



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“El Receptor Sensor de Calcio (CaSR) promueve la  
expresión de la GTPasa Rab27b en células de  
cáncer de mama.”**

**TESIS**

Que presenta

**Lic. Carlos Alejandro Egusquiza Alvarez**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR**

Directora de tesis:

**Dra. Guadalupe Reyes Cruz**

El presente trabajo de tesis recibió apoyo de parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca con número de registro 782475 y el proyecto número 240119. El mismo se desarrolló en el Laboratorio 19 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Reyes Cruz.

## **Agradecimientos**

A mi madre y mi padre, por brindarme siempre su amor incondicional y por ser mi principal fuente de apoyo incluso desde la distancia.

A mi novia, por estar siempre a mi lado, amarme y apoyarme, así como acompañarme en esta aventura de venirnos a vivir a México.

A mi familia en general, en especial a mi tío Amaury, su esposa Carolina y mi suegra Katia porque he podido contar con su ayuda en todo momento.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por permitirme formar parte de su laboratorio y poner en mis manos este interesante proyecto, así como por ser la guía principal del mismo.

A los doctores José Vázquez Prado y Fernando Navarro García, por aceptar formar parte de mi comité tutorial y por sus acertadas recomendaciones para mejorar el proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 19: Lenis, Tania, Sandra, Jorge, Misael y César, que durante todo este año me han brindado sus consejos y apoyo para la realización del presente trabajo; así como a los amigos y compañeros del Laboratorio 35 de Farma: Yarelis, Sendi, Daniel, Irving, Víctor y Alex, con los que también pude contar siempre que necesité de su ayuda.

A Margarita y Jaime, que con su trabajo aportaron muchísimo al avance de esta tesis de maestría.

A mis compañeros de generación de la maestría, excelentes personas con los que compartí un año de cursos y muy buenas experiencias

A Clara Hernández Chávez (Clarita), que siempre está dispuesta a ayudar en lo que sea necesario y que me dio su apoyo para realizar esta maestría incluso desde antes de mi llegada a México.

A todos mis amigos cubanos radicados en México, que con su calidez siempre ayudan a que me sienta un poco menos lejos de casa.

Y en general a todas aquellas personas que de un modo u otro hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis....

**Muchas gracias!!!!**

## **Resumen**

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) cuyo papel fisiológico fundamental es regular la homeostasis del calcio en el organismo. Sin embargo, este receptor se ha encontrado sobreexpresado en células de cáncer de mama, donde se ha visto asociado a la secreción de diversos factores que contribuyen a aumentar la agresividad de los tumores. Previamente se ha demostrado que la GTPasa Rab27b está implicada en la secreción de factores inducida por el CaSR, además esta GTPasa está vinculada a la baja supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos evaluar el efecto del CaSR sobre los niveles de expresión de Rab27b, ya que la modulación de esta GTPasa podría ser clave para aumentar los niveles de secreción en células tumorales y hacer a éstas más agresivas. Nuestros resultados muestran que el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), pero no en células epiteliales de mama no tumorigénicas (MCF-10-A). En células MCF-7 demostramos que el efecto del CaSR como promotor de la expresión de Rab27b es inhibido por el NPS-2143, un antagonista alostérico de este receptor. Por otro lado, nuestros resultados muestran que la Proteína Cinasa A (PKA), así como la maquinaria transcripcional y traduccional de la célula están implicadas en la cascada de transducción de señales a través de la cual el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b. Un análisis bioinformático permite sugerir que los factores de transcripción AP-2- $\alpha$ , GATA-1, YY-1, IRF-2, ER $\alpha$  y GR potencialmente regulados por PKA y/o implicados en la progresión del cáncer de mama, posiblemente participen en la regulación de la expresión del gen que codifica para Rab27b, ya que en la región promotora del mismo existen sitios de consenso de unión para estos factores transcripcionales. Interesantemente también encontramos que la simulación *in vitro* de la condición de hipoxia tumoral potencia el efecto ejercido por el CaSR sobre los niveles de expresión de Rab27b en células MDA-MB-231 y MCF-7. Todos los resultados obtenidos en este trabajo permiten adjudicar una nueva función para el CaSR en cáncer de mama, la de regular positivamente la expresión de la GTPasa Rab27b como un posible mecanismo para estimular la secreción de diversos factores e incrementar la agresividad de los tumores.

