la producción de AMPc para llevar a cabo sus efectos celulares. En el riñón la calcitonina inhibe la reabsorción de calcio y fosfato, por tanto estos iones son excretados. En los huesos actúa principalmente en los osteoclastos, inhibe la actividad de estas células evitando así la degradación del hueso. Los eventos descritos conllevan a la disminución de calcio en sangre y, como consecuencia, se restablece la concentración normal (Fig.1) (Brown EM et al., 1998).

A nivel molecular, el responsable de mantener los niveles normales de calcio extracelular y, por tanto, de mediar el proceso homeostático del mismo es el receptor sensor de calcio extracelular (CaR, por sus siglas en inglés, Calcium-Sensing Receptor), el cual se expresa en células de la glándula paratiroides para mediar la inhibición de la secreción de la PTH (Brown EM et al., 1998).

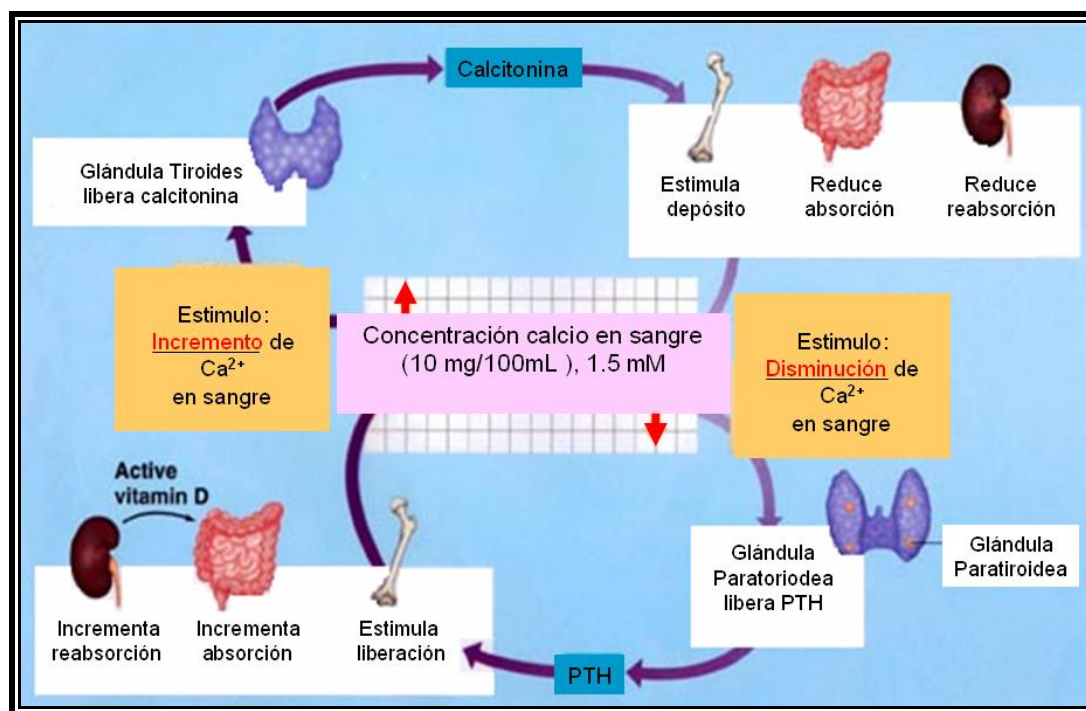


Fig. 1 Homeostasis del calcio extracelular. La concentración de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_o$) es regulada por una serie de sistemas que involucra a las glándulas tiroides y paratiroides, y a los sistemas gástrico, renal y óseo. Cuando la $[Ca^{2+}]_o$ disminuye, la PTH es secretada por la glándula paratiroides y actúa sobre sus células blanco a nivel de huesos, hígado, riñón e intestino promoviendo el incremento de la $[Ca^{2+}]_o$ en sangre. Por otro lado, cuando la $[Ca^{2+}]_o$ aumenta, la calcitonina es secretada por la glándula tiroides actuando en los mismos blancos celulares desencadenando una serie de eventos que llevan al decremento de la $[Ca^{2+}]_o$ en sangre (Modificado de Reyes Ibarra, 2007).

2.2 Receptores acoplados a proteínas G

Los GPCRs son una superfamilia de receptores transmembranales que tienen como característica principal la presencia de siete α -hélices transmembranales así como de transmitir su señal hacia el interior de la célula al activar a las proteínas G, que a su vez promueven la regulación de proteínas efectoras. Estos receptores modulan una gran cantidad de estímulos extracelulares que van desde drogas, neurotransmisores, hormonas, iones, luz, sabores y olores, entre otros. Existen alrededor de 1,000 miembros de esta superfamilia de receptores en organismos vertebrados, razón por la cual los GPCRs han sido clasificados en tres principales familias de acuerdo a su homología estructural y funcional; la familia 1 incluye a los receptores para olores y pequeños ligandos como la rodopsina, y los β_2 adrenérgicos, así como los receptores para algunas citocinas y hormonas. La familia 2 incluye receptores para proteínas y hormonas de alto peso molecular, como el glucagon y la secretina. Finalmente, la familia 3 incluye a los receptores para GABA B, el receptor metabotrópico para glutamato y al CaR (Fig.2) (Bockaert, 1999).

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por las subunidades $G\alpha$ y el heterodímero $\beta\gamma$. Cuando los GPCRs son estimulados por su ligando, la subunidad $G\alpha$ pasa de su forma inactiva, unida a GDP, a su forma activa, unida a GTP, liberando al heterodímero $\beta\gamma$. Dependiendo de la proteína G que activen será la función dentro de la célula, de esta forma los GPCRs pueden activar a la proteína $G\alpha_i$ inhibiendo la producción de AMPc, a la proteína $G\alpha_s$ que activa la producción de AMPc, a la proteína $G\alpha_q$ la cual estimula la producción de diacilglicerol (DAG) y de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) o a las proteínas $G\alpha_{12/13}$ que activan a la proteína Rho. Por otra parte, el heterodímero $\beta\gamma$ en su forma libre puede activar a proteínas como GTPasas de la familia de Rho, a la fosfatidil-Inositol 3-cinasa (PI3K), canales iónicos y a la fosfolipasa-C β (PLC β , por sus siglas en inglés, Phospholipase-C β), entre otros (Bockaert, 1999).

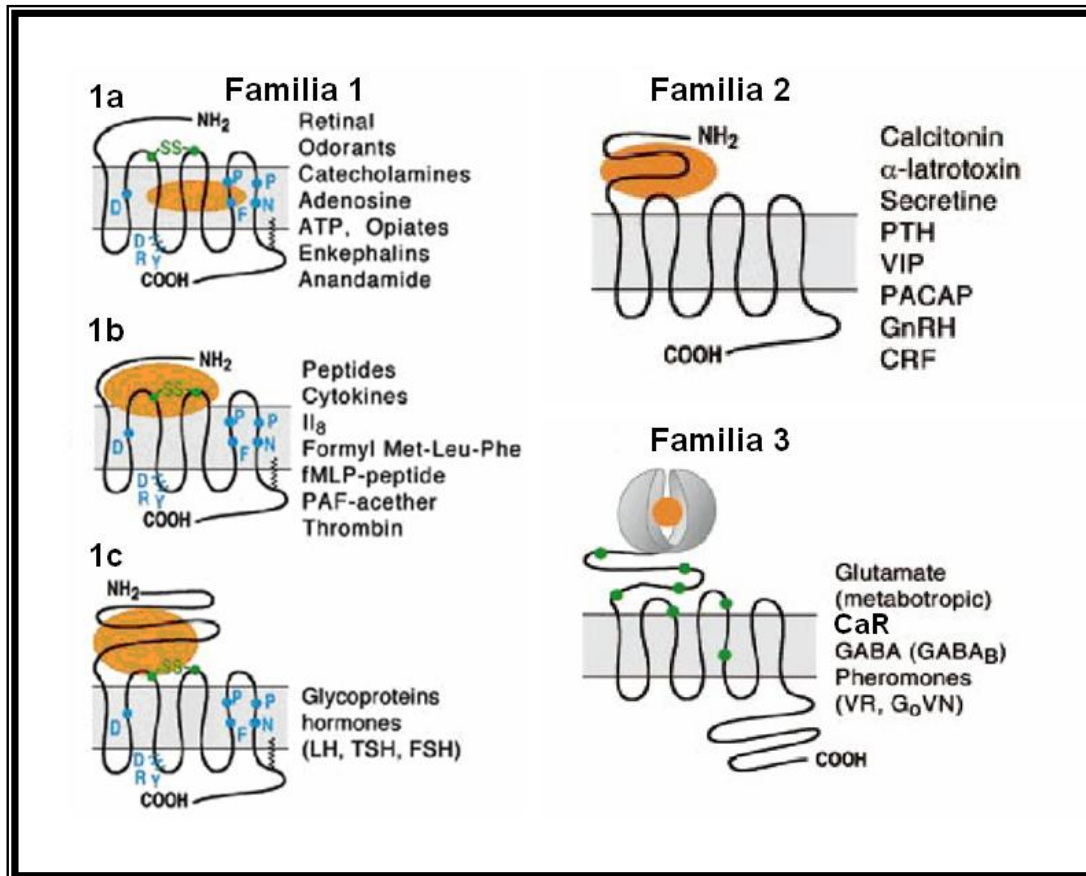


Fig. 2 Clasificación de la superfamilia de GPCRs. Los GPCRs se clasifican en tres familias dependiendo de la ubicación del sitio de unión a su ligando. De esta manera la familia 1a incluye a los receptores para pequeños ligandos como los receptores para rodopsinas y a los receptores β-2 adrenérgicos. Estos receptores unen su ligando en una cavidad formada por los dominios transmembranales 3 al 6. La familia 1b contiene receptores para péptidos y citocinas que se unen en la región amino terminal del receptor. La familia 1c contiene a los receptores para algunas hormonas glucoproteicas. Por otra parte, la familia 2 incluye a los receptores para hormonas de alto peso molecular como la secretina y el glucagón. Su sitio de unión al ligando se localiza en el extremo amino terminal y en la primera asa extracelular. La familia 3 incluye a los receptores metabotrópicos para glutamato, al de GABA B y al receptor sensor de calcio extracelular (CaR); estos receptores se caracterizan por tener el dominio amino terminal en forma de "atrapamosca" donde se une el ligando y un carboxilo terminal grandes (Tomada de Bockaert et al., 1999).

2.3 El receptor sensor de calcio extracelular (CaR)

Existen pocos estudios dirigidos hacia la caracterización del gen CaR. El gen humano está localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q21-q24). El gen para el CaR humano contiene al menos siete exones. Seis codifican para el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés, Extracelular Domain), mientras que un exón codifica para los siete dominios transmembranales (7TMD, por sus siglas en inglés, 7-Transmembranal Domain) y el extremo COOH (Brown EM and MacLeod RJ, 2001).

2.3.1 Estructura del CaR

El CaR es expresado abundantemente en paratiroides y riñón, donde su activación inhibe la secreción de la PTH y promueve la excreción de calcio urinario, respectivamente. La organización molecular del CaR en la membrana plasmática de estos tejidos es en forma dimérica (Bai M et al., 1998).

El CaR humano (hCaR) es un GPCR miembro de la familia 3. Está formado por una cadena polipeptídica de 1078 residuos de aminoácidos el cual comprende un ECD N-terminal, los 7TMD y un extremo C-terminal intracelular. El ECD contiene 11 sitios potenciales de glicosilación, de los cuales al menos tres deben ser glicosilados para que el receptor se exprese en la membrana plasmática. La glicosilación parece no ser crucial para la funcionalidad del CaR, pero sí en su plegamiento y tráfico celular. La caracterización bioquímica de una forma del ECD secretado y purificado muestra que el CaR funcional inicia en la tirosina 20, observación que coincide con la segmentación de un péptido señal hidrofóbico. La proteólisis trípica de la proteína purificada revela dos principales sitios de segmentación entre los residuos 360 - 380 y entre el 520 - 570. Estos dos sitios de segmentación expuestos en la superficie corresponden al loop3 y al sitio de unión del dominio de “atrapamoscas” (VFT, por sus siglas en inglés, Venus Fly Trap Structure) con el dominio rico en cisteínas, respectivamente (Fig.3) (Hu and Spiegel, 2003).

a) Dominio de atrapamoscas (VFT)

La determinación de la estructura 3D de los residuos 20-540 del hCaR muestra que esta porción del ECD está formado por una región de atrapamoscas (VFT) bilobulado y por una región rica en cisteínas. Un modelo del dominio VFT del hCaR basado en la estructura del cristal del receptor-1 metabotrópico para glutamato (mGluR1) muestra que el VFT está formado por dos lóbulos (LB1 y LB2) conectados entre sí. Cada lóbulo está formado por α -hélices y β -plegadas conectadas por cortos loops. El LB1 contiene cuatro loops largos, designados loop 1-4. El estudio de mutaciones del CaR con deleciones de partes de cada uno de estos loops ha revelado que una gran parte (365-385) del loop3 puede ser deletado sin perjudicar la función del receptor, pero que deleciones del loop1 (50-59) o loop4 (438-445), aunque no disminuyen la expresión del receptor sí reducen su activación. Por otro lado, deleciones del loop2 incrementan la sensibilidad a Ca^{2+} del CaR mutante (Reyes Cruz et al., 2001).

b) Dominio rico en cisteínas

El VFT y los 7TMD están unidos a través de una región de 84 residuos de aminoácidos la cual contiene nueve cisteínas separadas en distancias pequeñas, esta región se denomina dominio rico en cisteínas. Con la excepción del receptor GABA_B, el cual carece de este dominio, otros GPCRs de la familia 3 contienen las mismas nueve cisteínas con espaciamiento conservado. La mutación de algunas de estas cisteínas por serinas perjudica severamente la expresión y función del CaR (Fan et al., 1998). La delección del dominio rico en cisteínas resulta en la abolición de la activación del CaR, a pesar de su expresión en la superficie celular (Hu et al., 2000). Esto sugiere que el dominio rico en cisteínas juega un papel importante en la transmisión de la señal del dominio VFT a los 7TMD. Está demostrado que el dominio VFT del CaR dimérico no se une por puentes disulfuro al dominio rico en cisteínas ni tampoco a los 7TMD (Hu et al., 2001).

c) Los 7TMD y el dominio intracelular

Se ha sugerido que los 7TMD, además del dominio VFT, pueden contener sitios para la unión de polipeptidos para la activación del CaR. Por otro lado, varios residuos de los 216 (889-1078) del extremo C-terminal del CaR pueden ser truncados sin perjudicar la expresión del receptor en la superficie celular ni su activación (Ray et al., 1997). Sin embargo, el extremo C-terminal puede ser responsable de otras propiedades del CaR, tales como su respuesta cooperativa al Ca²⁺ (Gamma and Breitwieser, 1998), y su unión a proteínas adaptadoras como la filamina (Hjalm et al., 2001). La función del CaR está regulada directamente por la Proteína Cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés, Protein Kinase C) quien lo fosforila (Bai et al., 1998; Jiang et al., 2002). De hecho, cada monómero del CaR contiene cinco sitios putativos de fosforilación de PKC en el extremo C-terminal. Cada monómero también contiene dos sitios regulatorios para la Proteína Cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés, Protein Kinase A) cuya relevancia fisiológica es desconocida.

d) Unión del agonista

El Ca²⁺ activa al CaR en concentraciones milimolares, implicando que hay una baja afinidad entre el Ca²⁺ y su sitio de unión en el CaR. La activación del CaR muestra una cooperatividad positiva, incrementando la posibilidad de múltiples sitios de unión del Ca²⁺ dentro del VFT o en otros sitios (Conigrave et al., 2000). Además del Ca²⁺,

otros cationes polivalentes tales como Gd^{3+} y compuestos policatiónicos, tales como espermina y neomicina, actúan como agonistas para el CaR (Handlogten 2000). Esto ha conducido a la sugerencia de que los agonistas policatiónicos pueden activar al CaR dado que éste presenta residuos de aminoácidos cargados negativamente, abundantes a lo largo del ECD, pero particularmente presentes en la parte terminal del LB2, entre los residuos 215-251.

La estructura del cristal del VFT del mGluR1 unido a glutamato ha revelado los residuos clave en el LB1 y LB2 implicados en la unión del agonista (Kunishima et al., 2000). Estudios de receptores quiméricos (Hammerland et al., 1999; Brauner-Osborne et al., 1999; Hu et al., 2000) muestran que el sitio predominante de unión del agonista del CaR, y probablemente de la mayoría de GPCRs de la familia 3, reside dentro del dominio VFT. Sin embargo, los residuos de aminoácidos específicos responsables de la unión del Ca^{2+} en el CaR todavía no se han definido.

La mutación de los residuos de aminoácidos 758, 759 o 767 mejora la sensibilidad a Ca^{2+} por parte del receptor, sugiriendo que estos residuos en el loop2 extracelular pueden ayudar a mantener al CaR en su estado inactivo (Hu et al., 2001).

e) Dimerización del VFT

El CaR se expresa en la membrana plasmática como un dímero unido por puentes disulfuro intramoleculares entre el ECD de dos monómeros. La mutagénesis de las diez cisteínas dentro del VFT indica que las cisteínas 60, 101, 236, 358, 395, 437 y 449 son cruciales para la expresión normal y función del receptor, mientras que las cisteínas 129, 131 y 482 (Fig.3) pueden ser mutadas sin perjudicar la función de éste (Fan et al., 1998). El cristal del mGluR1 muestra que los pares de cisteínas 60-101, 358-395 y 437-449 – equivalentes en el CaR – forman tres puentes disulfuro intramoleculares, los cuales son probablemente cruciales para la integridad estructural del VFT. Aunque la mutación de Cys129 o Cys131 en el loop2 no causa la pérdida de la función del CaR, una doble mutación en estos mismos residuos causa la expresión del CaR como un monómero, identificando estos residuos como los cruciales para la dimerización del CaR (Hu et al., 2001).

La dimerización del CaR también implica interacciones no covalentes, además de los dos puentes disulfuro intermoleculares (Zhang et al., 2001; Ray et al., 1999). La importancia funcional de la dimerización del CaR está demostrada por la

“complementación de función entre monómeros del CaR”, cuando cada monómero presenta distintas mutaciones en diferentes dominios del receptor. Las mutaciones localizadas en el VFT o en el C-terminal causan una función mínima del receptor cuando es expresado como homodímero, pero dicha función se recupera cuando éste es coexpresado como heterodímero. Se ha sugerido que la complementación funcional requiere dos dominios ricos en cisteína y dos dominios 7TMD intactos para la comunicación entre el VFT y los 7TMD (Hauache, et al., 2000).

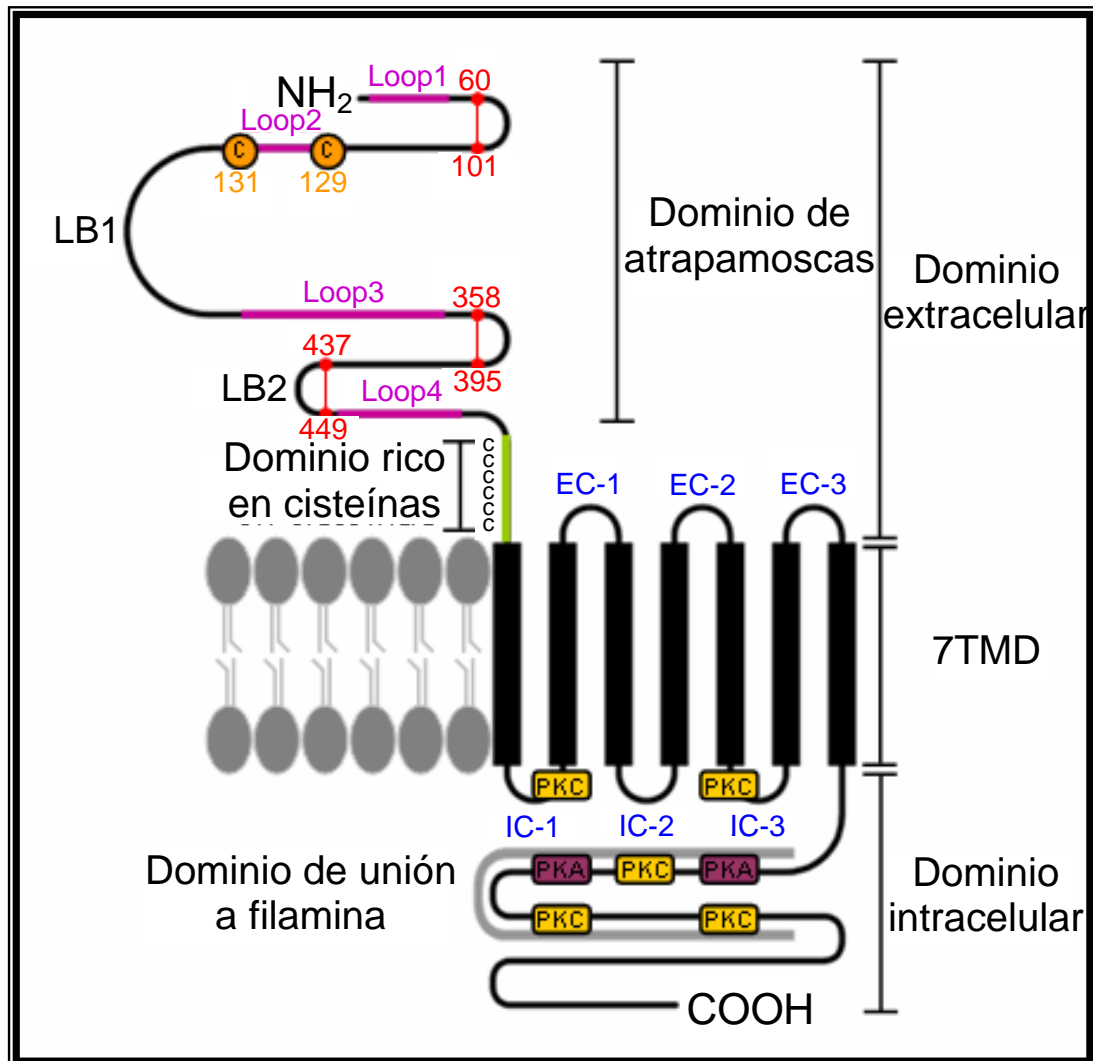


Fig. 3 Estructura del CaR. El CaR es un GPCR el cual se divide en tres dominios: el dominio extracelular N-terminal (ECD), los 7 dominios transmembranales (7TMD) y el dominio intracelular C-terminal. El ECD se subdivide en el dominio de atrapamoscas y el dominio rico en cisteínas. El dominio de atrapamoscas presenta dos lóbulos (LB1 y LB2); ésta estructura se mantiene íntegra gracias a tres puentes disulfuro intramoleculares. El dominio de atrapamoscas presenta además cuatro loops que unen las α -hélices y β -plegadas de cada lóbulo. Además, la dimerización del CaR está mediada por las cisteínas 129 y 131, localizadas en el loop2. Los 7TMD presentan tres asas extracelulares (EC1-3) y tres asas intracelulares (IC1-3). Finalmente, el dominio intracelular presenta cinco sitios de fosforilación para la PKC, dos para la PKA y un dominio de unión a filamina (Hu et al., 2001; Bai et al., 1998; Jiang et al., 2002).