## **Abstract**

The Calcium Sensing Receptor (CaSR) is a G-proteins coupled receptor (GPCR) whose fundamental physiological role is to regulate calcium homeostasis in the body. However, this receptor has been found to be overexpressed in breast cancer cells, where it has been associated to the secretion of various factors that contribute to increase the aggressiveness of tumors. Previously, it has been demonstrated that the Rab27b GTPase is involved in the secretion of factors induced by CaSR, in addition this GTPase is linked to the low survival of patients with breast cancer. Therefore, in this work we aimed to evaluate the effect of CaSR on the expression levels of Rab27b, since the modulation of this GTPase could be key to increase the secretion levels in tumor cells and make them more aggressive. Our results show that activated CaSR positively regulates the expression of Rab27b in breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231), but not in breast non-tumorigenic epithelial cells (MCF-10-A). In MCF-7 cells we demonstrate that the effect of CaSR as a promoter of Rab27b expression is inhibited by NPS-2143, an allosteric antagonist of this receptor. On the other hand, our results show that Protein Kinase A (PKA), as well as the transcriptional and translational machinery of the cell are involved in the cascade of signal transduction through which the CaSR positively regulates the expression of Rab27b. A bioinformatic analysis suggests that the transcription factors AP-2- $\alpha$ , GATA-1, YY-1, IRF-2, ER $\alpha$  and GR, potentially regulated by PKA and / or involved in the progression of breast cancer, possibly participate in the regulation of the expression of the gene that codes for Rab27b since in the promoter region thereof there are binding consensus sites for these transcriptional factors. Interestingly, we also found that *in vitro* simulation of the hypoxic tumor condition potentiates the effect exerted by the CaSR on the expression levels of Rab27b in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. All the results obtained in this study allow to assign a new function for CaSR in breast cancer, to positively regulate the expression of GTPase Rab27b as a possible mechanism to stimulate the secretion of various factors and increase the aggressiveness of tumors.

# Índice de contenido

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Cáncer .....	1
1.1.1. Generalidades del cáncer.....	1
1.1.2. Cáncer de mama .....	1
1.1.3. La hipoxia tumoral y su efecto sobre la progresión del cáncer .....	3
1.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) .....	4
1.3. Receptor Sensor de Calcio (CaSR) .....	6
1.4. Papel del CaSR en cáncer.....	9
1.5. Rab-GTPasas.....	12
1.6. La GTPasa Rab27 .....	12
1.7. Papel de la GTPasa Rab27b en cáncer .....	13
1.8. Evidencias previas de la relación entre el CaSR y la GTPasa Rab27b .....	14
Justificación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivo General .....	15
Objetivos específicos .....	15
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	17
2.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	17
2.2. Curso temporal de la expresión de Rab27b luego de la activación del CaSR en células MDA-MB-231 .....	17
2.3. Comparación de la expresión de Rab27b ante estímulos del CaSR en las líneas celulares MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231.....	17
2.4. Determinación de la expresión de Rab27b luego de la inhibición del CaSR con el modulador alostérico negativo NPS-2143 en células MCF-7 .....	18
2.5. Determinación del efecto de H89, un inhibidor de la PKA, sobre la expresión de Rab27b en células MCF-7.....	19

2.6. Determinación de la expresión de Rab27b luego de la inhibición de la transcripción y la traducción en células MCF-7 .....	19
2.7. Determinación de la expresión de Rab27b y Hif-1- $\alpha$ en condiciones de hipoxia ante estímulos del CaSR.....	20
2.8. Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras para Western blot .....	21
2.9 Western blot .....	21
2.10. Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que se unen al gen de Rab27b .....	23
2.11. Análisis Estadístico .....	23
<b>3. Resultados</b> .....	<b>24</b>
3.1. La activación del CaSR durante 48 horas induce un aumento significativo de la expresión de Rab27b en células MDA-MB-231 .....	24
3.2. El CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en células de origen tumoral pero no en células de origen epitelial normal de mama .....	25
3.3. El calcilítico NPS-2143 inhibe la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR en células MCF-7 .....	26
3.4. La Proteína Cinasa A (PKA) participa en la regulación positiva de la expresión de Rab27b ejercida por el CaSR en células MCF-7 .....	27
3.5. Los mecanismos transcripcionales y traduccionales celulares están implicados en la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR en células MCF-7 .....	28
3.6. Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que pueden unirse al gen de RAb27b .....	30
3.7. La hipoxia potencia el efecto ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b .....	31
<b>4. Discusión</b> .....	<b>34</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Perspectivas</b> .....	<b>39</b>
<b>7. Referencias bibliográficas</b> .....	<b>40</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Rasgos distintivos del cáncer.....	2
<b>Figura 2.</b> La hipoxia tumoral conduce a aumentos en los niveles de la proteína HIF-1- $\alpha$ , factor de transcripción que induce la expresión de múltiples genes que potencian la agresividad tumoral.....	4
<b>Figura 3.</b> La unión de los ligandos específicos a los GPCRs conduce a un cambio de conformación en estos últimos que induce la activación de la proteína G heterotimérica.....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura del Receptor Sensor de Calcio (CaSR).....	7
<b>Figura 5.</b> Vías de señalización activadas por el CaSR luego de su unión a ligando. ....	9
<b>Figura 6.</b> Círculo vicioso de retroalimentación positiva entre las células de cáncer de mama metastásico y las células óseas.....	11
<b>Figura 7.</b> Las Rab GTPasas funcionan como interruptores moleculares que pasan de un estado inactivo (unido a GDP) y un estado activo (unido a GTP) y viceversa. ....	13
<b>Figura 8.</b> Curso temporal de la expresión de Rab27b ante estímulos del CaSR en células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231.. ....	24
<b>Figura 9.</b> Efecto de la activación del CaSR sobre los niveles de expresión de Rab27b y Rab11A en células MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231 .....	26
<b>Figura 10.</b> La regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por estímulos del CaSR se inhibe con el modulador alostérico negativo NPS-2143 en células MCF-7. ....	27
<b>Figura 11.</b> El inhibidor de la PKA (H89) abroga parcialmente la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR. ....	28
<b>Figura 12.</b> La inhibición de la transcripción con actinomicina y de la traducción con cicloheximida abrogan la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR. ....	29
<b>Figura 13.</b> Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que putativamente se unen a la región río arriba del primero exón del gen de Rab27b .....	30
<b>Figura 14.</b> La inducción de hipoxia por incubación con CoCl <sub>2</sub> 200 $\mu$ M potencia el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b en células MDA-MB-231 (A) y MCF-7 (B)...	32
<b>Tabla 1.</b> Diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios y secundarios de Western blot.....	22





# 1. Introducción

## 1.1. Cáncer

### 1.1.1. Generalidades del cáncer

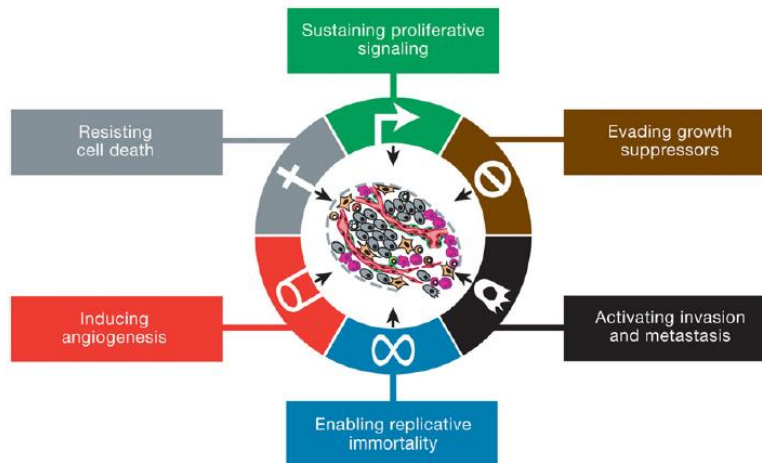
El cáncer constituye en la actualidad una de las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Se estima que esta enfermedad cobra la vida de millones de personas cada año, lo cual ha conducido a que un número significativo de grupos de investigación multidisciplinarios investiguen las bases moleculares y celulares de esta patología. Dichas investigaciones contribuyen no solamente a que se entiendan los procesos fisiológicos y bioquímicos que sustentan esta enfermedad, sino también al hallazgo de nuevos métodos de diagnóstico y agentes terapéuticos más eficaces que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