2.4 Vías de señalización activadas por el CaR

En varios tipos celulares el CaR se ha relacionado con la regulación de diversos procesos celulares tales como secreción, quimiotaxis, apoptosis, proliferación, diferenciación y actividad de canales iónicos. Sin embargo, en esta sección se enfatizará el papel del CaR en la inhibición de la secreción de la PTH. Como en el caso de muchos receptores de superficie celular, la unión del agonista al CaR resulta en la activación de una intrincada y ramificada red de señalización dentro de la célula, la cual permite que segundos mensajeros dirijan numerosas funciones intracelulares (Fig.4) (Hofer and Brown, 2003).

El CaR además de sensor $[Ca^{2+}]_i$, tiene la capacidad de activarse por la unión de otros iones divalentes como el magnesio, bario, cadmio, cobalto, hierro y níquel, también responde a poliaminas, así como a compuestos no iónicos como la neomicina (Handlogten et al., 2000). El CaR, una vez activado por su ligando, transduce la señal mediante la activación de proteínas G heterotriméricas, promoviendo el intercambio de GDP por GTP, actuando éste como un factor intercambiador de nucleótidos o GEF (Tsao et al., 2001). Actualmente se sabe que el CaR activa a las proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$, a través de los cuales regula la producción de segundos mensajeros. La activación de la proteína $G\alpha_i$ tiene como consecuencia la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo así la producción de AMPc y, por tanto, el decremento de la actividad de la PKA. Por otra parte, la activación de la $G\alpha_q$ conlleva a la activación de las fosfolipasas C (PLC), D (PLD) y A_2 (PLA₂). La activación de la PLC hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) para formar IP₃ y DAG, con el consecuente incremento del calcio intracelular debido a su liberación del retículo endoplásmico, y la activación de la PKC. Una vez activada PKC media la fosforilación de las cinasas ERK 1/2. La PLD actúa en fosfolípidos de membrana para liberar el ácido fosfatídico biológicamente activo. La PLA₂ actúa también en fosfolípidos de membrana para liberar ácido araquidónico, el cual es entonces metabolizado para activar a mediadores como ácido hidroxiperoxieicosatetranoico o ácido hidroxieicosatetranoico, el cual puede entonces decrementar la secreción de PTH (Bordeau et al., 1994, 1992). Esto ha mostrado la importancia de los efectos de la PKC y de $G\alpha_i$ para activar la vía de cinasa de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés, Mitogen Activated Protein Kinase) para fosforilar y activar a la PLA₂ (Kifor et al., 2001). Por otro lado, está demostrado que el extremo C-terminal del CaR interacciona con la proteína Filamina A, y esto puede contribuir a

la activación de las MAPK mediada directamente por el CaR (Hjalm et al., 2001). En paralelo, el CaR también activa a la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), el cual es una de las enzimas de la vía biosintética que conduce al reemplazamiento del PIP_2 .

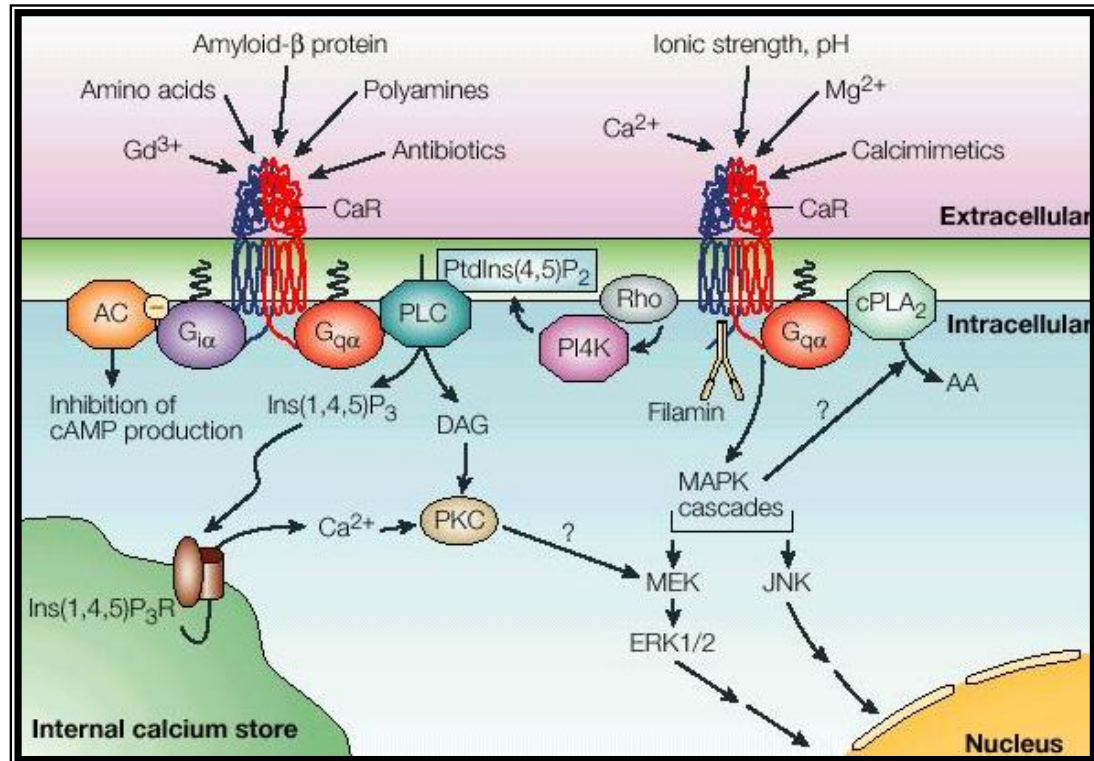


Fig. 4 Vías de señalización activadas por el CaR. El CaR activa a más de una proteína G y, por lo tanto, activa varias vías de señalización dependiendo del tejido donde se exprese y a qué proteína G se acople. Si el receptor se acopla a G_{α_i} , inhibe a la adenilato ciclasa (AC) evitando la producción de AMPc. Cuando el CaR se acopla a G_{α_q} permite la formación de IP3 y diacilglicerol (DAG), ya que activa a la fosfolipasa C (PLC), permitiendo así la liberación de calcio intracelular y la activación de la Proteína Cinasa C (PKC). También se ha observado que cuando el CaR se acopla a G_{α_i} se activa la fosfolipasa A2 (PLA2) y se produce ácido araquidónico (AA) (Tomada de Hofer AM, et al., 2003).

2.5 Mutaciones activantes e inactivantes del CaR y su relevancia fisiológica y patológica

La importancia fisiológica del CaR es incuestionable ante el hallazgo de enfermedades como la hipercalcemia hipocalciuria familiar (FHH, por sus siglas en inglés, Familial Hypocalciuric Hypercalcemia) y el hiperparatiroidismo neonatal severo (NSHPT, por sus siglas en inglés, Neonatal Severe Hyperparathyroidism). Estas enfermedades son causadas por mutaciones inactivantes en el gen que codifica para el CaR lo cual provoca pérdida de su función. Por otro lado, la hipocalcemia dominante autosómica (ADH, por sus siglas en inglés, Autosomal Dominant Hypocalcemic) es debida a mutaciones activantes que tienen como

consecuencia un aumento en la función del CaR. Estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de todo el CaR (Fig.5), principalmente en las regiones N-terminal y en los 7TMD y algunas, no menos importantes, en el dominio C-terminal. Las mutaciones presentadas en el CaR son principalmente de tipo puntual, es decir, que se cambia un aminoácido por otro. Sin embargo, existen mutaciones donde se elimina parte de la proteína y se cambia el marco de lectura tal como es el caso de la mutación $\Delta 895-1075$, que es una mutación activante del CaR donde se eliminan 180 residuos de aminoácidos del dominio C-terminal (Lienhardt et al., 2000).

2.5.1 Mutaciones inactivantes en FHH y NSHPT

Mutaciones inactivantes del CaR causan una alteración radical en la inhibición de la secreción de PTH y en la estimulación de la excreción de Ca^{2+} urinario, conduciendo a patologías como hipercalcemia e hipocalciuria en sujetos con FHH y NSHPT. La severidad de la alteración en el fenotipo bioquímico está correlacionada con el tipo de mutación. Las mutaciones nulas que evitan la expresión del CaR causan FHH leve cuando el individuo es heterocigoto, pero causa NSHPT cuando es homocigoto o heterocigoto compuesto. Las mutaciones en pacientes heterocigotos que permiten la expresión del CaR pero perjudican su función pueden causar formas de FHH o NSHPT más severos por actuar como dominante negativa del CaR sin mutación, presumiblemente por heterodimerización. Las mutaciones que truncan del hCaR proximal al residuo 888 interrumpen la función del receptor; así, cambios en el marco de lectura o mutaciones sin sentido causan tales truncamientos y, por tanto, son ejemplos de mutaciones inactivantes (p. ej. R648stop produce un CaR inactivo con un simple dominio transmembranal). Las mutaciones causantes de FHH / NSHPT pueden inactivar al CaR por causar un mal plegamiento y mala expresión en la superficie celular o por impedir la activación del receptor expresado apropiadamente. Alrededor de 30 mutaciones inactivantes sin sentido han sido identificadas hasta la fecha en FHH / NSHPT y su distribución no es azarosa. Más de la mitad de éstas se encuentra entre los residuos 13 y 297 del ECD, mientras que sólo una se ha reportado entre los residuos 298 y 548 (Hendy et al., 2000; D'Souza-Li, et al., 2002).

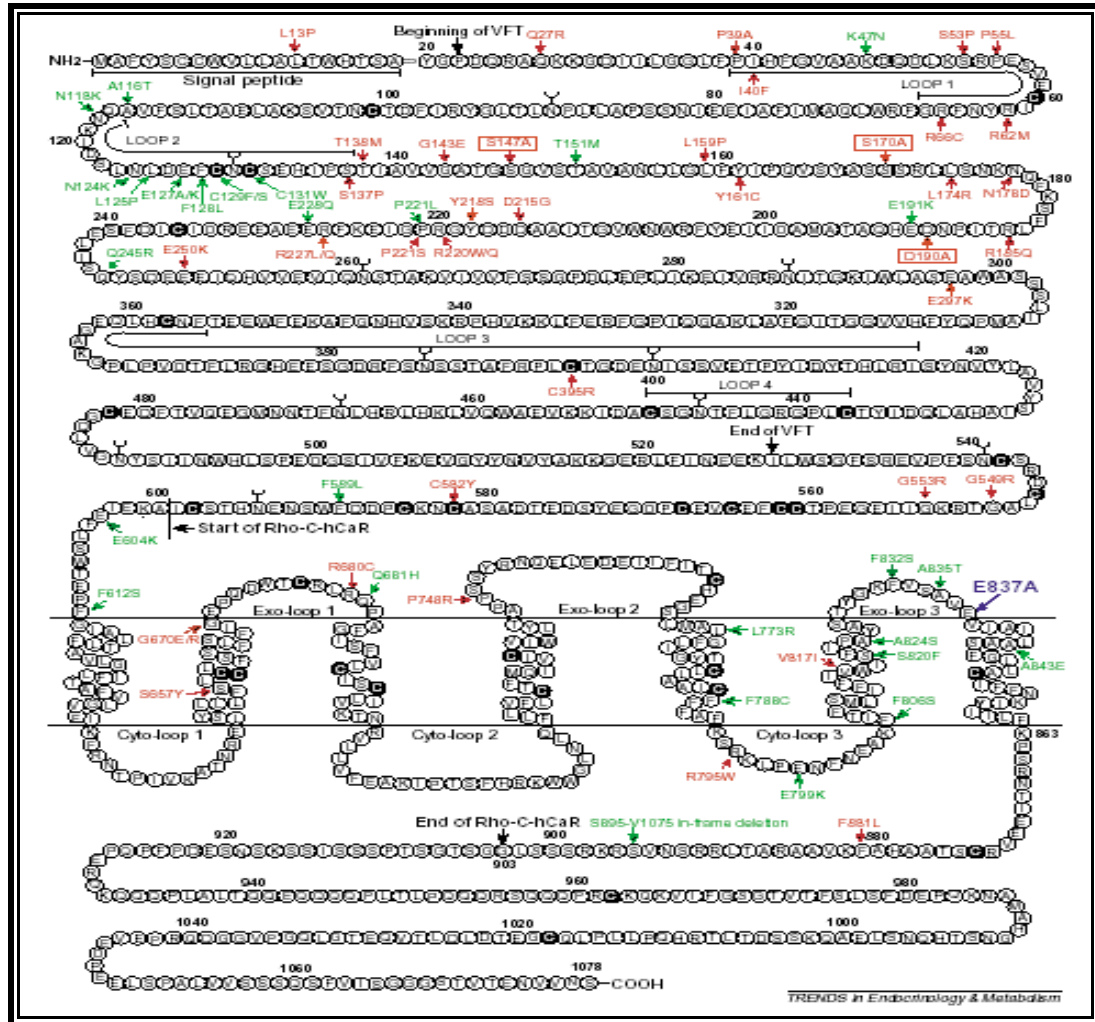


Fig. 5 Mutaciones activantes e inactivantes del CaR. Se han descrito una gran cantidad de mutaciones en el CaR, las cuales son de tipo inactivante (en rojo), es decir, disminuyen la función del receptor, o activante (en verde), que aumentan la sensibilidad del receptor por el calcio (Tomada de Hu J, et al. 2003).

La mutación L13P, dentro del péptido señal, identificado en una paciente con hipercalcemia severa, presumiblemente evita la expresión normal del CaR. Tres mutaciones (E297K, Y218S y R66C) pueden directamente impedir la unión del Ca^{2+} al CaR; sin embargo, R66C puede inactivar al receptor porque interfiere con la formación del puente disulfuro intramolecular 60-101. De manera similar, la mutación C395R evita la formación del puente disulfuro 358-395, también intramolecular. Dada la importancia de la rotación promovida por el agonista sobre la interfase del dímero, no es sorprendente que muchas mutaciones inactivantes del CaR impliquen residuos en la interfase del dímero, especialmente en el LB1 (S53P, P55L, L159P, N178D y posiblemente Y161C y L174R) y en el LB2 (D215G, R220W/Q, P221S y R227L/Q). Se ha especulado que tales mutaciones impiden la rotación promovida

por el agonista sobre la interfase del dímero, bloqueando así la activación del CaR. Por otro lado, R185Q y R227L, identificadas como mutaciones en NSHPT, se comportan como dominantes negativas. Tres mutaciones localizadas justo después del loop2 en el ECD (S137P, T138M y G143E) pueden causar inactivación porque evitan el cambio conformacional dependiente de agonista dentro de ese loop (Hu et al., 2001).

Tres mutaciones (G549R, G553R y C582Y) dentro del dominio rico en cisteínas probablemente eviten el plegamiento normal de este dominio. De las mutaciones sin sentido en los 7TMD, para la R680C en el loop1 extracelular se ha sugerido que impide la formación de un puente disulfuro entre C677 y C765, mientras que la R795W en el IC-3 intracelular puede evitar el acoplamiento de las proteínas G. V817I puede evitar un cambio conformacional dependiente de activación dentro del TMD6 (Hu et al., 2001).

2.5.2 Mutaciones activantes en ADH

Mutaciones activantes en sujetos heterocigotos con ADH conducen al desarrollo de hipocalcemia relativa e hipercalciuria. Con excepción de la delección S895-V1075 (Lienhardt et al., 2000) las mutaciones activantes en pacientes ADH son mutaciones sin sentido. Tales mutaciones presumiblemente actúan liberando del constreñimiento inhibitorio que mantiene al CaR en su conformación inactiva. La mayoría de las mutaciones en individuos ADH incrementa la sensibilidad de CaR al Ca^{2+} . Al igual que las mutaciones inactivantes que ocurren de manera natural, las mutaciones en individuos con ADH están agrupadas en regiones particulares del CaR. La mayoría de éstas ocurren presumiblemente en la interfase del dímero en el LB1 (T151M, loop2 A116T, N118K, N124K, L125P, E127A/K, F128L, C129F/S y C131W) y en el LB2 (P221L, E228Q y Q245R). Dada la localización de las mutaciones se ha especulado que éstas mejoran la sensibilidad del CaR al Ca^{2+} facilitando la rotación del dímero promovido por el agonista (Hu et al., 2001).

Las mutaciones F589L, E604K y F612S están localizadas entre el dominio rico en cisteínas y el primer dominio transmembranal. Dado el probable papel del dominio rico en cisteínas en la transmisión de la señal del VFT a los 7TM, se ha especulado que estas mutaciones actúan facilitando la comunicación entre el VFT unido a su agonista y los 7TMD. Por su parte, un grupo de mutaciones están localizadas en las hélices transmembranales 5, 6 y 7 y en el EC-3. La mutación

E799K en el IC-3 puede ser la contraparte a la mutación inactivante R795W, sugiriendo que incrementando la carga positiva de esta asa se mejora el acoplamiento de la proteína G (Hu et al., 2001).

2.6 Mecanismo de señalización del TGF- β

La señalización mediada por el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β , por sus siglas en inglés, Transforming Growth Factor- β) controla una gran diversidad de procesos celulares durante la embriogénesis así como en tejidos adultos, tales como proliferación, diferenciación y apoptosis, entre otros, (Patterson and Padgett, 2000; ten Dijke et al., 2002; Massagué J, and Chen YG, 2000).

La familia del TGF- β es un grupo de citocinas relacionadas entre sí que funcionan como ligandos, siendo el TGF- β el prototipo. La superfamilia del TGF- β contiene dos subfamilias, la subfamilia TGF- β / Activina / Nodal y la subfamilia BMP / GDF / MIS, definidas por la similitud en su secuencia de residuos de aminoácidos y por las rutas de señalización específicas que éstas activan. Aunque los diversos ligandos de la familia del TGF- β generan diferentes respuestas celulares, todos ellos comparten una serie de características estructurales y a nivel de secuencia de aminoácidos. La forma activa del TGF- β es un dímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas, la cual es posteriormente reforzada por un puente disulfuro intersubunidad en la mayoría de los casos. Cada monómero comprende algunas láminas β extendidas unidas por tres puentes disulfuro conservados que forman una estructura conocida como “nudo de cistinas”. La conformación dimérica de los ligandos sugiere la formación de un complejo con dos receptores tipo I (RI) y dos tipo II (RII). El acceso del ligando a los receptores está regulado por una gran familia de proteínas colectivamente conocidas como “atrapadoras de ligando” (Massagué, 1998).

Los receptores de los miembros de la superfamilia del TGF- β son miembros de la familia de receptores con actividad de cinasa en residuos de serina y treonina, que en el humano comprenden 12 miembros – 7 para el RI y 5 para el RII – todos dedicados a la señalización (Manning et. al., 2002). Los T β RI como los T β RII son los receptores para el TGF- β , y tienen una longitud de alrededor de 500 residuos de aminoácidos, organizados en una región N-terminal extracelular donde se localiza el dominio de unión al ligando, una región transmembranal y una región C-terminal intracelular donde se encuentra el dominio con actividad de cinasa. La estructura del

dominio de unión al ligando del RI para proteínas morfogénicas de hueso (BMP, por sus siglas en inglés, Bone Morphogenetic Protein) (Kirsch et. al., 2000) como el RII para activinas (Greenwald et. al., 1999) y TGF- β (Boesen et. al., 2002) exhiben una conformación similar a la toxina de tres dedos, donde cada dedo está formado por un par de láminas β antiparalelas (Fig.6).

Existen dos modos distintos de interacción ligando-receptor, uno ejemplificado por miembros de la subfamilia de las BMPs y otro representado por las activinas y TGF- β s. Las BMPs presentan una alta afinidad por el dominio de unión al ligando del BMPRI y una baja afinidad por el mismo dominio en el BMPRII. Este complejo ligando-RI preensamblado tiene una alta afinidad de unión por el RII. Se ha sugerido que interacciones hidrofóbicas entre las BMPs y el RI son esenciales y predominantes (Kirsch et. al., 2000). Por otro lado, activinas y TGF- β s muestran una alta afinidad por el RII y no interactúan con RI aislados (Massagué, 1998). En este caso, el ligando se une primero al ectodominio del RII; esto permite la subsecuente incorporación del RI, formando así un complejo de un ligando dimerizado y cuatro moléculas de receptor. Los RI, pero no los RII, contienen una secuencia característica SGSGSG, denominada dominio GS, localizado en dirección N-terminal inmediato al dominio cinasa. La activación del RI implica la fosforilación de su dominio GS por el RII, conformando así un complejo de señalización en el que ambos tipos de receptores están unidos al ligando.