La diversidad molecular y patofisiológica que presentan los diferentes tipos de cáncer, incluso entre diferentes pacientes con un mismo tipo de tumor; ha conducido a los especialistas a definir al cáncer como un conjunto de diferentes enfermedades más que como una patología única. Sin embargo, dentro de esta amplia diversidad, está bien descrito que todos los tipos de cáncer cumplen una serie de características distintivas. Durante la evolución multipasos del cáncer se presentan como rasgos distintivos: la sustentación de señales de proliferación, la evasión de los supresores del crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la generación de una inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de los procesos de invasión y metástasis (**Figura 1**). En la base de estas características distintivas del cáncer se encuentra la inestabilidad genómica. La inflamación asociada a los tumores es otra propiedad que contribuye a potenciar la agresividad de la enfermedad. En estudios más recientes se han establecido otras dos características distintivas del cáncer. Estas son la reprogramación metabólica y la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales. Por otro lado, los tumores pueden reclutar distintos tipos celulares no cancerosos que favorezcan su proliferación, resistencia al sistema inmune, la invasión y la metástasis. A este conjunto de células no cancerosas reclutadas al tumor, los factores y exosomas secretados por éstas, en conjunto con los factores y exosomas secretados por la propia célula tumoral se ha definido como microambiente tumoral. Existen suficientes evidencias que sustentan que el microambiente tumoral juega un papel clave en la progresión de la enfermedad (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.1.2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común y también el que más mortalidad genera en mujeres en todo el mundo. Esta enfermedad se define como una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Diversos factores tales como la edad, factores

reproductivos, historia personal o familiar de enfermedades en mama, predisposición genética y factores medioambientales correlacionan con un incremento del riesgo de padecer esta enfermedad. Los ciclos de niveles de estrógeno endógeno a lo largo del tiempo de vida de la mujer tienen implicaciones para el desarrollo o la protección contra este tipo de cáncer. Múltiples factores relacionados con los ciclos hormonales correlacionan positivamente con la aparición y progresión de la enfermedad tales como una menarquia temprana, primer embarazo en edades avanzadas, menopausia tardía, niveles relativamente altos de testosterona, entre otros. Evidencias sugieren que existe una relación entre las terapias de reemplazamiento hormonal y el riesgo de padecer cáncer de mama. Además de ello, múltiples factores de riesgo evitables como el consumo excesivo de alcohol, la obesidad y la inactividad física están implicados en el 21% de todas las muertes asociadas al cáncer de mama (Shah, 2014).



**Figura 1. Rasgos distintivos del cáncer:** sustentación de señales proliferativas, resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores del crecimiento, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa. En la última década se han añadido como nuevos rasgos: la evasión de la respuesta inmune y la reprogramación metabólica. (Tomado de Hanahan & Weinberg, 2011).

El diagnóstico del cáncer de mama se realiza a través de técnicas como la mamografía, imágenes de resonancia magnética y el ultrasonido. Se han reportado diversos marcadores moleculares con valor diagnóstico en esta enfermedad. Entre ellos se encuentran los receptores de estrógenos (ER, del inglés *Estrogen Receptor*), receptores de prostaglandinas (PR, del inglés *Prostaglandin Receptor*) y el receptor con actividad tirosina cinasa (RTK, del inglés *Receptor Tyrosine Kinases*) Her-2 (Shah, 2014).

La metástasis en cáncer de mama, también conocida como fase IV, es la causa fundamental de la muerte de los pacientes que padecen de esta enfermedad. Los órganos blanco de la metástasis en cáncer de mama son fundamentalmente: pulmón, hueso, hígado y cerebro (Redig & Mcallister, 2013).

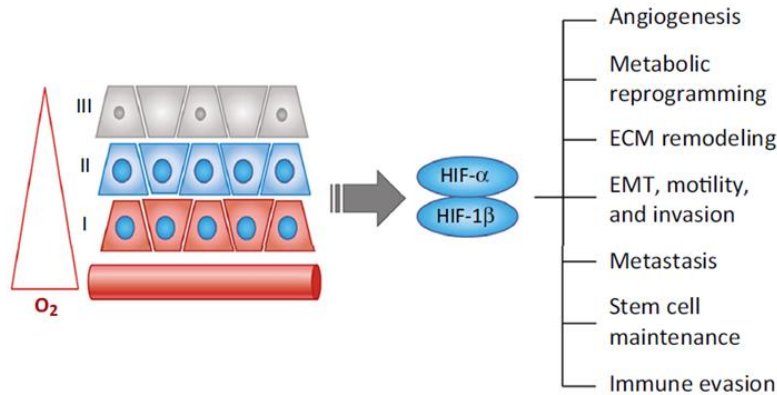
### **1.1.3. La hipoxia tumoral y su efecto sobre la progresión del cáncer**

La generación de un microambiente tumoral hipóxico está relacionada con aumentos en la agresividad de los tumores. Cuando las células cancerosas están sujetas a una disponibilidad decreciente de O<sub>2</sub>, éstas inducen una activación transcripcional de genes blanco dependiente del factor inducible por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés *Hypoxia-inducible factor*). Los productos proteicos de los genes transcritos contribuyen a aumentar la agresividad de los tumores (Schito & Semenza, 2016).