2.6.1 Mecanismo de activación del receptor para TGF- β

La unión a los dominios extracelulares de ambos tipos de receptores por parte del ligando dimerico TGF- β induce una estrecha proximidad, facilitando la fosforilación y la subsecuente activación del T β RI. El T β RII, al parecer constitutivamente activo, fosforila múltiples residuos de serina y treonina en la secuencia TTSGSGSG, de la región GS citoplásmica del T β RI, conduciendo a su activación (Massagué, 1998). La región GS sirve como un importante dominio regulatorio para la señalización del TGF- β . Los T β RI no fosforilados en GS son incapaces de interactuar con R-Smad cascada abajo, mientras que los T β RI fosforilados se unen eficientemente a las R-Smad y muestran un mejoramiento notable en la fosforilación específica de residuos de serina en el C-terminal de R-Smads (Huse et. al., 2001). La región GS del T β RI actúa como un interruptor mediando la exposición del sitio de unión para un inhibidor o exponiendo la superficie de unión de substratos como las R-Smads.

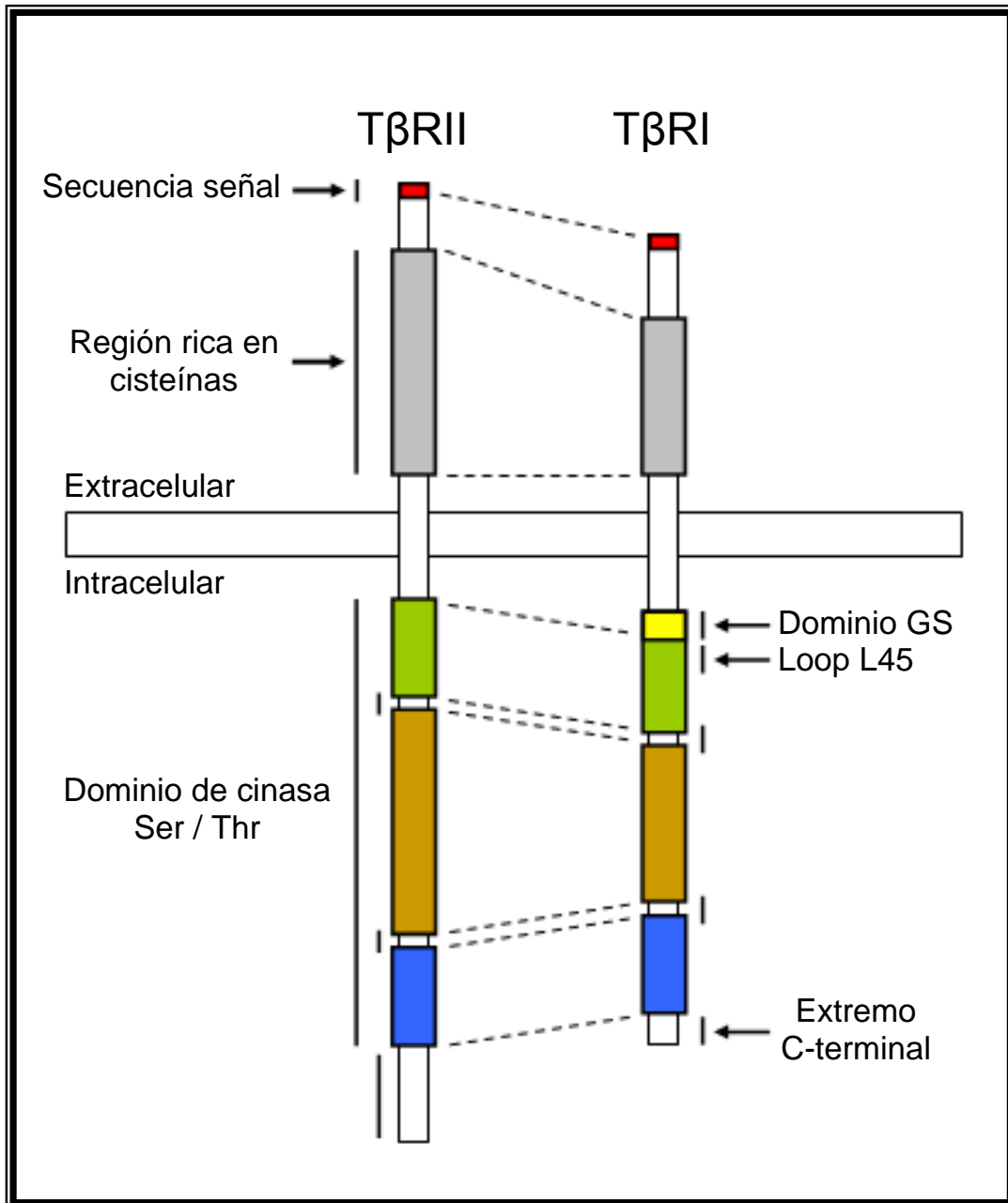


Fig. 6 Representación esquemática de los receptores para TGF- β . Los receptores para TGF- β , T β RI y T β RII, son proteínas transmembranales cuya longitud es de 500 y 570 residuos de aminoácidos, respectivamente; ambos poseen actividad de cinasa en residuos de Ser / Thr (Massagué 1998). Ambos receptores son similares entre sí, siendo el dominio con actividad de cinasa la región más conservada (Massagué 1998). El extremo N-terminal de ambos receptores se localiza en la parte extracelular, contiene solo 150 residuos de aminoácidos y el sitio de unión al ligando, la secuencia señal; además, es rico en residuos de cisteínas. El extremo C-terminal se localiza en la parte intracelular y en ambos receptores contiene dos dominios con actividad de cinasa. Sólo el T β RI presenta el dominio GS, rico en residuos de glicinas y serinas, que es fosforilado por el T β RII para activar el dominio cinasa del T β RI. El T β RI también presenta el loop L45 a través del cual se da el reconocimiento entre el T β RI y las Smads. El extremo carboxilo terminal es muy corto en el T β RI comparado con el del T β RII (Modificado de Lebrin F, et al., 2005).

2.6.2 Regulación de la activación del receptor para TGF- β

Los pasos que conducen a la activación del receptor están estrechamente regulados. El acceso del TGF- β a su receptor está controlado por dos clases de moléculas con funciones opuestas. La primera clase comprende un grupo diverso de proteínas solubles que actúan como atrapadoras de ligando, secuestrando el ligando e impidiendo su acceso a sus receptores correspondientes. Dentro de las proteínas que se unen al TGF- β están LAP (latency-associated polypeptide), decorina y α 2-macroglobulina. La folistatina se une a activinas y BMPs, mientras que noggina, cordina y DAN se unen a las BMPs exclusivamente.

Noggina es un regulador crítico de la actividad de BMPs durante la diferenciación dorsoventral, inducción y diferenciación neural y esquetogénesis en vertebrados (Brunet et. al., 1998; Gong et. al., 1999; Lim et. al., 2000). Noggina inhibe la actividad de la BMP7 bloqueando la superficie que se requiere para interactuar con sus respectivos receptores BMPRI y BMPRII (Groppe et. al., 2002). El segmento N-terminal de cada monómero de noggina adopta una conformación extendida y se enrolla alrededor de un monómero de BMP7 ocupando directamente el sitio de contacto con su receptor. Por otro lado, la proteína BAMBI (también conocida como Nma) representa un tipo de regulador negativo de la activación del receptor (Onichtchouk, et. al., 1999). BAMBI tiene un dominio extracelular y una región citoplásmica corta cuya secuencia es similar con los BMPRI. BAMBI compite con el BMPRI para la incorporación en el complejo receptor inducido por ligando, inhibiendo la activación del receptor.

La otra clase de moléculas que controlan el acceso del ligando al receptor incluye proteínas ancladas a la membrana que actúan como receptores accesorios, o correceptores, favoreciendo la unión del ligando para la señalización de los receptores. La proteína transmembranal betaglicano, también conocida como el T β RIII de TGF- β , es conocida por mediar la unión del TGF- β al RII, una función particularmente crítica para el TGF- β 2 (Brown CB, et. al., 1999a, Massagué, 1998). El betaglicano no se une a activinas ni a BMPs. La evidencia genética y bioquímica sugiere que la proteína endogлина facilita la unión de miembros de la familia del TGF- β ALKI (un T β RI) en células endoteliales, siendo su función crítica en procesos de homeostasis vascular (Marchuk, 1998; Massagué et. al., 2000).

La activación del receptor es también regulado por proteínas intracelulares. Se cree que la unión de FKBP12 al dominio GS del T β RI no fosforilado constriñe la actividad basal del receptor, evitando así la fosforilación y activación del receptor independiente del ligando (Huse, et. al., 1999). Una vez activados, los receptores de la familia del TGF- β son regulados negativamente por las I-Smad como la Smad7. Smad7 se une a los receptores activados y compite con las R-Smad (Kavsak, et. al., 2000; Suzuki, et. al., 2002). La interacción de Smad7 con el receptor conduce a la ubiquitinación y degradación del receptor con ayuda de ligasas E3 de ubiquitina y los factores regulatorios de ubiquitinación de Smad (Smurfs) (Ebisawa et. al., 2001; Tajima et. al., 2003). El complejo TGF β -receptor-Smad7-Smurf es dirigido hacia el proteosoma para su degradación vía vesículas ricas en caveolinas (Di Guglielmo et. al., 2003).

2.6.3 Características de las proteínas Smads

Las proteínas Smads son los únicos sustratos conocidos que son activados por fosforilación directamente por los complejos activos de los receptores para el TGF- β , y que sirven como mediadores directos de este ligando, al actuar como factores de transcripción que modulan la expresión de los genes encargados de la respuesta celular específica al TGF- β (Briones Orta, 2006).

Las proteínas Smads fueron identificadas en *Drosophila*, en donde se denominaron Mads (por sus siglas en inglés, Mothers Against Decapentaplegic). Posteriormente proteínas homólogas fueron identificadas en *C. elegans* donde fueron nombradas Sma (por sus siglas en inglés, Small Body Size). Con base en estos estudios, los genes en vertebrados fueron clonados y se denominaron Smad por la fusión de los nombres Mad y Sma (Briones Orta, 2006).

Hay ocho proteínas Smads identificadas en el humano, pero solo Smad2 y Smad3 sirven como sustratos específicos para los complejos de receptores activos del TGF- β y la activina, mientras que las Smad1, Smad5 y Smad8 son sustratos de los receptores de las BMPs. Todas estas Smads se encuentran dentro del grupo denominado R-Smads o Smads reguladas por el receptor. La proteína Smad4 se denomina Smad común o Co-Smad y se asocia a todas las R-Smads fosforiladas. El último grupo de Smads lo constituyen las proteínas Smad6 y Smad7, denominadas Smads inhibitorias o I-Smads (Briones Orta, 2006).

Las proteínas R-Smads y Co-Smad, ambas de alrededor de 500 residuos de aminoácidos de longitud, presentan dos dominios estructurales conservados: el dominio MH1 N-terminal y el dominio MH2 C-terminal (Fig.7). Las R-Smads, pero no la Co-Smad, contienen un motivo SXS característico en su extremo C-terminal. El dominio MH1 de Smad4 y de la mayoría de R-Smads presenta una secuencia específica de unión a DNA, requerida para su importación al núcleo y la regulación negativa de la función del dominio MH2. El extremo N-terminal de las I-Smads muestra homología en su secuencia en comparación con el dominio MH1 de las R-Smads pero no se une a DNA. En contraste, el dominio MH2 es responsable de la interacción de las Smads con el receptor, formación de complejos homoméricos y heteroméricos entre Smads, y del contacto directo con el poro nuclear para su traslocación al núcleo. De manera importante, la fosforilación del extremo C-terminal en dos residuos de serina del motivo SXS conduce a la activación de las R-Smads. Tanto el dominio MH1 como el MH2 interactúan con un gran número de proteínas en el núcleo para regular así la transcripción de genes.

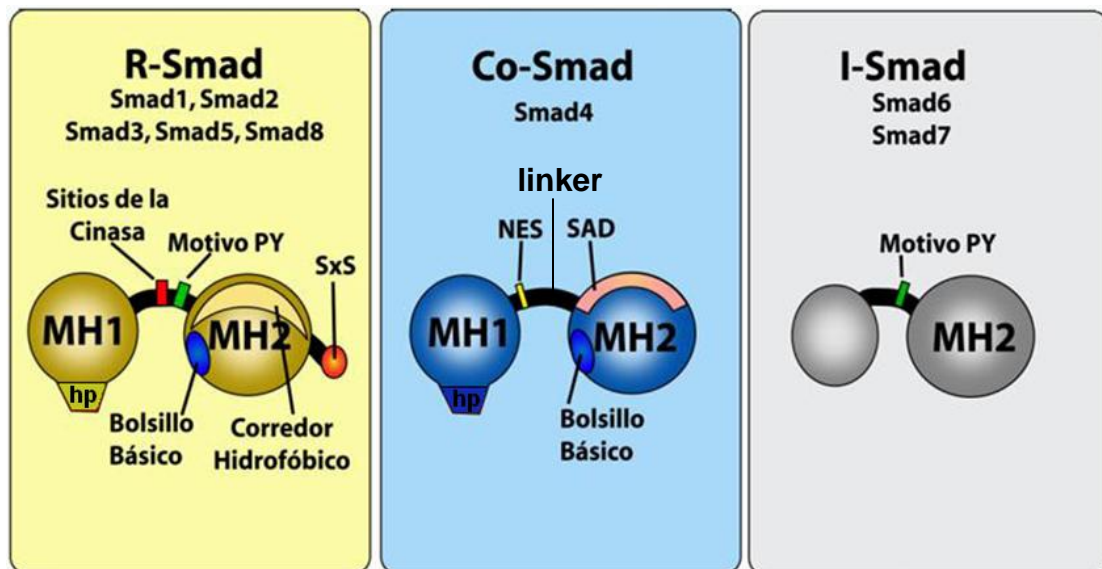


Fig. 7 Esquema representativo de las principales estructuras de las proteínas Smads. Se observan los dominios MH1, "linker" y MH2, y los elementos funcionales que contienen. En el caso del dominio MH1 se observa el dominio de unión a DNA (hp, "hairpin"). En el dominio "linker" se localizan sitios de fosforilación por cinasas, el motivo de interacción con Smurf (PY) y en el caso de la Smad4 (Co-Smad) un sitio de localización de exportación nuclear (NES, "Nuclear export signal"). En el dominio MH2 se localiza el bolsillo básico que permite la interacción entre las R-Smads y el T β RI, y de las R-Smads fosforiladas con la Co-Smad, el corredor hidrofóbico que permite la interacción de las Smads con proteínas de retención nuclear, nucleoporinas y factores de transcripción. En el caso de Smad4 se localiza una región que media la interacción con activadores y represores transcripcionales (SAD, "Smad4 activation domain") (Modificado de Briones Orta, 2006).

Aunque la secuencia *linker*, ubicada entre el dominio MH1 y MH2, es divergente entre las Smads, esta región contiene múltiples sitios de fosforilación, el cual permite mecanismos de comunicación cruzada específicos con otras vías de señalización. También tiene un motivo PY, el cual media la interacción específica con las Smurf.

2.6.4 Regulación del acceso de las R-Smads al receptor activado

El reconocimiento de las R-Smads por los receptores puede ser facilitado por proteínas auxiliares. Por ejemplo, Smad2 y Smad3 pueden ser inmovilizadas específicamente cerca de la superficie celular por SARA (Tsukazaki et al., 1998), a través de interacciones entre una secuencia peptídica de SARA y una superficie hidrofóbica extendida en Smad2/Smad3 (Wu et al., 2000). SARA contiene un dominio FYVE de unión a fosfolípidos a través de la cual se ancla a la membrana de endosomas tempranos (Tsukazaki et al., 1998). Estas interacciones permiten un reclutamiento más eficiente de Smad2 o Smad3 hacia los receptores para su fosforilación (Tsukazaki et al., 1998).

La fosforilación de Smad2 unido a SARA ocurre en la membrana plasmática pero es más eficiente en endosomas primarios ricos en SARA en los cuales el complejo del receptor activado es internalizado vía vesículas cubiertas de clatrina (Di Guglielmo et al., 2003; Hayes et al., 2002; Lu et al., 2002).

Otra proteína que contiene un dominio FYVE es Hgs, que coopera con SARA en la señalización de las Smads (Mirura et al., 2000). Recientemente otras proteínas adaptadoras incluyendo a Disabled-2 (Hocevar et al., 2001), axina (Furuhashi et al., 2001), y la ELF β -espectrina (Tang et al., 2003) han sido reportadas que facilitan la señalización del TGF- β mediando la unión de Smad2/Smad3 al receptor. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular de acción de estas proteínas.

2.6.5 Señalización de las proteínas Smads

En estado basal, las R-Smads están localizadas en el citoplasma, mientras que las I-Smad tienden a estar localizadas en el núcleo. Por otro lado, la Co-Smad se distribuye tanto en citoplasma como en núcleo dado que es translocada continuamente a estos dos sitios independientemente de la señalización por TGF- β .

Después del estímulo con TGF- β las R-Smads son fosforiladas directamente por el T β RI activado (Kretzschmar et al., 1997; Macías-Silva et al., 1996). Algunas

líneas de evidencia han demostrado que la fosforilación de las R-Smads tiene lugar en dos residuos de serina del C-terminal dentro del motivo SSXS (Abdollah et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1997). La fosforilación de las R-Smads desestabiliza su interacción con SARA, permitiendo su disociación de este complejo y la subsecuente exposición de una región de importe nuclear en su dominio MH2 (Xu et al., 2000). Además, las R-Smads fosforiladas se asocian con Smad4 y se translocan al núcleo donde interaccionan con factores de transcripción para promover o reprimir la expresión de genes (Chacko et al., 2001) (Fig. 8).

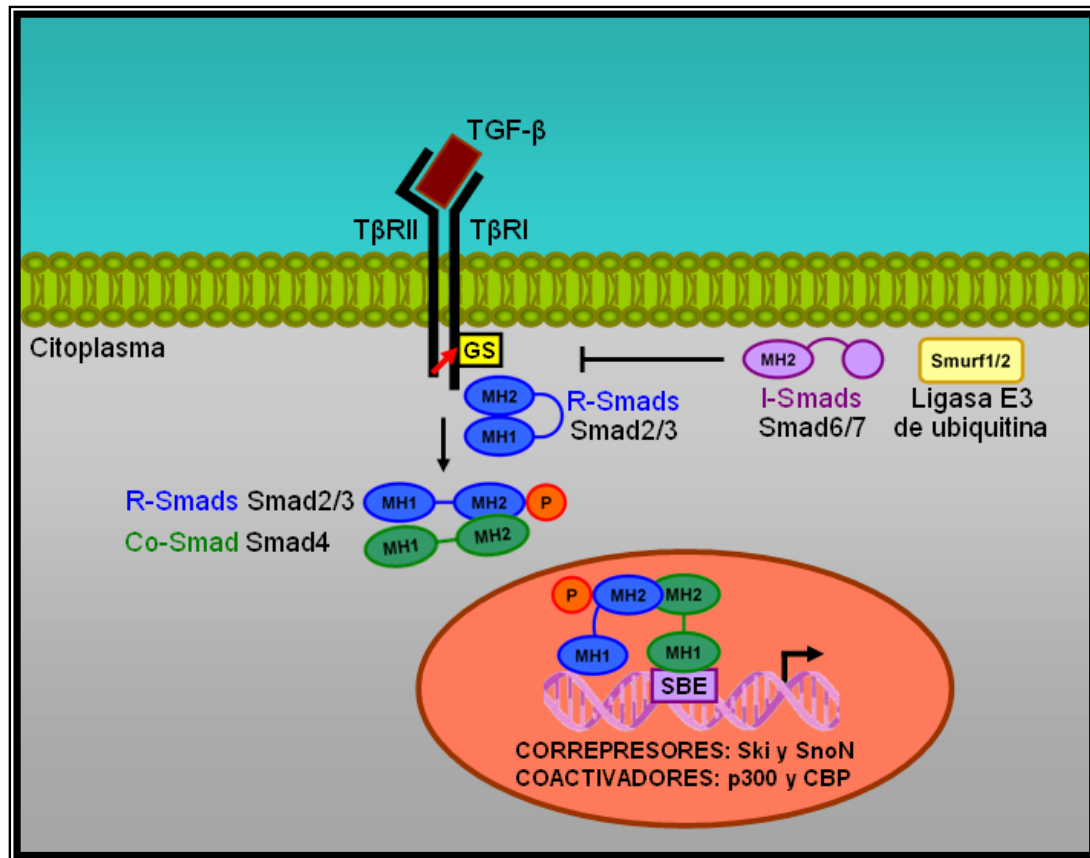


Fig. 8 Mecanismo general de activación del receptor para TGF-β y de las proteínas Smads. En la superficie celular el TGF-β se une su receptor TβRII con actividad de cinasa (Ser/Thr) e induce la transfosforilación en la región GS (en amarillo) del TβRI. El TβRI consecuentemente activado fosforila a las R-Smads (Smad2/3) en su dominio MH2 C-terminal y éstas forman un complejo con la Co-Smad (Smad4). El complejo Smad se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco por su interacción física con el elemento de unión a Smad (SBE, por sus siglas en inglés *S*mad *B*inding *E*lement) y por su interacción con coactivadores o correpresores de la vía del TGF-β como p300 y CBP ó Ski y SnoN, respectivamente. La activación de las R-Smads por el TβRI es inhibida por Smad6/7. Las ligasas E3 de ubiquitina, Smurf1/2 median la ubiquitinación y consecuente degradación de las R-Smads y pueden también interaccionar con Smad7 para ubiquitinar al receptor y mandarlo a degradación vía proteosoma (Modificado de Derynck R, et al., 2003).

El mecanismo de translocación nuclear de las Smads todavía no se conoce con precisión. Por un lado se propone que la hélice H2 en el dominio MH1 podría actuar como un dominio de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés Nuclear Localization Sequences) en Smad1 y 3 dado que la porción C-terminal de ésta es invariante entre todas las R-Smads (Xiao et al., 2000a, 2001). Por otro lado, un mecanismo alternativo para el importe nuclear de las R-Smads ha sido dilucidado por la observación de que el dominio MH2 de éstas se une directamente a componentes del poro nuclear, las nucleoporinas CAN/Nup214 y Nup153 (Xu et al., 2002).