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por una subunidad regulada por O<sub>2</sub> (HIF-1- $\alpha$ ) y otra subunidad que se expresa constitutivamente (HIF-1- $\beta$ ). Otros dos miembros de la familia, HIF-2- $\alpha$  y HIF-3- $\alpha$ , también dimerizan con HIF-1- $\beta$ . En las células en condiciones de normoxia, que generalmente se encuentran en las zonas del tumor cercanas a los vasos sanguíneos, la subunidad HIF-1- $\alpha$  es modificada por enzimas que usan O<sub>2</sub> y  $\alpha$ -cetoglutarato como sustratos para hidroxilar residuos de prolina y asparagina (P402, P564 y N804 en humanos). La hidroxilación bloquea el reclutamiento del coactivador P300 e induce la interacción con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), la cual recluta a una E-3-ubiquitin ligasa que marca a la subunidad HIF-1- $\alpha$  y la conduce a degradación en proteosoma. Bajo condiciones de hipoxia la hidroxilación es inhibida, lo que conduce a la acumulación de HIF-1- $\alpha$ , su posterior heterodimerización con HIF-1- $\beta$  y la consecuente activación transcripcional de los genes blanco (**Figura 2**) (Prabhakar & Semenza, 2015).

El HIF-1- $\alpha$  es capaz de activar la transcripción de genes que potencian la agresividad de los tumores. Entre ellos se encuentran: el gen que codifica para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), implicado en angiogénesis; los genes SNAI 1, SNAI 2, ZEB1, ZEB2, implicados en la transición epitelio-mesénquima; así como el gen que codifica para CD39, relacionado con la evasión inmune, entre muchos otros (Schito & Semenza, 2016).

El análisis inmunohistoquímico de biopsias de tumores ha revelado que los niveles incrementados de HIF-1- $\alpha$  son predictores de mortalidad en cáncer de vejiga, cerebro, mama, cérvix, colon, pulmón, próstata, hígado, estómago, entre muchos otros (Schito & Semenza, 2016).



**Figura 2.** La hipoxia tumoral conduce a aumentos en los niveles de la proteína HIF-1- $\alpha$ , factor de transcripción que induce la expresión de múltiples genes que potencian la agresividad tumoral. Entre estos se encuentran genes vinculados con angiogénesis, reprogramación metabólica, remodelación de la matriz extracelular (EM), transición epitelial-mesenquimal (EMT), movilidad, invasión, metástasis, mantenimiento de células troncales y evasión inmune. (Tomado de Schito y Semenza, 2016).

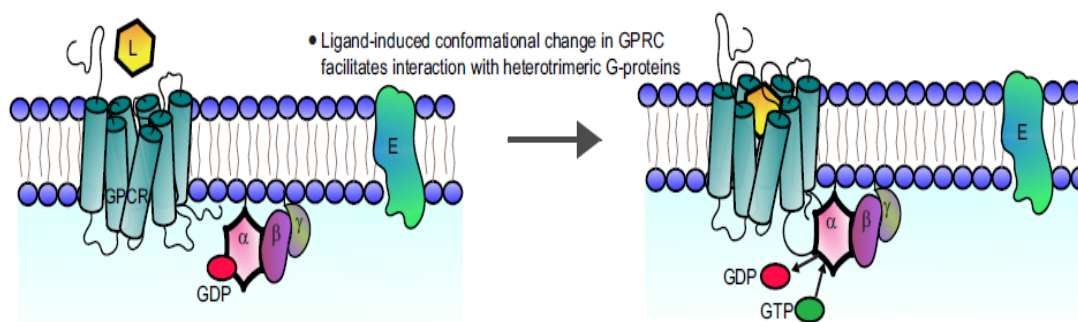
## 1.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Múltiples receptores de membrana se han encontrado sobre expresados o altamente mutados en células de cáncer en general y en cáncer de mama, en particular. Dentro de éstos se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-proteins-coupled-receptors*). Se estima que cerca del 20% de los tumores humanos presentan mutaciones en GPCRs. Todos los estudios realizados hasta el momento indican que tanto los GPCRs como las proteínas G, así como las vías de señalización asociados a estos, constituyen importantes blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer (O'Hayre *et al*, 2013). Es por ello que gran cantidad de grupos de investigación actualmente se dedican a estudiar el papel de estas moléculas en cáncer de mama y a establecer estrategias para bloquear de alguna manera su actividad en cáncer.

Los GPCRs están ampliamente representados en la mayoría de formas de vida eucarionte desde hongos hasta animales superiores, incluyendo a todos los principales organismos modelo. La característica principal de los GPCRs es que están conformados por siete segmentos transmembranales, con el extremo amino terminal localizado hacia la parte extracelular y el extremo carboxilo terminal, hacia el lado citosólico. Estos receptores unen una gran diversidad de ligandos que van desde moléculas lipídicas, proteínas, moléculas orgánicas pequeñas, hormonas hasta fotones. La unión de los ligandos ocurre a través de los dominios amino terminal y/o a través de un nicho formado entre los dominios extracelulares y transmembranales. Todos estos ligandos son capaces de inducir cambios conformacionales que promueven la activación del receptor. La transducción de señales inicial está mediada a través de la proteína G heterotrimérica, la cual media la activación de sistemas de segundos mensajeros, GTPasas y una intrincada red de cascadas de cinasas. La activación

de las vías de señalización reguladas por los GPCRs puede finalmente conducir a cambios en la transcripción génica, la supervivencia, motilidad celular y el crecimiento de células tanto normales como malignas (Hanlon & Andrew, 2015; O'Hayre *et al.*, 2013).

El modelo más aceptado para la activación de los GPCRs consiste en que la unión del ligando o agonista al receptor hacia su lado extracelular induce un cambio de conformación en el receptor que altera la posición de sus hélices transmembranales y de las asas intracelulares. En esta conformación activa, el receptor unido al agonista se acopla a la proteína G heterotrimérica, lo cual promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$ . Este intercambio conduce a la disociación de la subunidad  $G\alpha$  del heterodímero  $G\beta\gamma$ . Cada una de estas entidades por separado activa segundos mensajeros y efectores río abajo, lo cual permite que los diferentes GPCRs cumplan cada una de sus funciones (**Figura 3**) (O'Hayre *et al.*, 2013).



**Figura 3.** La unión de los ligandos específicos a los GPCRs conduce a un cambio de conformación en estos últimos que induce la activación de la proteína G heterotimérica. La unión de los ligandos a los sitios de unión extracelulares, ya sea a los dominios amino terminal o a nichos formados entre los dominios extracelulares y transmembranales, conduce a un cambio de conformación en el receptor, que se transmite a través de los siete segmentos transmembranales. Este cambio de conformación induce el intercambio de GDP por GTP en la proteína  $G\alpha$ , lo que provoca su activación y disociación del heterodímero  $G\beta\gamma$ . A partir de ese punto tanto  $G\alpha$  como  $G\beta\gamma$  activan segundos mensajeros y efectores río abajo con consecuentes efectos funcionales (Tomado de Hanlon & Andrew, 2015).

Los GPCRs están implicados en prácticamente todos los aspectos de la vida animal desde el desarrollo temprano y la función cardíaca hasta la actividad neuronal. La migración celular es uno de los procesos donde los GPCRs juegan un importante papel (Hanlon & Andrew, 2015). La migración de células del sistema inmune como los neutrófilos, así como la de células cancerosas está regulada por GPCRs (Bengtsson *et al.*, 1990; Vázquez-prado *et al.*, 2016). Además de ello, se ha demostrado que la activación de los GPCRs en células tumorales induce una transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), proteína altamente relacionada a la progresión tumoral, debido a las señales de proliferación y supervivencia que genera en estas células (Thomas *et al.*, 2006).

### 1.3. Receptor Sensor de Calcio (CaSR)

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR, del inglés *Calcium Sensing Receptor*), receptor objeto de estudio del presente trabajo, constituye el segundo GPCR más mutado en cáncer (O'Hayre *et al.*, 2013). En el cáncer de mama, en particular, se han reportado hasta la fecha 20 mutaciones de cambio de sentido para este receptor (Cosmic, 2018). Su presencia en distintos tipos de cáncer ha intrigado a muchos grupos de investigación que se han dedicado a dilucidar las funciones que esta molécula tiene en este contexto patológico.