Smad4 y todas las R-Smads, excepto Smad2, se unen al DNA en sitios específicos denominados elemento de unión a Smad (SBE, por sus siglas en inglés Smad Binding Element), a través de un β -hairpin de unión a DNA localizado en su dominio MH1 el cual hace contacto directo con el SBE (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Comparado con las otras Smads, Smad2 contiene una inserción de 30 residuos de aminoácidos entre el β -hairpin y la hélice H2; esta variación en la secuencia ha resultado en la poca habilidad de unión a DNA por parte de Smad2, presumiblemente debido a la interrupción de la conformación del β -hairpin (Shi et al., 1998).

Tanto la activación como la represión de la expresión génica usan la misma serie de proteínas Smads activadas. Cualquier tipo de respuesta depende del tipo celular y de las proteínas de asociación a Smad. Entre los reguladores negativos de la función transcripcional de las Smads se encuentran c-Ski y SnoN, miembros de la familia de protooncoproteínas Ski. Ski o SnoN antagonizan la señalización del TGF- β a través de interacciones directas con Smad4 y las R-Smads (Liu et al., 2001; Wang et al., 2000). El mecanismo de represión de la señalización del TGF- β mediada por Ski fue principalmente atribuida a la modulación transcripcional, a través del reclutamiento del correpresor transcripcional nuclear (N-CoR) y desacetilasas de histona (HDAC) así como la interferencia en la unión mediada por Smads hacia los coactivadores transcripcionales, p300/CBP (Liu et al., 2001). Un mecanismo adicional fue aportado por la reciente estructura de Smad4 unida a c-Ski, el cual revela un solapamiento entre Ski y la superficie de unión de las R-Smads en Smad4 (Wu et al., 2002). Entonces, Ski compite con las R-Smads por la interacción con Smad4 e interrumpe la formación de un complejo funcional entre Smad4 y las R-Smads. Dado que Ski contiene elementos de secuencia de interacción para ambas proteínas, tanto Smad4 como las R-Smads pueden permanecer adheridas a Ski una

vez que se ha interrumpido el complejo funcional (Luo et al., 1999; Stroschein et al., 1999; Wu et al., 2002).

Las Smads pueden también unirse al correpresor transcripcional TGIF (Wotton et al., 1999a), el cual recluta HDAC y otros represores vía la proteína adaptadora Sin3 y CtBP para reprimir la transcripción (Wotton et al., 2001; 1999a, 1999b). Al igual que Ski y SnoN, TGIF se piensa que actúa como un inhibidor de la activación de genes dependiente de TGF- β .

Por otro lado, el dominio MH2 tanto de las R-Smads como de Smad4 interacciona con los coactivadores transcripcionales CBP, p300, ARC105 y Smif (Bai et al., 2002; Derynck et al., 1998; Kato et al., 2002; Massagué and Wotton, 2000). Por tanto, es interesante conocer cómo las proteínas Smads conducen a la activación o represión de la expresión génica en la misma célula, al mismo tiempo dependiendo del gen blanco, de sus proteínas de asociación y del tipo celular.

2.6.6 Terminación de la señalización de las Smads

La defosforilación de las Smads por fosfatasa aún no identificadas (Randall et al., 2002), así como la ubiquitinación y degradación vía proteosoma de las R-Smads activadas son mecanismos para la terminación de la señal de las Smads. Smurf1 ubiquitina a Smad1 y Smad5 para su degradación en células no estimuladas (Zhu et al., 1999). Esta función puede ser importante para mantener el estado basal de estas células. Por otro lado, Smad2 fosforilada es ubiquitinada en el núcleo y degradada vía el proteosoma (Lo and Massagué, 1999), proceso que puede implicar a Smurf2 (Lin et al., 2000; Zhang et al., 2001). La ubiquitinación de Smad3 fosforilada parece estar mediada por una ligasa E3 diferente (Fukuchi et al., 2001). Smurf1 y 2 también median la ubiquitinación de receptores de TGF- β activados conduciendo a su degradación vía proteosoma (Ebisawa et al., 2001; Tajima et al., 2003).

Las proteínas I-Smads, Smad6 y Smad7, son las encargadas de regular negativamente la señal de BMP y TGF- β , respectivamente. La proteína Smad6 forma complejos con Smad4 y evita que se asocie con Smad1, una R-Smad que es activada de manera similar a Smad2/3 pero que pertenece a la vía de las BMPs, resultando en la inhibición de esta señal. El mecanismo de inhibición por Smad7 es diferente, ya que por un lado se une directamente a los receptores activos para TGF- β , compitiendo así con Smad2/3 por el receptor y evitando que éstas sean

fosforiladas. Por otro lado, Smad7 puede formar complejos con Smurf2 y unirse a los receptores activos para TGF- β , los cuales son ubiquitinados y enviados a degradación vía proteosoma. En ambos casos el resultado final será la regulación negativa de la vía de señalización del TGF- β (Briones Orta, 2006).

2.7 Importancia de la comunicación cruzada entre la vía de señalización del TGF- β y la del CaR

El TGF- β puede ser considerado como el prototipo de una citocina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes blancos celulares. Es el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mielóide, mesenquimal, epitelial, linfóide, endotelial y de varios tipos de células malignas. Dado que la señalización del TGF- β generalmente tiene un efecto negativo en la proliferación celular, la inactivación de esta ruta de señalización contribuye al desarrollo de procesos tumorigénicos (Peralta Zaragoza et al., 2001).

Ahora bien, la importancia de estudiar una comunicación cruzada entre la vía de señalización del TGF- β y la del CaR radica en que en el hiperparatiroidismo primario o un desorden endocrino caracterizado por hipercalcemia, causada por una secreción excesiva de la PTH, que puede deberse a adenomas de la paratiroides, a hiperplasia de la glándula paratiroidea o a carcinomas de la paratiroides, los pacientes con hipocalcemia familiar autosómica dominante, causada por mutaciones en el CaR, también presentan hiperparatiroidismo primario, que la proliferación de las células paratiroides y la secreción de la PTH es regulada de manera autócrina y parácrina por el TGF- β , y que la pérdida de la señalización mediada por el TGF- β , debido a la inactivación de la menina, contribuye de manera significativa con la tumorigénesis de la glándula paratiroidea. Nosotros suponemos que la regulación de la secreción hormonal y otros procesos celulares mediados por el CaR se pudieran estar llevando a cabo mediante la regulación de otras vías. De igual forma, teniendo en cuenta que los mecanismos moleculares de activación, inhibición o modulación de la transducción de señales promovidas por el CaR no se han definido completamente, ni se ha podido entender cómo mutaciones encontradas en este receptor llevan al desarrollo de enfermedades en los humanos. Consideramos que la búsqueda de mecanismos de comunicación cruzada con otros receptores, como por ejemplo con el de TGF- β , capaces de modular las funciones del CaR, proveerá de información que ayudará a entender las acciones y regulación de este receptor. Nuestros estudios serán el punto de partida para ir estableciendo la identidad de

redes de acción intracelular que permitan entender cómo las señales transmitidas por el CaR son integradas a nivel celular y será el inicio de una investigación que podría contribuir en un futuro a encontrar posibles blancos terapéuticos que contrarresten el desarrollo de estas patologías.

III. ANTECEDENTES

La glándula paratiroides es un órgano interesante. Esta glándula reacciona únicamente cuando la concentración de calcio en el fluido extracelular (ECF, por sus siglas en inglés, Extracellular Fluid) está por debajo de la concentración normal, secretando la PTH que, como consecuencia de su acción, estabiliza dicha concentración. Por otro lado, cuando la concentración de calcio está por encima de su nivel normal, una cascada de señalización intracelular conlleva a la degradación >90% de la PTH, evitando así su secreción (Silver J et al., 2002).

La PTH es una potente hormona para el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis. Sin embargo, cuando está presente en exceso destruye huesos, particularmente en pacientes con falla renal crónica e hiperparatiroidismo secundario (Silver J et al., 2002).

En el hiperparatiroidismo secundario hay una baja regulación del CaR sobre la inhibición de la secreción de la PTH, a pesar de que la concentración de calcio esté por encima del nivel normal en el ECF. Esto también ocurre en otras situaciones, tal como es el caso de los adenomas primarios así como en ratas transgénicas donde se sobreexpresa la ciclina D1, molécula clave que promueve proliferación celular, causando esta misma patología. Por lo tanto, la expresión y actividad del CaR es determinante para la función celular de la paratiroides, y su regulación es importante para el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario (Silver J et al., 2002).

Las células de la paratiroides se dividen de modo poco frecuente, sin embargo, éstas retienen en latencia esta habilidad para proliferar. El hiperparatiroidismo primario puede ser debido a mutaciones inactivantes en un gen supresor de tumores tales como el gen MEN1, codificante para la menina. Mutaciones en el gen MEN1 están asociadas con el 20% de adenomas desarrollados en la paratiroides. Otros adenomas de la paratiroides se han asociado con translocaciones en el promotor del gen codificante para la ciclina D1, causando una proliferación excesiva de las células paratiroides (Silver J et al., 2002).

Tal como se mencionó anteriormente, la importancia de la comunicación cruzada entre las vías de señalización del CaR y la del TGF- β radica en que ambos receptores se expresan en la glándula paratiroides y además, ambos regulan negativamente la proliferación celular y secreción de la PTH, la atenuación de la señalización de un receptor por efecto de la activación del otro podría causar la

proliferación inadecuada de las células de la paratiroides y, probablemente, contribuir al desarrollo de procesos tumorigénicos en esta glándula. Sin embargo, hasta el momento no existe un solo reporte en el que se haya demostrado un mecanismo de comunicación cruzada entre el receptor para TGF- β y el CaR, pero sí hay reportes que sugieren que dicho mecanismo podría llevarse a cabo por lo que se mencionarán algunos ejemplos.

En 2000 y 2001, el grupo de Edward M. Brown demostró que el CaR se expresa en líneas celulares de cáncer de mama y próstata, respectivamente, y que la activación de éste regula la secreción del péptido relacionado con la PTH (PTHrP, por sus siglas en inglés, PTH-related Protein). Además, demostraron que la secreción del PTHrP no sólo es regulada positivamente por el CaR sino también por el TGF- β , y que ambos actúan de manera sinérgica en este mismo proceso. También se da la hipótesis de que ambos receptores podrían cooperar en un mecanismo de retroalimentación en el que la secreción del PTHrP media procesos de erosión esquelética, característica distintiva de pacientes con cáncer de próstata (Sanders JL et al., 2000; Sanders JL et al., 2001).

En 2007 el grupo de John MacLeod demostró que líneas celulares de miofibroblasto de colon expresan el CaR y sintetizan y secretan BMP-2 en respuesta a la activación de éste. Por otro lado, también demostraron que la activación del CaR regula negativamente la producción de noggina, antagonista del receptor para BMPs (BMPR), y disminuye la producción de la BMP4. Se piensa que la activación del CaR en células de miofibroblasto de colon puede mediar procesos de homeostasis intestinal, principalmente promoviendo la función de barrera del intestino, lo cual concuerda con estudios recientes en los que se ha demostrado que la BMP2 está presente en colon humano de personas adultas donde probablemente inhibe la proliferación celular o incrementa la apoptosis (Hardwick JCH et al., 2004, Peiris D et al., 2007).

Por otro lado, en 2004 el grupo de Kazuo Chihara demostró por primera vez que el TGF- β se expresa en la glándula paratiroides, predominantemente en células endocrinas, y que éste regula negativamente la proliferación celular y producción de la PTH en estas células. En este caso el TGF- β y los componentes de su vía de señalización, que median esta función como regulador negativo de crecimiento, pueden ser considerados como supresor de tumores. Entonces, el bloqueo de la señalización del TGF- β puede afectar el estado celular delicadamente balanceado,

dirigiéndolo hacia un inapropiado crecimiento que eventualmente resulta en la formación o progresión de tumores y en la consecuente producción desregulada de la PTH. Este estudio es el primero que demuestra que el TGF- β inhibe la producción y secreción de la PTH en células de la paratiroides (Sowa et al., 2004).

En este trabajo también se da la hipótesis de que la menina puede estar implicada en las acciones antiproliferativas del TGF- β en células de la paratiroides. Primero se demostró que la expresión de la menina fue inducida rápidamente por el TGF- β en cultivos primarios de células de la paratiroides. Enseguida se mostró que la inactivación de la menina revierte la inhibición de la proliferación celular y secreción de la PTH inducida por el TGF- β . Finalmente, el grupo de Geoffrey Hendy determinó que la menina interacciona físicamente con Smad3, dado que ambas proteínas coinmunoprecipitan, pero no con Smad2 ni Smad4. Por otro lado, demostró que la interacción de la menina con Smad3 se da en el núcleo y que la región MH2 de Smad3 y el extremo N-terminal de la menina son esenciales para dicha interacción (Kaji H et al., 2001).

Estos datos demuestran que la menina es esencial para la señalización inducida por TGF- β en células de la paratiroides, y sugiere que la pérdida de la función de esta vía de señalización por inactivación de la menina puede resultar en el desarrollo de procesos tumorigénicos en la glándula paratiroides. Este conjunto de datos sugieren al TGF- β como un nuevo blanco terapéutico para patologías como hiperparatiroidismo (Sowa et al., 2004).

En 2004 el grupo de A. Spada demostró la relación existente entre la expresión de la ciclina D1, molécula clave que promueve la progresión a través de la fase G1-S del ciclo celular, y reguladores de crecimiento celular tales como bFGF, EGF y TGF- β , y señales específicas en la paratiroides como la activación del CaR. Este grupo demostró que la activación de los receptores para bFGF (FGFR1 y R2) y EGF incrementa significativamente la expresión de la ciclina D1 por un mecanismo que, al menos en parte, está mediado por ERK1/2. Sin embargo, el incremento en la expresión de la ciclina D1 por bFGF y EGF fue bloqueado tras la activación del CaR (Corbetta et al., 2004).

Demostraron también que el TGF- β redujo efectivamente la expresión de la ciclina D1 en la mayoría de células de tumor de paratiroides, lo cual concuerda con los conocidos efectos antiproliferativos de esta citosina. Sin embargo, en dos casos

en el que se activó al CaR el TGF- β fue incapaz de reducir la expresión de la ciclina D1 (Corbetta et al., 2004).

Estos últimos datos sugieren un posible efecto de la activación del CaR sobre el receptor para TGF- β , lo cual conlleva un incremento en la expresión de la ciclina D1. Por otro lado, está demostrado que la ciclina D1 interacciona directamente con la menina y que ésta inhibe a la ciclina D1 (Sowa et al., 2004).

IV. HIPÓTESIS

Considerando que:

1. al igual que el CaR, el TGF- β regula positivamente la expresión del PTHrP y que ambos receptores actúan de manera sinérgica en este proceso, y que
2. el TGF- β y el CaR regulan negativamente la producción de la PTH y la proliferación celular en la glándula paratiroides,

entonces, existe un mecanismo de comunicación cruzada entre el receptor sensor de calcio extracelular y el receptor para TGF- β .

V. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente proyecto es determinar la influencia de la vía de señalización del CaR en las funciones del receptor para TGF- β . Para ello, se pretenden alcanzar los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar la comunicación cruzada entre la vía de señalización del CaR y la vía del TGF- β .
2. Determinar la participación de mutantes activantes e inactivantes del CaR en la comunicación cruzada entre la vía de señalización del CaR y la del TGF- β .
3. Analizar la fosforilación de las proteínas Smad2 en presencia del CaR activado.
4. Analizar la expresión de genes blanco de la vía del TGF- β en presencia del CaR activado.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de células HEK293

Se utilizó como modelo celular la línea HEK293 (Human Embryonic Kidney-293), obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC: Manassas, VA) para todos los experimentos. Estas células provenientes de riñón de embrión humano (*Homo sapiens*) (Fig.9), fueron cultivadas en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (GIBCO) suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y 10% (v/v) de suero bovino fetal (SFB) (PAA Foetal Bovine Serum, Orig. Canada), e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂* (NUAIRE™US AUTOFLOW).

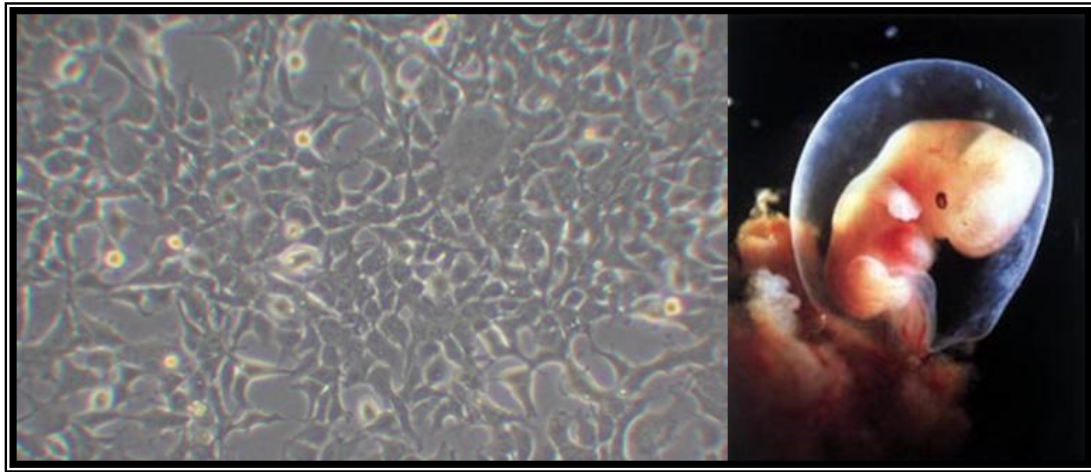


Fig. 9 Células HEK293. En el panel izquierdo se puede observar la morfología estrellada de las células HEK293, provenientes de riñón de embrión humano (*Homo sapiens*) (panel derecho).

Para las transfecciones transitorias las células fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro con una confluencia de 80%, y después de 24 horas se resembraron en cajas de 6 cm para los ensayos de luciferasa y RT-PCR del gen *smad7*, y en cajas de 10 cm para la detección de Smad2 fosforilada con una confluencia del 70-85% para el día del experimento.

Los experimentos fueron realizados 48 horas post-transfección en todos los casos.

6.2 Transfección

La transfección transitoria de las células HEK293 se realizó por el método de lipofectamina, técnica de liposomas catiónicos en la cual se mezclan vesículas lipídicas con los plásmidos de interés codificantes para la proteína requerida. Esta

* Las condiciones de incubación son las mismas en todos los casos.

técnica permite que los plásmidos queden “encapsulados” en las vesículas, y éstas últimas, por su hidrofobicidad, se fusionan con la membrana plasmática de la célula y permiten la introducción del plásmido al medio intracelular.

En todos los casos la transfección se realizó en DMEM sin SFB, usando Lipofectamine Reagent (Invitrogen) y los plásmidos CaR WT*, L125P* (mutante parcialmente activa del CaR), E297K* (mutante inactiva del CaR), 3TP-lux** (codificante para la luciferasa), β -galactosidasa** (codificante para la β -galactosidasa) y pCR3.1* (vector sin inserto), según sea el caso.

Para los ensayos de la actividad de la luciferasa las células fueron transfectadas según los siguientes parámetros:

Vector	Cantidad
CaR WT, L125P ó E297K	1.2 μ g
3TP-lux	0.24 μ g
β -galactosidasa	0.12 μ g
pCR 3.1	Variable
Cantidad total 4.2 μ g	

Tabla 1. Vectores utilizados para los ensayos de la actividad de la luciferasa.

Para los ensayos de RT-PCR del gen *smad7* las células fueron transfectadas con 1.2 μ g de CaR WT, L125P, E297K o pCR 3.1, según sea el caso, mientras que para los ensayos de detección de Smad2 fosforilada se transfectaron con 4 μ g.

El método de transfección seguido fue el siguiente:

- 01.-) Diluir cada vector en 480 μ l de DMEM sin SFB.
- 02.-) Preparar una solución de lipofectamina. Por cada vector a transfectar agregar 18 μ l de lipofectamina en 480 μ l de DMEM sin SFB. Resuspender muy bien.
- 03.-) Agregar la solución de lipofectamina al respectivo tubo con el vector a transfectar. Incubar por 30 min a temperatura ambiente.
- 04.-) Retirar con vacío el medio DMEM 10% SFB de las células a transfectar. Lavarlas con PBS 1X (Buffer de fosfatos casero que contiene NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄O 10 mM y KH₂PO₄O 2 mM, con un pH de 7.4) y agregar 2 ml de DMEM sin SFB a cada caja.
- 05.-) Agregar la solución de transfección a cada caja. Agitar en cruz.
- 06.-) Dejar transfectando durante 6 horas a 37°C.
- 07.-) Recuperar las células con DMEM 10% SFB. Las cajas de 6 cm se recuperaron con 3 ml, mientras que las cajas Petri de 10 cm se recuperaron con 5 ml.

* Plásmidos obtenidos del laboratorio de la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, CINVESTAV-Zacatenco, IPN, México, DF.