El CaSR pertenece a la familia III de GPCRs. El gen que codifica para el CaSR (denominado *CASR*) en humanos se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3, en la banda 3q13.2-21 como fue determinado por hibridación fluorescente *in situ*. El gen *CASR* humano contiene 7 exones, 6 de los cuales codifican para el segmento amino terminal mientras que el séptimo exón codifica para los 7 segmentos transmembranales y el segmento carboxilo terminal (Janicic *et al.*, 1995). La clonación de este receptor, en el año 1993, permitió definir su función principal y los ligandos que une. A partir de ello se descubrió que su papel fisiológico fundamental es el de regular la homeostasis del calcio en el organismo. Este receptor se expresa fundamentalmente en las glándulas paratiroides donde regula negativamente la secreción de la hormona paratiroidea (PTH, del inglés *Parathyroid hormone*) cuando los niveles de calcio en sangre están elevados. Dado que la PTH induce el aumento de las concentraciones de calcio en sangre, la inhibición de la secreción de esta hormona inducida por el CaSR permite disminuir la calcemia cuando está por encima de los niveles normales (Brown *et al.*, 1993).

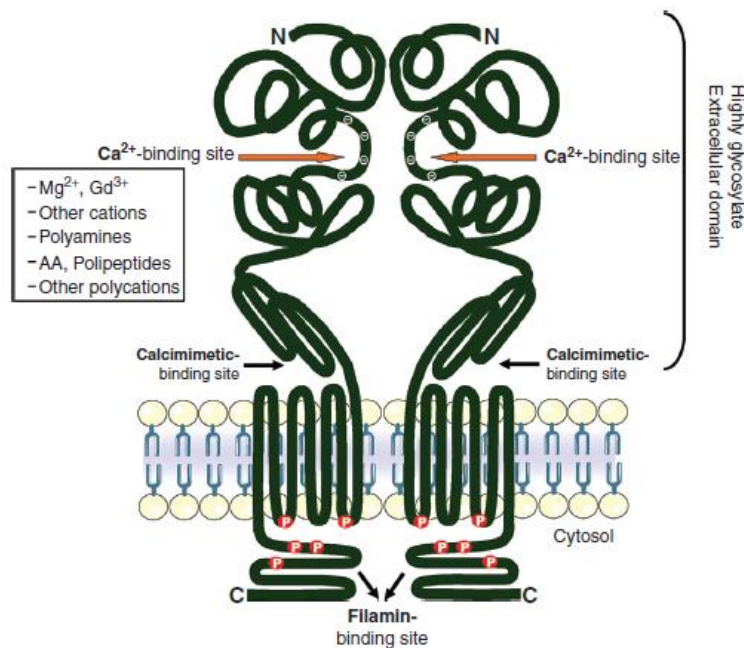
El receptor no solamente se expresa en paratiroides sino también en riñones, hueso e intestino. En estos órganos cumple importantes funciones para la regulación de los niveles de calcio en el organismo. Además, también se ha encontrado expresado en otros órganos no relacionados directamente a la homeostasis del calcio tales como cerebro, vasos sanguíneos, hígado, vías respiratorias y mama. Aunque en varios de estos órganos no se ha esclarecido del todo el papel del CaSR, se sabe que está implicado en modular importantes funciones celulares tales como la diferenciación y proliferación celular, así como el transporte de iones (Díaz-Soto *et al.*, 2016).

Aunque su ligando fundamental es el  $\text{Ca}^{2+}$ , el CaSR también puede unir otros iones divalentes y trivalentes como el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{Gd}^{3+}$ , respectivamente. También este receptor puede unir poliaminas, aminoácidos y antibióticos. El receptor presenta sitios de unión para moduladores alostéricos positivos (Calcimiméticos) y negativos (calcilíticos). Entre los calcimiméticos más importantes se encuentran el R-568 y el Cinacalcet; mientras que los ejemplos representativos de calcilíticos son el NPS-2143 y el Calhex. Estos se utilizan en la clínica para el tratamiento de enfermedades relacionadas

a la desregulación de la calcemia. Además se usan en la investigación básica para el estudio del CaSR (Alfadda *et al.*, 2014).