** Plásmidos obtenidos del laboratorio de la Dra. Marina Macías Silva, IFC, UNAM, México, DF.

6.3 Ensayo de la actividad de la luciferasa

Para determinar el efecto de la activación del CaR en la actividad transcripcional de la vía del TGF- β por ensayos de la actividad de la luciferasa se transfectaron células con los plásmidos correspondientes. 24 horas después las cajas de 6 cm se dividieron en cajas de 24 pozos cubiertas previamente con fibronectina (FN) [20 $\mu\text{g/ml}$] (Calbiochem), de acuerdo al siguiente método:

- 01.-) Preparar la solución de fibronectina [20 $\mu\text{g/ml}$] y agregar 350 μl a cada pozo. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 02.-) Retirar con vacío el medio DMEM 10% SFB de cada una de las cajas de 6 cm. Lavarlas con PBS 1X.
- 03.-) Agregar 0.5 ml de tripsina por cada caja. Incubarlas de 3-5 min a 37°C.
- 04.-) Agregar 11.5 ml de DMEM 10% SFB a cada caja para neutralizar la tripsina. Resuspender muy bien.
- 05.-) Tomar 6 ml del inóculo y agregarlos a 6 ml de DMEM 10% SFB.
- 06.-) Sembrar 1 ml de inóculo en cada pozo. Incubar a 37°C hasta el siguiente día.
- 07.-) Ayuno de suero. Retirar el DMEM 10% SFB, lavar con PBS 1X y agregar 1 ml de DMEM sin SFB a cada pozo. Incubar a 37°C por 6 horas.
- 08.-) Ayuno de calcio. Retirar el DMEM sin SFB de cada pozo y agregar 1 ml de DMEM sin SFB suplementado con 0.5 mM CaCl_2 . Incubar a 37°C por 1 hora.
- 09.-) Estímulo con calcio. Emplear dos concentraciones de CaCl_2 (Quality Biological, INC.), 0.5 y 4 mM, donde 0.5 mM CaCl_2 no activa al CaR pero permite que las células se mantengan adheridas a su sustrato, mientras que 4 mM CaCl_2 sí activa al CaR. Incubar 1 hora a 37°C.
- 10.-) Estímulo con TGF- β . Estimular con 100 pM de TGF- β (Peprtech). Incubar 16 horas a 37°C.
- 11.-) Obtención de lisados celulares. Preparar buffer de lisis 1X (Promega Cat. #E397A) y mantener a 4°C. Retirar el medio de cultivo de las cajas de 6 cm y lavarlas con PBS 1X. En una cama de hielo, agregar 50 μl de buffer de lisis 1X a cada caja. Una vez obtenidos los lisados guardarlos a -70°C (Forma Scientific) hasta el momento de su análisis.
- 12.-) Medición de la expresión de la proteína β -galactosidasa. En una caja de 96 pozos agregar 10 μl de la muestra más 90 μl de la solución MIX8 (ver anexo). Incubar la caja a 37°C durante 15 min aproximadamente o hasta que la solución se

torne en un color amarillo claro. Analizar la expresión de la β -galactosidasa en un lector de ELISA (Problot6 hybridization oven) a una longitud de onda de 415 nm.

13.-) Análisis de la actividad de la proteína luciferasa. En un tubo de 1.5 ml agregar 25 μ l del sustrato de la luciferasa (Promega) a 5 μ l de lisado celular. Dicho análisis se hace por luminometría (20/20n luminometer turner biosystems).

6.4 Detección de Smad2 fosforilada por Western Blot

Para determinar el efecto de la activación del CaR en la fosforilación de las proteínas Smad2, las células se transfectan y 24 horas después se les cambia el medio de cultivo por 10 ml de DMEM 10% SFB, manteniéndolas en incubación hasta el siguiente día. La detección de Smad2 fosforilada por inmunoprecipitación y Western Blot se realiza en base al siguiente método:

01.-) Ayuno de suero y calcio. Retirar el DMEM 10% SFB, lavar con PBS 1X y agregar 10 ml de DMEM sin SFB suplementado con 0.5 mM CaCl_2 . Incubar 16 horas a 37°C. Al cabo de las 16 horas retirar 5 ml de medio de cultivo para realizar los estímulos en un volumen final de 5 ml.

02.-) Estímulo con calcio. Estimular las células con 4 mM CaCl_2 (Quality Biological, INC.), o tratarlas con 0.5 mM CaCl_2 , según sea el caso, para que las células se mantengan adheridas a su sustrato. Incubar 1 hora a 37°C.

03.-) Estímulo con TGF- β . Estimular las células con 200 pM de TGF- β (Peprotech). Incubar 30 min a 37°C.

04.-) Obtención de lisados celulares. Adicionar a las células 1 ml de buffer de lisis B frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, leupeptina 1 μ g/ μ l y aprotinina 1 μ g/ μ l; inhibidores de fosfatasa: β -glicerofosfato 10 mM, NaF 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM). Mantener las muestras en hielo todo el tiempo. Raspar las cajas y transferir el líquido a tubos de 1.5 ml. Incubar los tubos 15 min a 4°C en agitación y luego centrifugarlos a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R) por 5 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a tubos de 1.5 ml. Evitar el pellet.

05.-) Cuantificar la concentración de proteína de los extractos. Para cada inmunoprecipitación usar 0.5 mg o hasta 2 mg de proteína.

06.-) Añadir 2 μ l del anticuerpo específico (α -Smad2/3 (N-19): sc-6032; en cabra, Santa Cruz) a cada tubo. Incubar en el rotador toda la noche a 4°C.

07.-) Añadir 50 μ l de gamma bind (Millipore).

- 08.-) Incubar en el rotador a 4°C por 2 horas, no por más tiempo.
- 09.-) Centrifugar los tubos a 14,000 rpm por 10 seg.
- 10.-) Descartar el sobrenadante y lavar el pellet 3 veces con 1 ml de buffer de lisis B frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Entre cada lavado centrifugar los tubos a 14,000 rpm por 10 seg descartando el sobrenadante.
- 11.-) Después del último lavado centrifugar los tubos a 14,000 rpm por 10 seg y remover el exceso de líquido con vacío, cuidando de no remover la agarosa.
- 12.-) Resuspender cada muestra en 30 µl de buffer de muestra, de solución Laemmli (SDS-protein gel loading solution Quality Biological, INC + β-mercaptoetanol + agua).
- 13.-) Hervir las muestras de 3-5 min, dejar enfriar y guardar a -20 o -70°C, o inmediatamente cargar el sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 6% después de centrifugarlas 1 min a 14,000 rpm. Correr el gel a 30 mA por aproximadamente 1 hora.
- 14.-) Transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en cámara de transferencia húmeda a 320 mA por 2.5 horas (SIGMA, Chemical CO).
- 15.-) Bloquear los blots con leche libre de grasa (Svelty) al 5% en TBS-Tween (TBS-T, Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0.1%, pH 7.5).
- 16.-) Para la inmunodetección de las proteínas de interés las membranas se incuban con los anticuerpos primarios específicos (tabla 2) durante toda la noche a 4°C.

Proteína a detectar	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
P-Smad2	α-P-Smad2 (Chemicon)	1:1,000	α-rabbit (KPL)	1:10,000
Smad2/3	α-Smad2/3 (Santa Cruz)	1:1,000	α-goat (Jackson)	1:20,000
CaR WT o E297K	α-ADD	1:5,000	α-mouse (KPL)	1:10,000

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios y secundarios para la detección por Western Blot de Smad2 fosforilada.

- 17.-) Al día siguiente, las membranas se lavan tres veces con TBS-T 0.1% durante 15 min por cada lavado, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 2) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 18.-) Las proteínas de interés se detectan con un kit de inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia (Millipore Immobilon Western), siguiendo las indicaciones del fabricante, y son reveladas en cuarto oscuro con reactivos Kodak.
- 19.-) Las bandas obtenidas se cuantifican con el programa Imagen versión 1.40g.

6.5 RT-PCR del gen *smad7*

Para determinar el efecto de la activación del CaR sobre la expresión del gen *smad7* las células para experimentos de RT-PCR del gen *smad7* se cultivan en cajas de 6 cm, se transfectan y 24 horas después se les cambia el medio de cultivo por 5 ml de DMEM 10% SFB manteniéndolas en incubación hasta el siguiente día. El método seguido para los experimentos de RT-PCR es el siguiente:

01.-) Ayuno de suero. Las células se ayunan de suero con 3 ml de DMEM sin SFB. Incubar a 37°C por 4 horas.

02.-) Ayuno de calcio. Las células se ayunan de calcio con 2 ml de DMEM sin SFB suplementado con 0.5 mM CaCl₂. Incubar a 37°C por 1 hora.

03.-) Estímulo con calcio. Estimular las células con 4 mM CaCl₂ (Quality Biological, INC.), o tratarlas con 0.5 mM CaCl₂, según sea el caso, para que las células se mantengan adheridas a su sustrato. Incubar 1 hora a 37°C.

04.-) Estímulo con TGF-β. Estimular las células con 300 pM de TGF-β (Peprotech). Incubar 2 horas a 37°C.

05.-) Obtención de lisados celulares. A partir de este paso es indispensable usar guantes y limpiar todo el material con una solución de RNAsas. Agregar 1 ml del reactivo TRIZOL (Invitrogen) a cada caja de Petri de 6 cm. Mantener las muestras en hielo. Incubarlas 5 min. Resuspender el líquido durante 5 min para terminar de lisar las células. Junto con la resuspensión hay que girar la caja para lisar el mayor número de células. Transferir los lisados celulares a tubos de 1.5 ml nuevos y estériles. Congelar las muestras a -70°C.

06.-) Aislamiento del RNA total.

- Descongelar las muestras a temperatura ambiente.
- Agregarles 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIZOL de la muestra. Agitar fuertemente durante 15 seg.
- Dejar las muestras a temperatura ambiente durante 2-3 min.
- Centrifugar las muestras a 12,000 rpm por 15 min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio y estéril de 1.5 ml. No tocar la interfase blanca, en caso de hacerlo volver a centrifugar.
- Agregar 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIZOL de la muestra. Mezclar levemente. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar las muestras a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Desechar el sobrenadante.

- Añadir 1 ml de etanol al 75% (preparado con H₂O/DEPC) por cada ml de TRIZOL de la muestra. Despegar el pellet golpeando suavemente el tubo con los dedos.
- Centrifugar las muestras a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Remover el sobrenadante cuidadosamente.
- Añadir 1 ml de etanol al 75% (preparado con H₂O/DEPC) por cada ml de TRIZOL de la muestra.
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Dejar secar el pellet de 5-10 min a temperatura ambiente.
- Homogeneizar el pellet con 20 µl de H₂O/DEPC.
- Calentar las muestras a 60°C durante 5 min. Posteriormente dejar enfriar en hielo.
- Cuantificar las muestras por espectrometría (BECKMAN DU® 650). Se realiza una dilución 1:500 y se lee a una longitud de onda de 260 nm. Calcular el volumen que contenga 5 µg de RNA total.

07.-) Transcripción Reversa. Una vez aislado el RNA total de cada una de las muestras se procedió a realizar la síntesis del cDNA de cada una de éstas, para lo cual se utilizó la enzima M-MVL RT (Invitrogen). Los componentes utilizados para hacer la RT fueron los siguientes:

Componente	Cantidad
RNA	5 µg
Hexámeros	1 µl
dNTP's	1 µl
Buffer 5X	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl
M-MVL RT	1 µl
H ₂ O/DEPC	Variable
Volumen total 19 µl	

Tabla 3. Componentes para la síntesis de cDNA de los genes *β-galactosidasa* y *smad7*.

- Calentar las muestras a 65°C durante 5 min y después poner los tubos en hielo.
- Agregar a cada uno de los tubos 4 µl de buffer 5X y 2 µl de DTT 0.1 M. Mezclar muy bien.
- Incubar las muestras a 42°C durante 2 min.
- Agregar 1 µl de le enzima M-MLV a cada una de las muestras. Mezclar muy bien.
- Incubar las muestras 10 min a 25°C.
- Incubar las muestras 50 min a 37°C.

- Incubar las muestras 15 min a 70°C.
- Guardar las muestras a -20°C hasta el momento de realizar la PCR.

08.-) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Una vez realizada la transcripción reversa se procedió a amplificar los cDNA obtenidos por la técnica de la PCR. Las PCRs se realizaron con los cDNA como molde y oligonucleótidos específicos para los genes *smad7* (Sigma) y β -*actina* (Sigma). En la PCR se utilizó la polimerasa REDTaq (SIGMA, Jump Start™ REDTaq® ReadyMix PCR Reaction Mix). Los componentes utilizados, así como sus cantidades, para realizar la PCR fueron los siguientes:

Componente	Cantidad
Ready Mix	12.5 μ l
Oligonucleótido sentido (gcc ctc tct gga tat ctt ct)	1 μ l
Oligonucleótido antisentido (gct gca taa act cgt ggt ca)	1 μ l
DMSO	2.5 μ l
H ₂ O	5.5 μ l
cDNA	2.5 μ l

Tabla 4. Componentes para la amplificación de los cDNA de los genes β -galactosidasa y *smad7*.

- Amplificación del gen *smad7*. Las condiciones para la amplificación del gen *smad7* son 1 min a 95°C de desnaturalización, 1 min a 55°C de alineamiento y 1 min a 72°C de elongación, con 32 ciclos de amplificación.
- Amplificación del gen β -*actina*. Las condiciones para la amplificación del gen β -*actina* son 30 seg a 94°C de desnaturalización, 30 seg a 55°C de alineamiento y 1 min a 72°C de elongación, con 25 ciclos de amplificación.
- Correr las muestras en geles de agarosa al 1.5%.

6.6 Análisis de resultados

Con una $n \geq 3$, los experimentos fueron evaluados en porcentajes y posteriormente analizados en el programa PRISM, versión 4.0 (Software, Inc., San Diego CA) para ser graficados. En este mismo programa se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía, tomando como diferencias significativas a $p \leq 0.05$. En los casos en los que esta prueba fue significativa, se hizo un análisis usando la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls para determinar las diferencias individuales entre grupos.

VII. RESULTADOS

7.1 La activación del CaR disminuye la actividad transcripcional de la vía de señalización del TGF- β

Se realizaron experimentos para determinar si la activación del CaR tenía algún efecto sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β . Por medio de ensayos de la actividad de la proteína luciferasa, empleando como gen reportero el 3TP-lux, se determinó la atenuación de la vía del TGF- β por la activación del CaR como lo muestra la figura 10. Cuando el CaR WT es estimulado con 4 mM CaCl₂ por 1 hora la actividad transcripcional de la vía del TGF- β disminuye significativamente. Por otro lado, se encontró que la simple presencia del CaR WT, tratado con 0.5 mM CaCl₂ por 1 hora, tiene el mismo efecto sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β aunque en menor magnitud.

Por otro lado, para demostrar que la atenuación observada se debía al efecto de la activación del CaR y no a la presencia de 4 mM CaCl₂ que pudiera estar activando otras proteínas como canales o ATPasas, procedimos a realizar experimentos con la L125P, mutante constitutivamente activa del CaR. Nuestros resultados demuestran que la activación de la mutante L125P por 1 hora presentó el mismo efecto atenuante observado en el CaR WT sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β , como se muestra en la figura 11. Finalmente, para no dejar duda que la activación del CaR atenúa la actividad transcripcional promovida por el TGF- β nos dimos a la tarea de realizar experimentos con la E297K, mutante inactivante del CaR. Nuestros resultados indicaron que la actividad transcripcional de la vía del TGF- β no se ve afectada por este receptor mutante a pesar de ser tratado con 4 mM CaCl₂ por 1 hora, tal como lo muestra la figura 12. A diferencia del CaR WT, la simple presencia de la L125P y de la E297K no afectó la actividad transcripcional de la vía del TGF- β . Al realizar la gráfica comparativa entre el efecto atenuante ejercido por el CaR WT y la L125P no se encontraron diferencias significativas, es decir, ambos receptores disminuyen en la misma magnitud la actividad transcripcional de la vía de señalización del TGF- β (Figura 13).

Este conjunto de datos demuestran que para que se lleve a cabo la efectiva atenuación de la vía del TGF- β se requiere la presencia y activación del CaR.

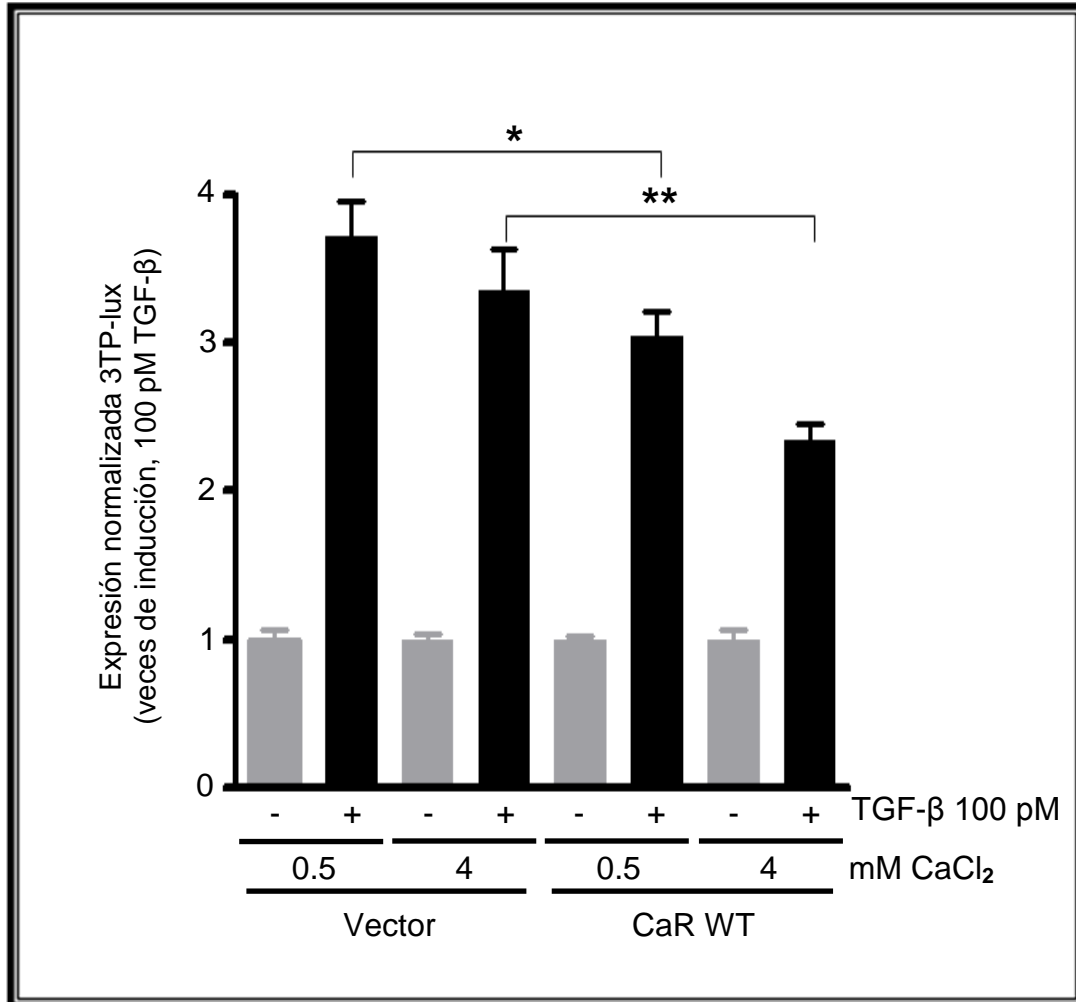


Fig. 10 Efecto de la activación del CaR WT en la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. El gen reportero de la vía del TGF-β, 3TP-lux, y el CaR fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 0.5 y 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente, con 100 pM de TGF-β por 16 horas en donde se indica (barras negras). Se observa que el CaR WT activado, estimulado con 4 mM CaCl₂, disminuye significativamente la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. Por otro lado, el CaR WT en estado inactivo, tratado con 0.5 mM CaCl₂, de igual manera disminuye la actividad transcripcional de la vía del TGF-β aunque en menor magnitud. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA comparando todas las condiciones contra la actividad transcripcional del control estimulado con TGF-β.

* p < 0.01, **p < 0.001, n = 18.

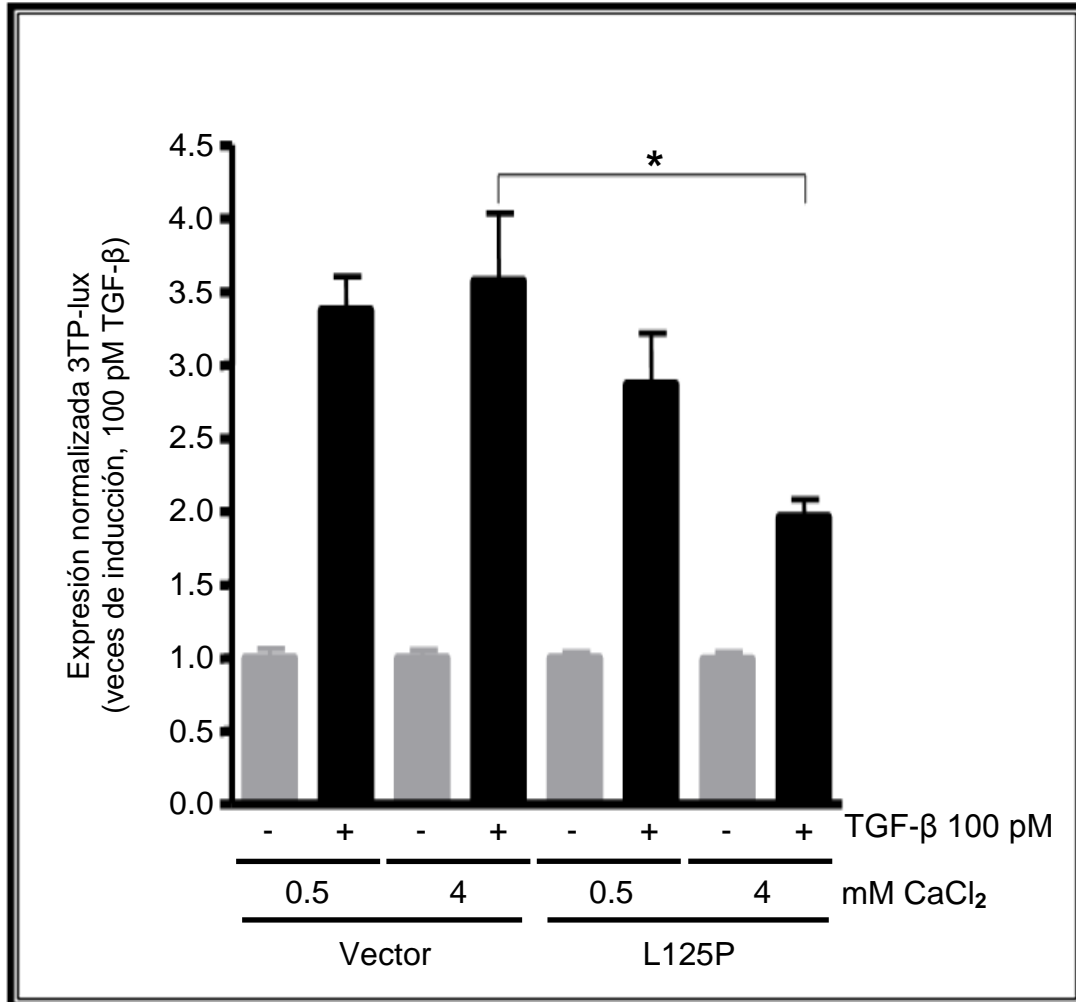


Fig. 11 Efecto de la activación de la L125P en la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. El gen reportero de la vía del TGF-β, 3TP-lux, y la L125P, mutante constitutivamente activa del CaR, fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 0.5 y 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente, con 100 pM de TGF-β por 16 horas en donde se indica (barras negras). Se observa que la L125P, estimulado con 4 mM CaCl₂, disminuye significativamente la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. Sin embargo, a diferencia del CaR WT, la simple presencia de la L125P no afectó la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. Con los datos obtenidos se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA comparando todas las condiciones contra la actividad transcripcional del control estimulado con TGF-β.

* p < 0.001, n = 9.

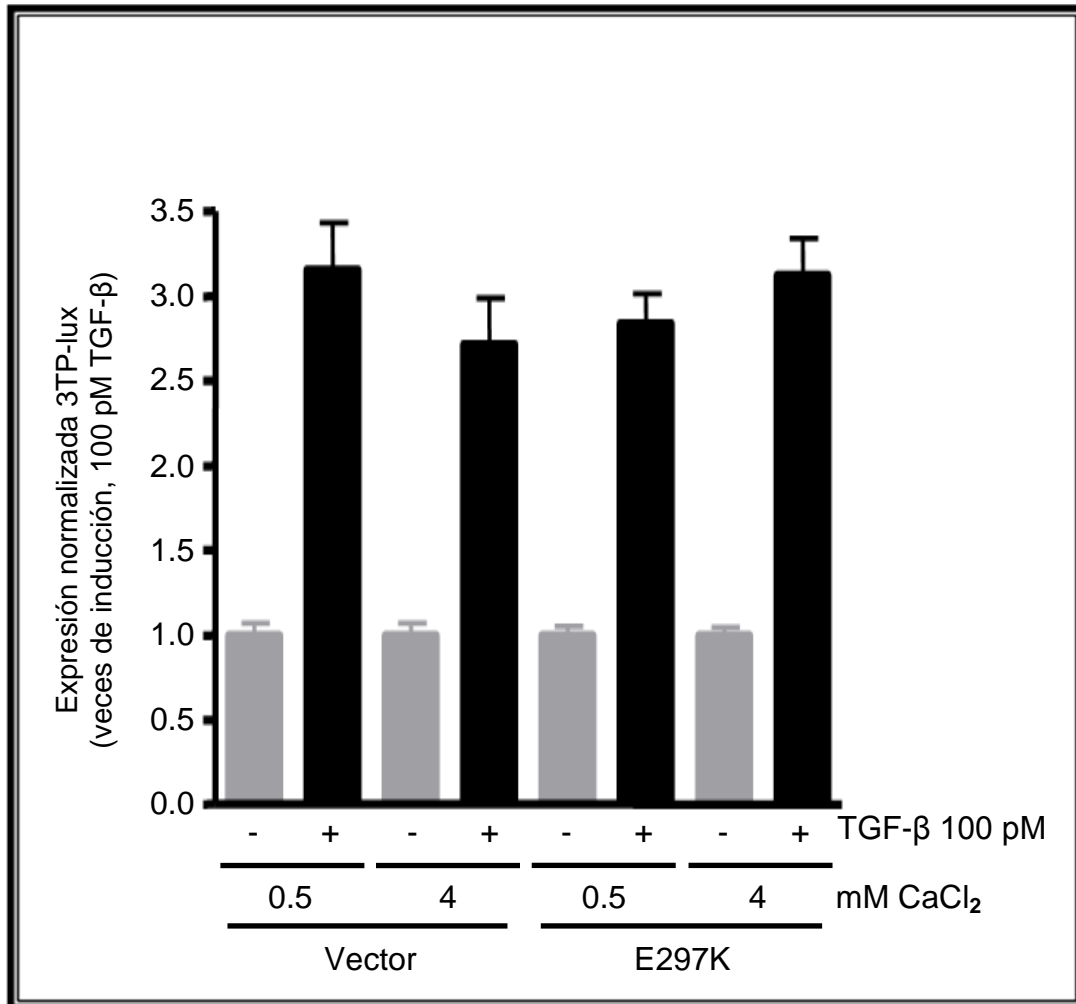


Fig. 12 Efecto de la presencia de la E297K en la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. El gen reportero de la vía del TGF-β, 3TP-lux, y la E297K, mutante inactiva del CaR, fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 0.5 y 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente, con 100 pM de TGF-β por 16 horas en donde se indica (barras negras). Se observa que la E297K no tiene ningún efecto sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF-β a pesar de ser tratado con 4 mM CaCl₂. A diferencia del CaR WT, la simple presencia de la E297K no afectó la actividad transcripcional de la vía del TGF-β. Con los datos obtenidos se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA comparando todas las condiciones contra la actividad transcripcional del control estimulado con TGF-β. No hubo diferencias significativas en ningún caso.
n = 12

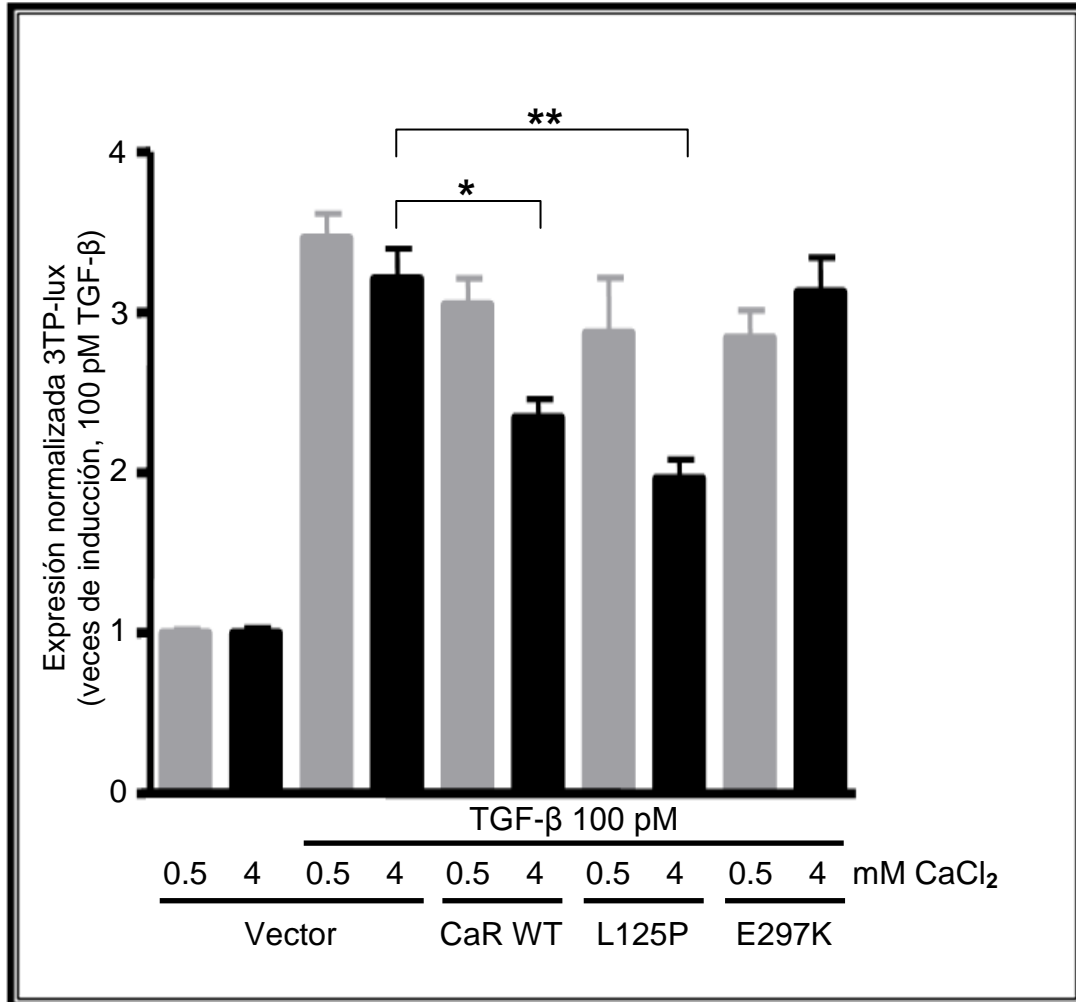


Fig. 13 Comparación del efecto sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β promovido por el CaR WT y las mutantes L125P y la E297K. Se puede observar que cuando se activa al CaR WT con 4 mM CaCl₂ éste ejerce un efecto atenuante sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β , efecto ejercido también por la L125P en el mismo sentido y magnitud. Por otro lado, este efecto atenuante se revierte con la E297K, a pesar de ser tratado con 4 mM CaCl₂. Con los datos obtenidos se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA comparando todas las condiciones contra la actividad transcripcional del control estimulado con TGF- β .

* p < 0.01, **p < 0.001

7.2 La activación del CaR disminuye la fosforilación de las proteínas Smad2

Una vez demostrado que la activación del CaR disminuye la actividad transcripcional de la vía del TGF- β , se realizaron experimentos para determinar a qué nivel de la vía del TGF- β ejerce su efecto atenuante el CaR. Se realizaron experimentos para determinar si la activación del CaR tenía efecto directo sobre el receptor para TGF- β , especialmente sobre el T β RI por ser el que fosforila a las R-Smad, por lo que se analizó la fosforilación de Smad2 por activación del CaR. Por medio de experimentos de detección de la fosforilación de la Smad2 por Western Blot, se determinó que la activación del CaR disminuye la cantidad de Smad2 fosforilada dependiente de TGF- β . La figura 14 demuestra que cuando el CaR es activado con 4 mM CaCl₂ por 1 hora la cantidad de Smad2 fosforilada disminuye significativamente, en comparación con la condición en el que el CaR está presente pero no está activado.

Por otro lado, en los experimentos con la E297K se encontró que la cantidad de Smad2 fosforilada no se ve afectada por este receptor, incluso aunque éste sea tratado con 4 mM CaCl₂, tal como lo demuestra la figura 15.

Este conjunto de datos demuestra que la para la efectiva disminución de la cantidad de Smad2 fosforilada se requiere la presencia y activación del CaR.

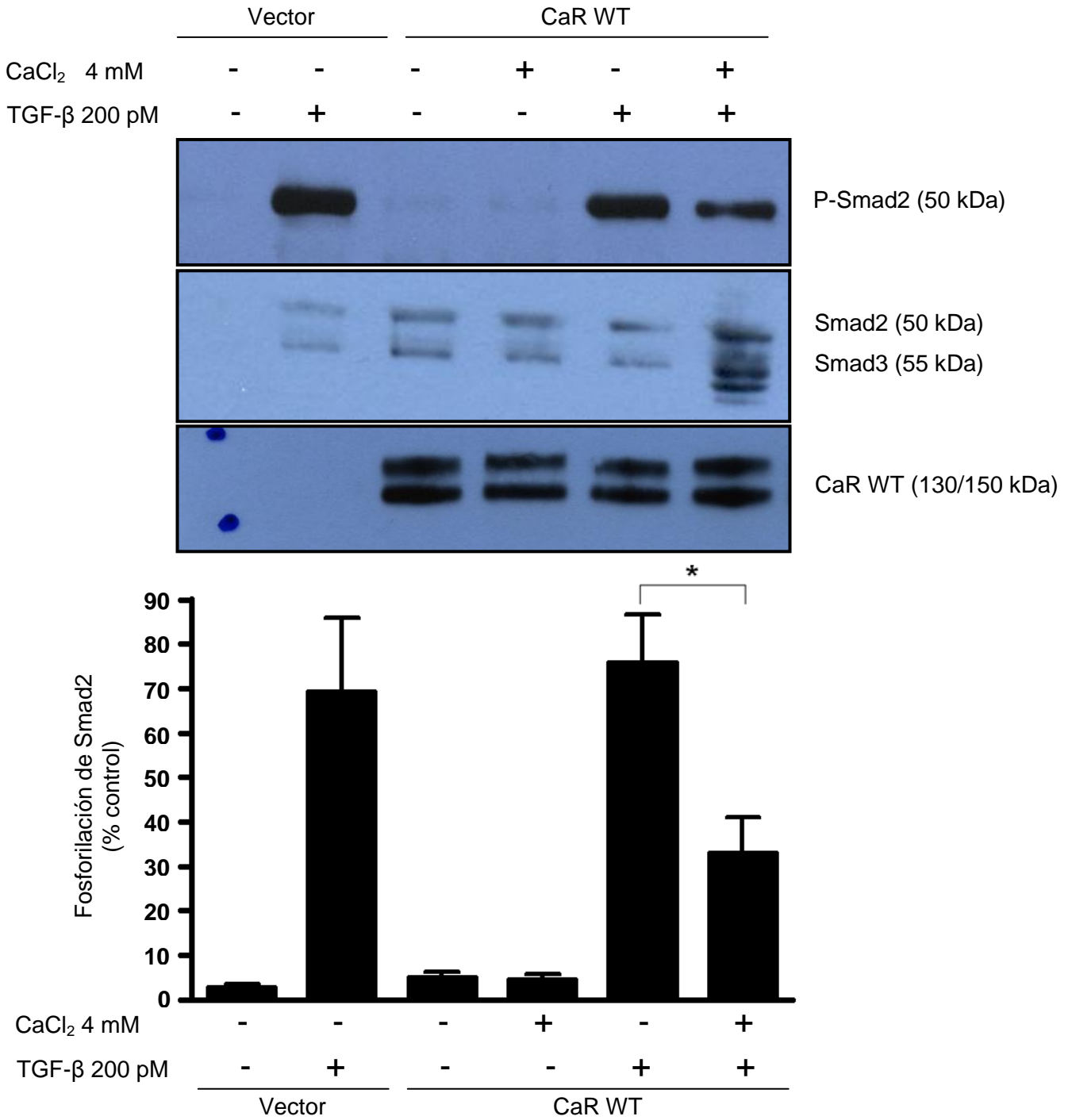


Fig. 14 Efecto de la activación del CaR WT en la fosforilación de Smad2. Vector sin inserto pCR3.1 y el CaR WT fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente con 200 pM de TGF-β por 30 min. Se observa que la activación del CaR WT, estimulado con 4 mM CaCl₂, disminuye significativamente la cantidad de Smad2 fosforilada dependiente de TGF-β. Con los datos obtenidos se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA comparando todas las condiciones con el control estimulado con TGF-β.

*p < 0.01, n = 4.

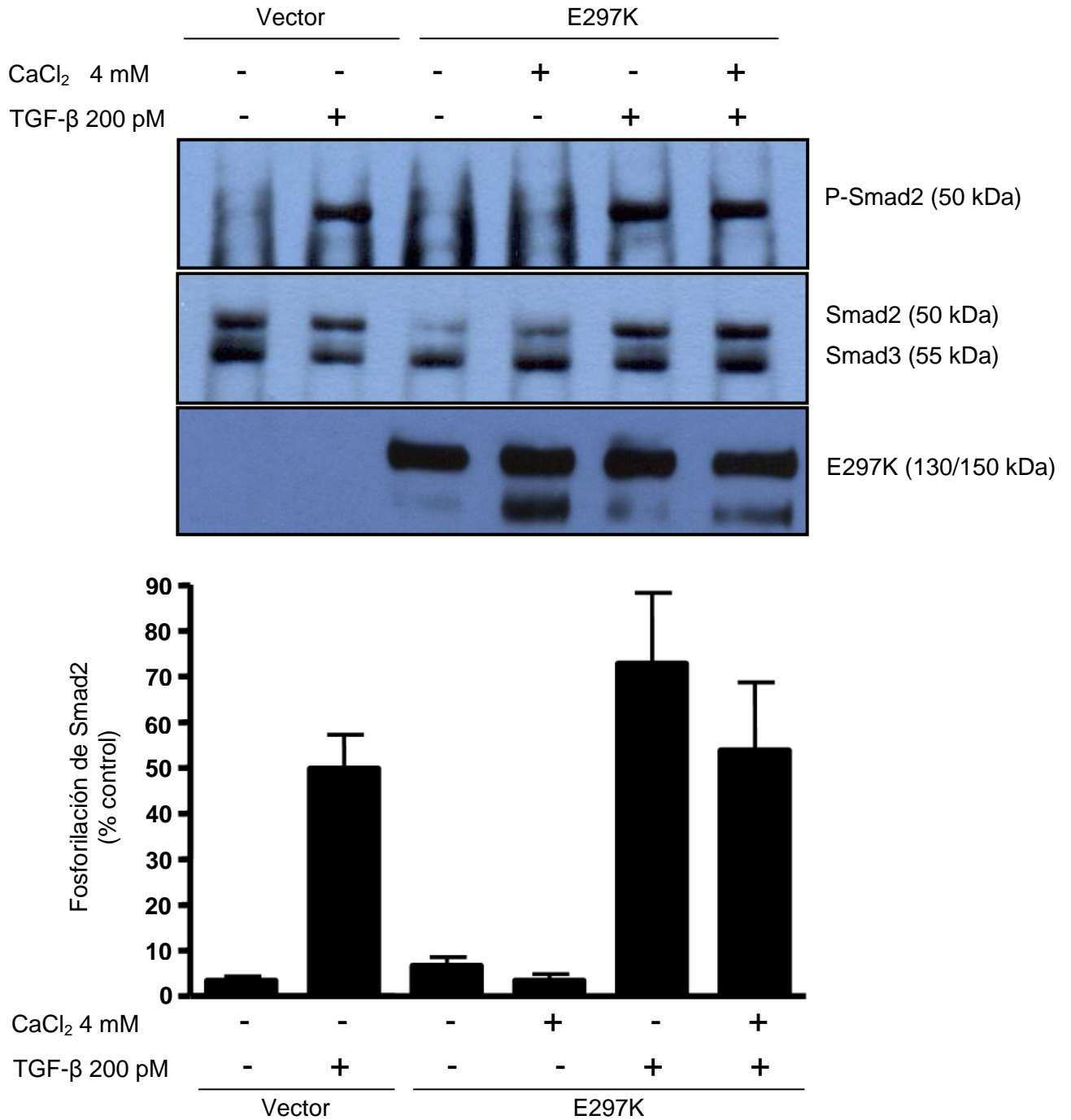


Fig. 15 Efecto de la presencia de la E297K en la fosforilación de Smad2. Vector sin inserto pCR3.1 y la E297K fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente con 200 pM de TGF-β por 30 min. Se observa que la E297K no disminuye la cantidad de Smad2 fosforilada dependiente de TGF-β a pesar de ser tratado con 4 mM CaCl₂. Con los datos obtenidos se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA comparando todas las condiciones con el control estimulado con TGF-β. No hubo diferencias significativas en ninguno de los casos. n = 3.

7.3 La activación del CaR no afecta la expresión del gen *smad7*

El gen *smad7* fue identificado con base en su similitud con el gen de las otras Smads, y el papel de la proteína fue dilucidado por medio de experimentos con genes reporteros en los que se observó que tenía un papel negativo en la señalización del TGF- β (Hayashi et al. 1997; Nakao et al. 1997). Los análisis de los perfiles de expresión de Smad7 revelaron que los niveles de RNAm de esta proteína aumentan en las células tratadas con TGF- β , sugiriendo que Smad7 forma parte de un mecanismo de retroalimentación negativa para terminar con las señales de la vía del TGF- β (Nakao et al. 1997), en el que el promotor del gen es el blanco de las Smads activas (Nagarajan et al., 1999). Con este antecedente como referencia, se realizaron experimentos para determinar si la activación del CaR afecta la expresión del gen *smad7* dependiente de TGF- β . Realizando experimentos de amplificación del gen *smad7* por RT-PCR, determinamos que la activación del CaR por 1 hora no afecta la expresión del gen *smad7* dependiente de TGF- β . La figura 16 demuestra que cuando el CaR es estimulado con 4 mM CaCl₂ la expresión del gen *smad7* no disminuye, en comparación con la condición en la que el CaR está presente pero no está activado. Sorpresivamente encontramos que 4 mM CaCl₂ directamente favorece la expresión del gen *smad7* independientemente del TGF- β .

Este conjunto de datos demuestra que dado que la activación del CaR no disminuyó la expresión del gen *smad7* y dada la inespecificidad en la expresión de este gen dependiente del estímulo con CaCl₂ y TGF- β , el gen *smad7* no contribuye a caracterizar el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β por lo que será necesario demostrar el efecto atenuante del CaR sobre otro gen blanco del TGF- β .

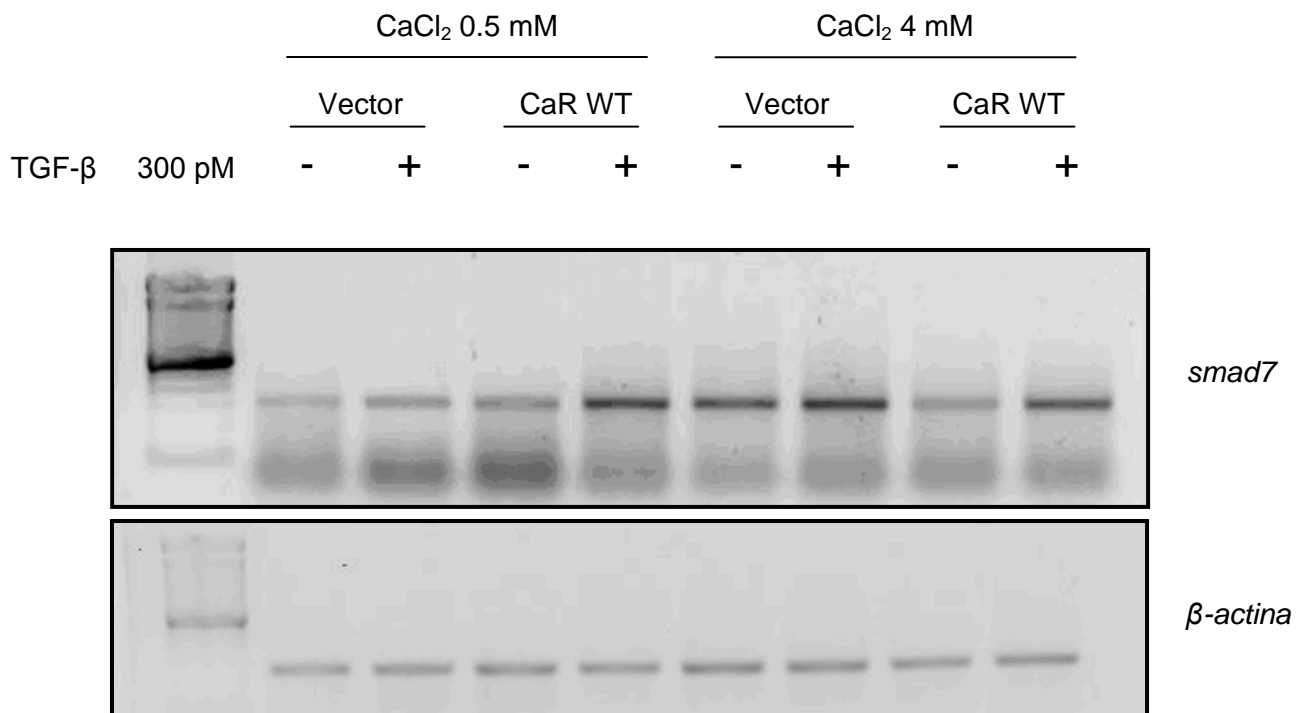


Fig. 16 Efecto de la activación del CaR WT en la expresión del gen *smad7*. Vector sin inserto pCR3.1 y el CaR WT fueron transfectados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron incubadas con 4 mM CaCl₂ por 1 hora y, posteriormente con 300 pM de TGF-β por 2 horas. Se observa que la activación del CaR WT, estimulado con 4 mM CaCl₂, no afecta la expresión del gen *smad7* dependiente de TGF-β. Por otro lado, también se observa que 4 mM CaCl₂ por sí mismo promueve la expresión del gen *smad7*. n = 3.

VIII. DISCUSIÓN

El presente trabajo representa el primer reporte en el que se demuestra que el CaR tiene un efecto negativo sobre la vía de señalización del TGF- β . En primer lugar, nosotros demostramos que al activar al CaR con 4 mM CaCl₂ la actividad transcripcional de la vía del TGF- β disminuye significativamente, lo cual fue corroborado en experimentos con L125P, mutante activante del CaR, que de igual manera tiene un efecto atenuante sobre la vía de señalización del TGF- β . Por otro lado, también demostramos que al activar al CaR y a la L125P la cantidad de Smad2 fosforilada disminuye significativamente, lo cual sugiere entonces que el CaR ejerce su efecto atenuante, a nivel de la membrana plasmática directamente sobre el receptor para TGF- β , probablemente sobre el T β RI por ser éste quien fosforila a las R-Smads, con la consecuente disminución de la actividad transcripcional de esta vía de señalización.

A pesar de la falta de información respecto al presente tema, existen reportes que pueden ayudar a caracterizar el mecanismo de atenuación del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β en la cual podrían participar algunas proteínas accesorias. Por ejemplo, la filamina 1 (también llamada ABP-280) es una proteína citoesquelética que existe como homodímero, cuyo peso molecular aproximado es de 280 kDa. La filamina contiene un dominio de unión a actina en su extremo N-terminal y 24 repeticiones en tandem de 96 residuos de aminoácidos cada uno, siendo la última repetición el dominio de dimerización de la molécula. La filamina se une a filamentos de actina conectándolos a receptores de la membrana plasmática. Además, actúa como proteína de andamiaje para proteínas intracelulares estando así implicada en mecanismos de transducción de señales (Sasaki et al., 2001).

En 2001 el grupo de Ken Watanabe demostró que la filamina interacciona con las proteínas Smads 1, 2, 4, 5 y 6 (R-Smads: 1, 2 y 5; Co-Smad: 4; e I-Smad: 6). Dada esta interacción se sugiere a la filamina como una proteína implicada en la señalización de la superfamilia del TGF- β . Este grupo demostró también que células sin filamina muestran deficiente señalización del TGF- β comparado con células suplementadas con esta proteína. Esto se demostró dada la disminución en la fosforilación de Smad2 en respuesta al estímulo con TGF- β en células sin filamina. Dado que la fosforilación de las R-Smads desencadena la señalización del TGF- β , la

interacción de éstas con la filamina podría ser esencial para su efectiva fosforilación y la consecuente señalización de la vía del TGF- β (Sasaki et al., 2001).

Algunas hipótesis sobre el mecanismo por el cual la filamina regula la fosforilación de las R-Smads son las siguientes: (1) la filamina podría servir como una proteína de andamiaje, controlando la localización de las R-Smads cerca de su receptor de la superficie celular; (2) por otro lado, las R-Smads asociadas con filamina probablemente pueden mantener su conformación adecuada para ser fosforiladas por su receptor. Para el caso de Smad2 y 4, los dominios MH1 y MH2 pueden interaccionar entre sí en su conformación inactiva, sin embargo, la asociación con filamina podría interrumpir esta conformación manteniendo ambos dominios separados, favoreciendo así la fosforilación de Smad2 y su consecuente heterooligomerización. (3) También existe la posibilidad de que la filamina proteja a las proteínas Smads de degradación dependiente de ubiquitina por enmascaramiento de los sitios de ubiquitinación de las Smads. Por tanto, en vista de que la filamina se asocia con varios mediadores de señalización intracelular, incluyendo a las proteínas Smads, se propone a ésta como una proteína de andamiaje que media procesos de comunicación cruzada entre la superfamilia del TGF- β y otras vías de señalización celular (Sasaki et al., 2001).

Por otra parte, en 2005 el grupo de Gerda E. Breitwieser demostró que el CaR interacciona físicamente con la filamina. Se determinó que la filamina interacciona con el CaR a través de dos motivos β -plegada localizados entre los residuos 962-981 del CaR y que la activación de éste mejora significativamente su interacción con la filamina. Según la vía de señalización canónica del CaR se sabe que éste es capaz de activar la vía de las MAPK. Pues bien, este grupo demostró que la activación de la cascada de señalización de las MAPK requiere que el extremo C-terminal del CaR interaccione con la filamina. Por otro lado, se demostró que la filamina incrementa tanto la localización del CaR en la superficie celular como la cantidad total de este receptor en la célula. Además, la filamina estabiliza el anclaje del CaR en la membrana plasmática, lo protege de degradación y mejora la localización de éste en caveolas. Se han propuesto dos hipótesis que explican cómo la activación del CaR mejora su interacción con la filamina: (1) la primera menciona que la activación del CaR induce un cambio conformacional dentro de su extremo C-terminal el cual promueve su interacción con la filamina, o (2) o la filamina sufre un cambio conformacional, inducido por la activación del CaR, el cual facilita su

interacción con el receptor. Por tanto, faltaría determinar si la activación del CaR afecta la estabilidad y conformación de la filamina (Zhang M et al., 2005).

Ahora bien, dado que el CaR interacciona con la filamina y que dicha interacción se mejora cuando el CaR es activado, y dado que la filamina al parecer es una proteína esencial para la efectiva fosforilación de las R-Smads, es de principal interés para nosotros demostrar si la activación del CaR, lo cual conlleva un mejoramiento de su interacción con la filamina, que al mismo tiempo interacciona con las Smads, impide el acceso y fosforilación de las R-Smads por el T β RI y, por lo tanto, este sea el mecanismo por el cual se explique el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β (Fig.17).

Otra proteína de interés para nosotros es la menina, un polipéptido de 610 residuos de aminoácidos con un peso molecular aproximado de 69 kDa. La menina presenta dos dominios de localización nuclear (NLS-1 y NLS-2) en su extremo C-terminal y cinco motivos consenso en el extremo N-terminal característicos de GTPasas o proteínas de unión a GTP, lo cual es consistente con la unión específica de la menina a GTP o GDP, aunque su afinidad por esta molécula es baja. La menina se une a DNA a través de su región C-terminal, siendo aparentemente el NLS-1 y NLS-2 esenciales para dicha unión. En el extremo N-terminal la menina también presenta dos *zipper* de leucina cuya función es desconocida. A la menina se le conoce principalmente por su función como supresor de tumores; pacientes con mutaciones en el gen *men1*, el cual codifica para la menina, desarrollan tumores en la glándula paratiroides, pituitaria anterior y páncreas endocrino. También se sabe que media la inhibición de la secreción de hormonas como la prolactina, insulina y la hormona del crecimiento, además de participar en la diferenciación de osteoblastos a partir de células mesenquimáticas y en procesos hematopoyéticos que mantienen una cantidad constante de linfocitos en sangre (Balogh K et al., 2006).

Tal como se mencionó anteriormente, está demostrado que el TGF- β se expresa en la glándula paratiroides donde regula negativamente la proliferación celular y producción de la PTH (Sowa et al., 2004). Además, se piensa que la menina puede estar implicada en las acciones antiproliferativas del TGF- β en células de la paratiroides ya que la inactivación de la menina revierte la inhibición de la proliferación celular y secreción de la PTH inducida por el TGF- β (Sowa et al., 2004). Por otro lado, se demostró que la menina interacciona físicamente con Smad3 en el núcleo celular y que la región MH2 de Smad3 y el extremo N-terminal de la menina

son esenciales para dicha interacción (Kaji H et al., 2001). Estos datos sugieren que la pérdida de la función de la vía de señalización del TGF- β por inactivación de la menina puede afectar el estado celular delicadamente balanceado, dirigiéndola hacia un inapropiado crecimiento que eventualmente resulta en la formación o progresión de tumores y en la consecuente producción desregulada de la PTH. Ahora bien, dado que la menina es una proteína esencial para la efectiva señalización del TGF- β en la glándula paratiroides, es de principal interés para nosotros demostrar si la activación del CaR de alguna manera impide la interacción de Smad3 con la menina y de esta manera el CaR bloquea la vía de señalización del TGF- β (Fig.17). Este conjunto de datos sugiere al TGF- β como un nuevo blanco terapéutico para patologías como hiperparatiroidismo.

Por otro lado, también se mencionó anteriormente que está demostrada la relación existente entre la expresión de la ciclina D1, molécula clave que promueve la progresión a través de la fase G1-S del ciclo celular, y reguladores de crecimiento celular tales como bFGF, EGF y TGF- β , y señales específicas en la paratiroides como la activación del CaR. Se demostró que la activación de los receptores para bFGF (FGFR1 y R2) y EGF incrementan significativamente la expresión de la ciclina D1 mientras que la activación del receptor para TGF- β reduce la expresión de la ciclina D1 en la mayoría de células de tumor de paratiroides. Sin embargo, en dos casos en el que se activó al CaR el TGF- β fue incapaz de reducir la expresión de la ciclina D1 (Corbetta et al., 2004). Estos últimos datos sugieren un posible efecto de la activación del CaR sobre el receptor para TGF- β , lo cual conlleva un incremento en la expresión de la ciclina D1. Por otro lado, está demostrado que la ciclina D1 interacciona directamente con la menina y que ésta inhibe a la ciclina D1 (Sowa et al., 2004).

Ahora bien, tomando en consideración los datos anteriores, un mecanismo complementario por el cual el CaR atenúa la vía de señalización del TGF- β podría ser que el efecto atenuante sobre el receptor para TGF- β , por activación del CaR, conlleva un incremento en la proteína ciclina D1 misma que interacciona con la menina e impide que esta última interaccione con Smad3, abatiendo así la vía de señalización del TGF- β (Fig.17).

Otra molécula de interés para nosotros es la proteína AMSH. La AMSH es un polipéptido de 424 residuos de aminoácidos con un peso molecular aproximado de 48 kDa. Esta proteína se clonó utilizando el dominio SH3 de la proteína STAM. El

análisis de la secuencia de la AMSH determinó que esta proteína presenta un NLS en la región conformada por los aminoácidos L112-L127. También presenta, entre los aminoácidos Q323-P369, una región homóloga a la proteína 1 de unión al dominio de activación a Jun, JSH, y presenta dos motivos de interacción con el dominio SH3, localizados entre las regiones que comprenden la P195-P198, denominado P1, y entre la P227-P231, denominado P2. Esta proteína se expresa en varios tejidos humanos, dentro de los que destaca el riñón por ser un órgano importante en la homeostasis del calcio (Reyes Ibarra, 2007).

El resultado preliminar obtenido con la AMSH indica que esta proteína, al parecer, revierte el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β . Si esto llega a confirmarse, entonces la AMSH representaría la molécula de retroalimentación negativa de este mecanismo de atenuación sobre la vía de señalización del TGF- β .

Se ha reportado información que contribuye a explicar cómo la AMSH podría revertir la atenuación de la vía del TGF- β . Por ejemplo, en 2001 el grupo de Susumo Itoh demostró que la AMSH-1 interacciona con Smad6 y 7 (I-Smads), pero no con las R- ni la Co-Smad, e interrumpe la interacción de Smad6 con el RI para BMPs. Estos datos sugieren que la AMSH-1 interacciona y secuestra a Smad6 evitando que ésta inhiba al receptor para BMPs, permitiendo una eficiente fosforilación de las R-Smads, potenciando así señalización mediada por las BMPs (Itoh et al., 2001).

En 2004 el grupo de Matthias Mann clonó una nueva molécula señalizante denominada AMSH-2, por su homología con la AMSH-1, y demostró que esta proteína regula positivamente la vía de señalización del TGF- β ya que ésta interacciona directamente con Smad7, bloqueando así sus efectos inhibitorios sobre el receptor de TGF- β . El alto grado de homología entre la AMSH-1 y -2 sugiere que la AMSH-2 también podría interaccionar con Smad6 y, en consecuencia, regular positivamente la vía de las BMPs (Ibarrola et al., 2004).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que la AMSH-1 interacciona directamente con el extremo C-terminal del CaR regulando negativamente la actividad del receptor (Herrera Vigenor et al., 2006). También se demostró que la AMSH-1 promueve la degradación del CaR ya que lo redirecciona de vías de reciclamiento lento a vías de degradación, reduciendo la expresión del CaR en la membrana celular y disminuye la secreción de la PTHrP (Reyes Ibarra et al., 2007).

Ahora bien, de confirmarse que la AMSH realmente revierte el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β , esto podría deberse a que, por un lado, la AMSH regula negativamente la actividad del CaR, por lo cual se esperaría que en consecuencia el efecto atenuante del CaR sobre el receptor para TGF- β también disminuya. Por otro lado, dado que la AMSH interacciona y secuestra a las I-Smads, se esperaría que la vía del TGF- β se potencie como consecuencia de una mayor eficiencia en la fosforilación de las R-Smads. Por lo tanto, estos dos eventos en conjunto podrían ser el mecanismo que explique cómo la AMSH revierte el efecto atenuante del CaR sobre el receptor para TGF- β (Fig.17).

Una vez determinado el mecanismo de comunicación cruzada entre el CaR y el receptor para TGF- β también es de interés para nosotros determinar si la activación de otros receptores tales como el S1P1, S1P3, CXCR2, CXCR4 y M2 tienen algún efecto sobre el receptor para TGF- β . En 2004 el grupo de Andrea Huwiler reportó la primera evidencia en la que se demuestra que el receptor para esfingosina-1-fosfato (S1P, por sus siglas en inglés, Sphingosine-1-Phosphate) es capaz de transactivar al receptor para TGF- β_2 , estimulando así la cascada de señalización mediada por las proteínas Smads a través de la cual puede imitar las respuestas celulares inducidas por el TGF- β (Xin C et al., 2004). Por otro lado, en 2007 el grupo de Tomiko Asano demostró que agonistas para GPCRs, incluyendo ET-1, ET-3, LPA y carbacol, así como TGF- β inducen independientemente la expresión de proteínas específicas de músculo liso (SMA, por sus siglas en inglés, Smooth Muscle Actin). Sin embargo, combinaciones de un simple agonista para GPCRs con TGF- β cooperativamente incrementan el número de células positivas a SMA así como el nivel de expresión de estas proteínas en células individuales (Morishita R et al., 2007).

Finalmente, como se mencionó al principio, la glándula paratiroides interviene en la regulación de los niveles de calcio en la sangre. La exactitud de los niveles de calcio es muy importante en el cuerpo humano, ya que pequeñas desviaciones pueden causar trastornos nerviosos y musculares. Patologías como el hiperparatiroidismo, que es la hiperfunción de la glándula paratiroides, se caracterizan por la liberación excesiva de la PTH que a su vez aumenta los niveles de calcio en sangre, lo cual lleva al desarrollo de enfermedades como osteoporosis, cálculos de los riñones y tumores benignos en esta glándula. Ahora bien, conocer a nivel molecular el mecanismo por el cual el CaR abate los efectos antiproliferativos

mediados por el TGF- β puede contribuir a encontrar posibles blancos terapéuticos que contrarresten el desarrollo de procesos tumorogénicos en la glándula paratiroides.

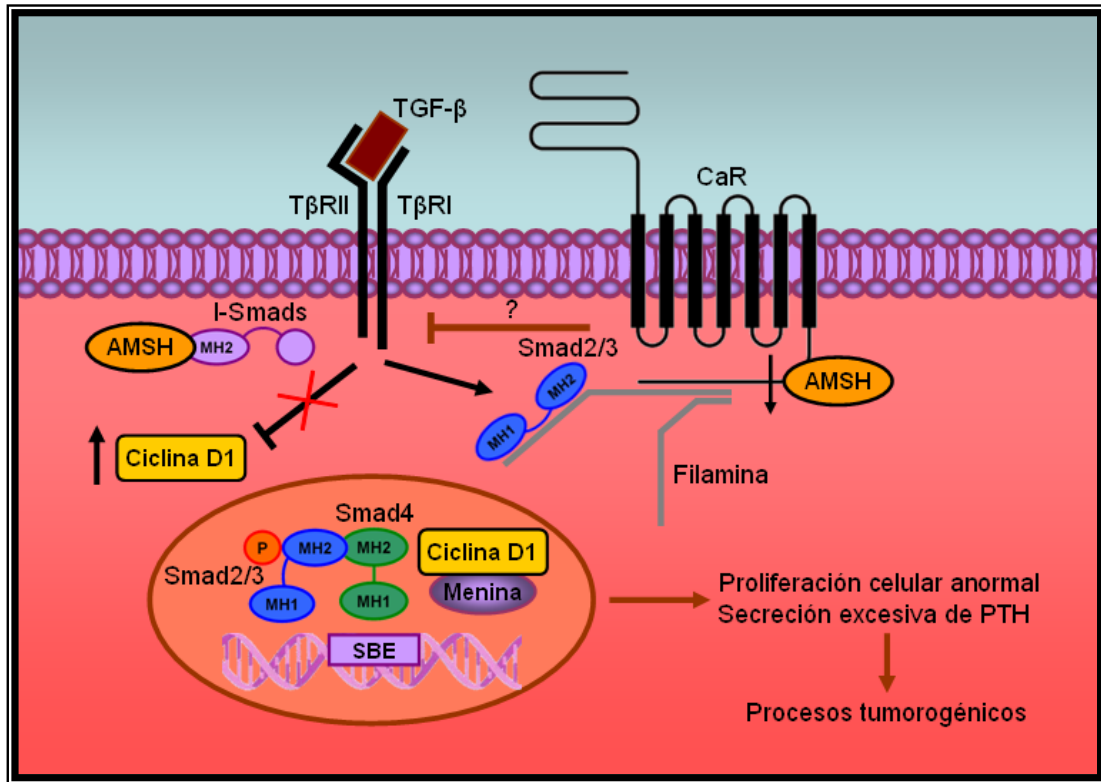


Fig. 17 Representación esquemática del posible mecanismo de atenuación de la vía de señalización del TGF- β por activación del CaR en células de la glándula paratiroides. La activación del CaR, al interactuar con la filamina, proteína de andamiaje que interacciona con Smad2, podría impedir que las R-Smads sean fosforiladas por el T β RI. Por otro lado, los niveles de la proteína ciclina D1 podrían incrementarse dada la atenuación sobre el receptor para TGF- β quien bloquea su expresión. Por lo tanto, la ciclina D1, que interacciona con la menina, podría secuestrar a ésta impidiendo su interacción con Smad3 y ésta última con el DNA, bloqueando así la señalización de la vía del TGF- β que, en consecuencia, conduce a una proliferación celular anormal y al desarrollo de procesos tumorogénicos. Finalmente, la proteína AMSH al regular negativamente la actividad del CaR y al potenciar la vía de señalización del TGF- β por inactivar a las I-Smads podría revertir el efecto atenuante del CaR sobre el receptor para TGF- β .

IX. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

1. La activación del CaR regula negativamente la actividad transcripcional de la vía de señalización del TGF- β .
2. La activación del CaR regula negativamente la fosforilación de la proteína Smad2.
3. La activación del CaR no regula la expresión del gen *smad7*.

X. PERSPECTIVAS

Tomando como antecedentes los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden hacer estudios posteriores con el fin último de caracterizar el mecanismo a nivel molecular que emplea el CaR para atenuar la vía de señalización del TGF- β .

Por lo tanto, para la continuación del presente proyecto se sugiere lo siguiente:

1. *Determinar si hay degradación de las proteínas Smad2/3 por activación del CaR.* Estos experimentos permitirán conocer si la disminución en la fosforilación de Smad2 se debe a que las proteínas Smad2/3 son enviadas a vías de degradación por activación del CaR. De ser así, se determinaría si su degradación es vía proteosoma o lisosoma.
2. *Determinar la fosforilación de Smad2 en células que sobreexpresan filamina.* Estos experimentos permitirán conocer si la activación del CaR, a través de su interacción con filamina, impide el acceso y la fosforilación de las R-Smads por el receptor para TGF- β .
3. *Determinar la expresión de las proteínas SARA y STRAP (MAWD) por activación del CaR.* Dado que la fosforilación de las R-Smads es regulada positivamente por proteínas que interaccionan con el receptor para TGF- β tales como SARA y MAWD es de principal interés determinar el nivel de expresión de estas proteínas por activación del CaR.
4. *Analizar la actividad transcripcional de la vía del TGF- β por activación del CaR en presencia de la menina.* Dado que la menina es una proteína esencial para la señalización del TGF- β , estos experimentos permitirán determinar la participación de la menina en el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β .
5. *Analizar la fosforilación de Smad2 por activación del CaR en presencia de la proteína AMSH.* Estos experimentos permitirán determinar si la proteína AMSH es capaz de revertir el efecto atenuante del CaR sobre la vía de señalización del TGF- β .
6. *Ensayos de secreción del PTHrP por activación del CaR.* Dado que el TGF- β regula positivamente la secreción del PTHrP es de principal interés determinar el nivel de secreción de éste por activación del CaR.
7. *Ensayos de la actividad transcripcional de la vía del TGF- β por activación de otros GPCRs.* Estos experimentos permitirán determinar si la activación de

otros GPCRs tiene un efecto positivo o negativo sobre la actividad transcripcional de la vía del TGF- β .

XI. ANEXOS

Soluciones para la cuantificación de la β -galactosidasa

* Solución Mg100X (0.1 M MgCl₂)

Ejemplo: para 50 muestras

- MgCl ₂ 0.5 M	10 μ l
- β -mercaptoetanol	15.5 μ l
- Agua estéril	24.5 μ l

* Solución MIX8

Ejemplo: para 50 muestras

- Mg100X	50 μ l
- ONPG	1.1 ml
- Fosfato de sodio	3.35 ml

Obtención de plásmidos por gradientes de cloruro de cesio

Primer día

1. Transformar las bacterias con el plásmido requerido. Se recomienda que sean transformaciones y cultivos frescos para mayor rendimiento.

Segundo día

2. Picar una colonia y crecerlas en 20 ml de medio LB, con el antibiótico correspondiente, todo el día a 37°C.
3. Del cultivo de todo el día, tomar 5 ml y crecerlos en 500 ml de medio LB, con el antibiótico correspondiente, toda la noche a 37°C.

Tercer día

4. Los cultivos se centrifugan a 5,000 rpm por 10 min a 4°C, para empastillar las bacterias (SORVALL).
5. El sobrenadante se elimina y la pastilla se resuspende en 4 ml de buffer TS, en tubos Falcon de 50 ml. Los tubos Falcon deben estar lavados y autoclaveados.
6. A cada tubo adicionar 4 ml del buffer ELT. Dejar reposar 10 min a temperatura ambiente. No mover.

Nota: el buffer ELT se prepara al momento.

-
7. Mientras transcurren los 10 min, o incluso antes, preparar el baño María a 70°C. También hay que enjuagar los tubos para CsCl₂ con agua estéril.
Nota: los tubos para CsCl₂ no se autoclavean ni se lavan con etanol.
 8. Los tubos se calientan en el baño María a 70°C por 10 min, no por más tiempo. Esto se hace con el objetivo de terminar de lisar las células.
 9. Se vacía la solución a tubos de centrifuga. Mantener a 4°C. Los tubos se equilibran con buffer TS y se centrifugan a 40,000 rpm por 20 min a 4°C con el rotor 70.1 Ti.
 10. El sobrenadante se recupera en un tubo corex de 30 ml, al cual se le adiciona PEG-NaCl en proporción 1:1; se tapa con parafilm y se mezcla por inmersión. El PEG-NaCl se utiliza para precipitar el DNA, por lo que el tubo se debe tornar turbio.
 11. Los tubos se incuban 30 min en hielo.
 12. Calibrar los tubos con PEG-NaCl.
 13. Centrifugar a 7,000 rpm 10 min a 4°C.
 14. Desechar el sobrenadante y la pastilla se resuspende vortexeando en 3 ml de buffer TE.
 15. Se agrega 5 µl de RNAsa A (20 mg / ml) toda la noche a 37°C o 25 ml por 2 hrs.
Nota: hasta aquí el DNA se puede almacenar a 4°C.

Cuarto día

16. Pesar 4g de CsCl₂ y adicionarlo al tubo corex que contiene el DNA. Mezclar bien y vortexear.
17. Colocar la mezcla en tubo para ultracentrifuga y adicionar a cada uno 400 µl de bromuro de etidio [10 mg / ml], llenar el tubo con 500 µl de buffer TE y calibrar en la balanza analítica con buffer TE.
18. Sellar los tubos y centrifugar a 90,000 rpm por 3 hrs a 16°C con el rotor NVT90.
19. Retirar la muestra cubierta con papel aluminio y extraer el DNA picando el tubo con una jeringa (de 3 ml de preferencia) en un cuarto oscuro con la lámpara de luz UV. Sólo las bandas que fluorescen.
20. Colocar el DNA extraído en un tubo Falcon de 15 ml y adicionar 5 ml de butanol saturado para eliminar el bromuro de etidio. Vortexear y centrifugar a

1,200 rpm 1 min a temperatura ambiente. Retirar la fase de butanol (roja) y volver a repetir este paso hasta eliminar todo el color rojo. En general, al tercer lavado se elimina dicha tinción roja.

21. Adicionar al tubo 3 volúmenes (del volumen obtenido) de EtOH 70% frío para precipitar el DNA y dejar toda la noche a -20°C.

Quinto día

22. Centrifugar a 8,500 rpm 30 min a 4°C, eliminar el sobrenadante decantando, dejar secar la pastilla y resuspenderla vortexeando en 500 µl de buffer TE.
Nota: la pastilla también puede secarse con vacío.
23. Pasar la solución a tubos eppendorf de 1.5 ml.
24. El DNA se limpia con 500 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (tomar la fase de abajo) (pH 7.8, 25:24:1, Research Organics). Agitar en el vortex hasta emulsionar.
25. Centrifugar a 12,000 rpm 10 min a temperatura ambiente.
26. La fase acuosa (la de arriba) se recupera en un tubo eppendorf.
27. Agregar acetato de sodio 3M (1/10^a parte del volumen obtenido), vortexear y añadir 2.5 volúmenes (del volumen obtenido) de EtOH absoluto frío.
28. Los tubos se invierten ligeramente hasta observar la formación de la red de DNA.
29. Los tubos se incuban 20 min a -70°C y después se centrifugan a 12,000 rpm 5 min a 4°C.
30. Quitar el sobrenadante con vacío.
31. Lavar con EtOH frío al 70%, 500 µl por cada tubo.
32. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min.
33. Quitar el sobrenadante con vacío.
34. Dejar secar 30 min.
35. Resuspender la pastilla en 100 µl de buffer TE y cuantificar.

Preparación de soluciones

* Buffer TS (Tris-Sacarosa)		[final]
- Tris-HCl pH 7.5 1M	2.5 ml	50 mM
- Sacarosa	12.5 g	25 %

Ajustar con agua estéril a 50 ml

Nota: Disolver muy bien la sacarosa.

* Buffer ELT (EDTA / Lisozima / Tritón)

- EDTA 0.5 M	0.9 ml
- Lisozima	9 mg
- Tritón 10%	45 µl
- Agua	3.55 ml

Preparar al momento 4.5 ml por muestra.

Nota: Mantener a temperatura ambiente.

* Buffer PEG-NaCl (Polietilenglicol-NaCl)		[final]
- PEG 6,000	10 g	20%
- NaCl 5M	10 ml	1 M
- Tris pH8 1M	0.5 ml	10 mM
- EDTA 0.5M	1.0 ml	10 mM

Ajustar a 50 ml de agua estéril.

Autoclavear la solución para eliminación de RNAsas.

Nota: El PEG 6,000 se agrega al final, no se autoclavea.

* Buffer TE		[final]
- 200 µl Tris-HCl 1M		10 mM
- 40 µl EDTA 0.5 M		1 mM
- 19.76 ml de agua estéril		

Preparar 20 ml

Nota: Esterilizar el agua en autoclave, aproximadamente 25 min a 120°C.

* Butanol saturado con agua

Agregar un volumen de butanol por un volumen de agua, es decir, 25 ml de butanol en 25 ml de agua.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Abdollah S, Macías Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, and Wrana JL. T β RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 27678-27685.

Bai M, Trivedi S, and Brown EM. Dimerization of the Extracellular Calcium-sensing Receptor (CaR) on the Cell Surface of CaR-transfected HEK293 Cells. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 23605-23610.

Bai RY, Koester C, Ouyang T, Hahn SA, Hammerschmidt M, Peschel C, and Duyster J. SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF- β signalling. *Nat. Cell. Biol.* 2002; **4**: 181-190.

Balogh K, Racz K, Patocs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006; **17**: 357-364.

Bockaert J, and Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999; **18**: 1723-1729.

Boesen CC, Radaev S, Motyka SA, Patamawenu A, and Sun PD. The 1.1 Å crystal structure of human TGF- β type II receptor ligand binding domain. *Structure.* 2002; **10**: 913-919.

Bordeau A, Moutahir M, Souberbielle JC, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C, and Lieberherr M. Effects of lipoxygenase products of arachidonate metabolism on parathyroid hormone secretion. *Endocrinology.* 1994; **135**: 1109-1112.

Bordeau A, Souberbielle JC, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C, and Lieberherr M. Phospholipase-A₂ action and arachidonic acid in calcium-mediated parathyroid hormone secretion. *Endocrinology.* 1992; **130**: 1339-1344.

Brauner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, O'Hara P, and Krosgaard-Larsen P. The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18382-18386.

Briones Orta M. Regulación de la expresión de Smad7 por el correpresor SnoN. Tesis de doctorado. UNAM. México, D.F. 2006.

Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, and Barnett JV. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science.* 1999a; **283**: 2080-2082.

Brown EM, and MacLeod RJ. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. *Physiol. Rev.* 2001; **81**: 239-297.

Brown EM, Pollak M, and Herbert SC. The extracellular calcium-sensing receptor: Its role in health and disease. *Annu. Rev. Med.* 1998; **49**: 15-29. Review.

Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, and Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 1998; **280**: 1455-1457.

Conigrave AD, Quinn SJ, and Brown EM. Cooperative multi-modal sensing and therapeutic implications of the extracellular Ca^{2+} sensing and therapeutic implications of the extracellular Ca^{2+} sensing receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; **21**: 401-407.

Corbetta S, Eller-Vainicher C, Vicentini L, Lania A, Mantovani G, Beck-Peccoz P, and Spada A. Modulation of cyclin D1 expression in human tumoral parathyroid cells: effects of growth factors and calcium sensing receptor activation. *Cancer Lett.* 2007.

Chacko BM, Qin B, Correia JJ, Lam SS, de Caestecker MP, and Lin K. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat. Struct. Biol.* 2001; **8**: 248-253.

Chai J, Wu JW, Massagué J, Pavletich NP, and Shi Y. Features of a Smad3 MH1-DNA complex: roles of water and zinc in DNA binding at 2.4 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 2003; in press.

Derynck R and Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003; **425**: 577-584.

Derynck R, Zhang YE, and Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell*. 1998; **95**: 737-740.

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Davidson AF, and Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat. Cell. Biol.* 2003; **5**: 410-421.

D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Bai M, Hanley DA, Bastepe M, Salisbury SR, Brown EM, Cole DE, and Hendy GN. Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; **87**: 1309-1318.

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, and Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β -type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 12477-12480.

Fan GF, Ray K, Zhao XM, Goldsmith PK, and Spiegel AM. Mutational analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca^{2+} receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. *FEBS Lett.* 1998; **436**: 353-356.

Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, and Miyazono K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2001; **12**: 1431-1443.

Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, Kikuchi A, Miyazono K, and Kato M. Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor β signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2001; **21**: 5132-5141.

Gamma L, and Breitwieser GE. A carboxyl-terminal domain controls the cooperativity for extracellular Ca²⁺ activation of the human calcium sensing receptor. A study with receptor-green fluorescent protein fusions. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 29712-29718.

Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, BabulHirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, et. al. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat. Genet.* 1999; **21**: 302-304.

Greenwald J, Fischer WH, Vale WW, and Choe S. Three finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nat. Struct. Biol.* 1999; **6**: 18-22.

Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, and Choe S. Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002; **420**: 636-642.

Hammerland LG, Krapcho KJ, Garrett JE, Alasti N, Hung BC, Simin RT, Levinthal C, Nemeth EF, and Fuller FH. Domains determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors. *Mol. Pharmacol.* 1999; **55**: 642-648.

Handlogten ME, Shiraishi N, Awata H, Huang C, and Miller RT. Extracellular Ca²⁺-sensing receptor is a promiscuous divalent cation sensor that responds to lead. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; **279**: 1083-1091.

Hardwick JCH, van den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, van den Brande JMH, Keller JJ, Offerhaus GJA, van Deventer JH, and Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology.* 2004; **126**: 111-121.

Hauache OM, Hu J, Ray K, and Spiegel AM. Functional interactions between the extracellular domain and the seven-transmembrane domain in Ca²⁺ receptor activation. *Endocrine.* 2000; **13**: 63-70.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL, and Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 1997; **89** (7): 1165-1173.

Hayes S, Chawla A, and Corvera S. TGF-β receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J. Cell. Biol.* 2002; **158**: 1239-1249.

Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, and Cole DE. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum. Mutat.* 2000; **16**: 281-296.

Herrera Vigenor F, Hernández García R, Sánchez Valadez M, Vázquez Prado J, and Reyes Cruz G. AMSH regulates calcium-sensing receptor signaling through direct interactions. *BBRC.* 2006; **347**: 924-930.

Hjalm G, MacLeod RJ, Kifor O, Chattopadhyay N, and Brown EM. Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 34880-34887.

Hocevar BA, Smine A, Xu XX, and Howe PH. The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor β receptors to the Smad pathway. *EMBO* 2001; **20**: 2789-2801.

Hofer AM, and Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Mol. Cell. Biol.* 2003; **4**: 530-538. Review.

Hu J, and Spiegel AM. Naturally occurring mutations of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor: implications for its structure and function. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003; **14** (6): 282-288.

Hu J, Hauache O, and Spiegel AM. Human Ca^{2+} receptor cysteine-rich domain. Analysis of function of mutant and chimeric receptors. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 16382-16389.

Hu J, Reyes Cruz G, Goldsmith PK, and Spiegel AM. The Venus's-flytrap and cysteine-rich domains of the human Ca^{2+} receptor are not linked by disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 6901-6904.

Huse M, Chen YG, Massagué J, and Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor in complex with FKBP12. *Cell* 1999; **96**: 425-436.

Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, and Massagué J. The TGF- β receptor activation process: an inhibitor – to substrate-binding switch. *Mol. Cell.* 2001; **8**: 671-682.

Ibarrola N, Kratchmarova I, Nakajima D, Schiemann WP, Moustakas A, Pandey A, and Mann M. Cloning of a novel signaling molecule, AMSH-2, that potentiates transforming growth factor β signaling. *BMC Cell Biol.* 2004 ; **5** (2) : 1-10.

Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, and Itoh S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO* 2001 ; **20** (15) : 4132-4142.

Jiang YF, Zhang Z, Kifor O, Lane CR, Quinn SJ, and Bai M. Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with the CaR cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 50543-50549.

Kaji Hiroshi, Canaff Lucie, Lebrun Jean-Jacques, Goltzman David, and Hendy Geoffrey N. Inactivation of menin, a Smad-3 interacting protein, blocks transforming growth factor type β signaling. *PNAS* 2001 March 27; **98** (7): 3837-3842.

Kato Y, Habas R, Katsuyama Y, Naar AM, and He X. A component of the ARC/Mediator complex required for TGF- β /Nodal signalling. *Nature* 2002; **418**: 641-646.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, and Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation. *Mol. Cell.* 2000; **6**: 1365-1375.

Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, and Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; **280**: 291-302.

Kirsch T, Sebald W, and Dreyer MK. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.* 2000; **7**: 492-496.

Kretschmar M, Liu F, Hata A, Dooby J, and Massagué J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 1997; **11**: 984-995.

Kunishima N, et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 2000; **407**: 971-977.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**: 860-921.

Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, and Ten-Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research.* 2005; 599-608.

Lienhardt A, Garabédian M, Bai M, Sinding C, Zhang Z, Lagarde JP, Boulesteix J, Rigaud M, Brown EM, and Kottler ML. A large homozygous or heterozygous inframe deletion within the calcium-sensing receptor's carboxyl terminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant hypocalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; **85**: 1695-1702.

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 2000; **28**: 713-726.

Lin X, Liang M, and Feng XH. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 36818-36822.

Liu X, Sun Y, Weinberg RA, and Lodish HF. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor.* 2001; **12**: 1-8.

Lo RS, and Massagué J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nat. Cell Biol.* 1999; **1**: 472-478.

Lu Z, Murray JT, Luo W, Li H, Wu X, Xu H, Backer JM, and Chen YG. Transforming growth factor β activates Smad2 in the absence of receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 29363-29368.

Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, and Zhou Q. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes Dev.* 1999; **13**: 2196-2206.

Macías Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, and Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling. *Cell* 1996; **87**: 1215-1224.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, and Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; **298**: 1912-1934.

Marchuk DA. Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr. Opin. Hematol.* 1998; **5**: 332-338.

Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; **67**: 753-791.

Massagué J, and Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 2000; **14**: 627-644.

Massagué J, and Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; **19**: 1745-1754.

Mirura S, Takeshita T, Asao H, Kimura Y, Murata K, Sasaki Y, Hanai JI, Beppu H, Tsukazaki T and Wrana JL. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol. Cell. Biol.* 2000; **20**: 9346-9355.

Morishita R, Nagata K, Ito H, Ueda H, Asano M, Shinohara H, Kato K, and Asano T. Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor- β . *J. Neurochem.* 2007; **101**: 1031-1040.

Nagarajan RP, Zhang J, Li W, and Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J. Biol. Chem.* 1999; **274** (47): 33412-33418.

Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, and ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997; **389**: 631-635.

Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, and Niehrs C. Silencing of TGF- β signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999; **401**: 480-485.

Patterson GI, and Padgett RW. TGF- β -related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet.* 2000; **16**: 27-33.

Peiris D, Pacheco I, Spencer C, and MacLeod J. The extracellular calcium-sensing receptor reciprocally regulates the secretion of BMP-2 and the BMP antagonist Noggin in colonic myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007; **292**: G753-G766.

Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, and Madrid-Marina V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud pública de México*. 2001; **43** (4): 340-351.

Randall RA, Germain S, Inman GS, Bates PA, and Hill CS. Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *EMBO J*. 2002; **21**: 145-156.

Ray K, Clapp P, Goldsmith PK and Spiegel AM. Identification of the sites of *N*-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J. Biol. Chem*. 1998; **273**: 34558-34567.

Reyes Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PJ, and Spiegel AM. Human Ca²⁺ receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. *J. Biol. Chem*. 2001; **276**: 32145-32151.

Reyes Ibarra AP. Mecanismos de regulación del receptor sensor de calcio extracelular. 2007. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN. México, D.F.

Reyes Ibarra AP, García Regalado A, Ramírez Rangel I, Esparza Silva AL, Valadez Sánchez M, Vázquez Prado J, and Reyes Cruz G. Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSH-sensitive mechanism. *Molec. Endo*. 2007; **21**(6): 1394-1407.

Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, and Brown EM. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 2000; **141** (12): 4357-4364.

Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, and Brown EM. Ca²⁺-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2001; **281**: E1267-E1274.

Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, and Watanabe K. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem*. 2001 May 25; **276** (21):17871-17877.

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, and Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* 1998; **94**: 585-594.

Silver J, Kilav R, and Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 2002; **283**: F367-F376. Review.

Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, and Heldin CH. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem*. 1997; **272**: 28107-28115.

Sowa H, Kaji H, Kitazawa R, Kitazawa S, Tsukamoto T, Yano S, Tsukada T, Canaff L, Hendy GN, Sugimoto T, and CK. Menin inactivation leads to loss of transforming growth factor β inhibition of parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion. *Cancer Res.* 2004 March 15; **64**: 2222-2228.

Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, and Luo K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev.* 2001; **15**: 2822-2836.

Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, and Miyazono K. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 39919-39925.

Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, Miyazono K, and Imamura T. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- β signaling by Smad7. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 10716-10721.

Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX, and Mishra L. Disruption of transforming growth factor- β signaling in ELF β -spectrin-deficient mice. *Science* 2003; **299**: 574-577.

ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, and Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J. Cell Physiol.* 2002; **191**: 1-16.

Tsao P, Cao T, and Von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; **22**: 91-96.

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, and Wrana JL. SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGF- β Receptor. *Cell* 1998; **95**: 779-791.

Wang W, Mariani FV, Harland RM, and Luo K. Ski represses bone morphogenetic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; **97**: 14394-14399.

Wotton D, Lo RS, Lee S, and Massagué J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999a; **97**: 29-39.

Wotton D, Lo RS, Swaby LA, and Massagué J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J. Biol. Chem.* 1999b; **274**: 37105-37110.

Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, and Massagué J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ.* 2001; **12**: 457-463.

Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massagué J, and Shi Y. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 2000; **287**: 92-97.

Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, and Shi Y. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF- β signalling. *Cell* 2002; **111**: 357-367.

Xiao Z, Liu X, Henis YI, and Lodish HF. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000a; **97**: 7853-7858.

Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, and Lodish HF. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 39404-39410.

Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H, Schäfer-Korting M, Pfeilschifter J, and Huwiler A. Sphingosine 1-Phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor- β -induced cell responses. *J. Biol. Chem.* 2004; **279** (34): 35255-35262.

Xu L, Chen YG, and Massagué J. Smad2 nuclear import function masked by SARA and unmasked by TGF- β -dependent phosphorylation. *Nat. Cell. Biol.* 2000; **2**: 559-562.

Xu L, Kang Y, Col S, and Massagué J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF- β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell.* 2002; **10**: 271-282.

Zhang M, and Breitwieser GE. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**: 11140-11146.

Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, and Bai M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 5316-5322.

Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, and Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999; **400**: 687-693.