El CaSR está constituido por 1078 residuos aminoacídicos y se puede dividir en 3 regiones bien definidas (**Figura 4**):

1. Región amino terminal (612 residuos): integrada por una región conocida como dominio venus atrapa moscas. En esta región se encuentra el sitio de unión a los ligandos, porción rica en aminoácidos con carga negativa. Igualmente se encuentran los residuos de Cys a través de los cuales el receptor dimeriza.
2. Dominio transmembrana (250 residuos aproximadamente): consiste en los 7 segmentos transmembranales típicos de todos los GPCRs.
3. Dominio carboxilo-terminal (200 residuos): contiene un gran número de secuencias consenso de fosforilación por parte de proteína cinasa A (PKA) y C (PKC). También es clave para la formación de un complejo de señalización CaSR-filamina A, el cual es necesario para la activación de la vía de las MAP cinasas (MAPK) (Díaz-Soto *et al.*, 2016).



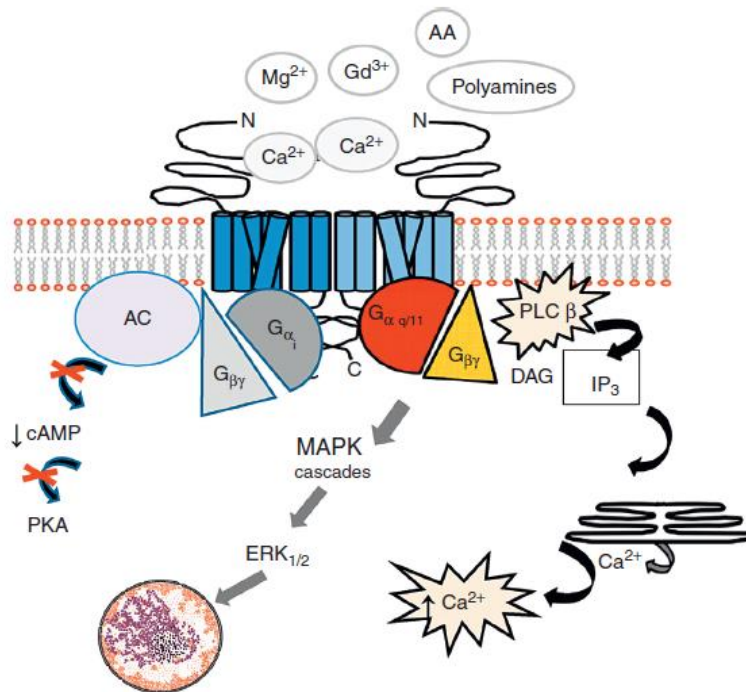
**Figura 4. Estructura del Receptor Sensor de Calcio (CaSR).** El CaSR se expresa en membrana como un dímero. Los dominios extracelulares son altamente glicosilados. Este receptor está integrado por 3 regiones fundamentales. 1-región amino terminal donde se encuentra el dominio venus atrapa moscas con el sitio de unión a los diferentes ligandos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , otros cationes, poliaminas, aminoácidos, polipéptidos y otros policationes), así como los sitios de unión para los moduladores alostéricos positivos (calcimiméticos); 2-los 7 segmentos transmembranales típicos de todos los GPCRs; 3-La región C-terminal con sitios de unión a filamina y secuencias consenso para fosforilación por PKA y PKC (Tomado de Díaz-Soto *et al.*, 2016).



Seguido de la unión del ligando al receptor se genera un cambio conformacional en el dominio extracelular, que resulta en el cierre de los dos lóbulos del dominio venus atrapamoscas, lo que permite que el ligando quede encerrado. Esto ocurre en cada una de las subunidades que forman el dímero del receptor en membrana (Chang & Shoback, 2004). Este cambio de conformación se transmite a los 7 segmentos transmembranales, lo cual conduce a la activación de la proteína G heterotrimérica. La diversidad de funciones ejercidas por el CaSR en los diferentes tejidos dependerá de las diferentes vías de señalización y efectores activados por este GPCR en los diversos tipos celulares en que se expresa (Díaz-Soto *et al.*, 2016).

El CaSR puede interactuar con diferentes variantes de la proteína G, específicamente  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$  y  $G_i$  en condiciones fisiológicas normales. A partir de ello puede entonces activar diferentes vías de señalización y efectores río abajo que le permiten ejercer sus funciones en los diferentes tejidos y células (Chang *et al.*, 1998; Kifor *et al.*, 1997). A través de  $G_{\alpha_i}$ , el CaSR inhibe a la adenilato ciclasa, con una consecuente disminución de las concentraciones celulares de AMPc, lo que conlleva a una disminución en la activación de la proteína cinasa A (PKA, del inglés *Protein Kinase A*). Por otro lado, a través de  $G_{\alpha_{q/11}}$ , el CaSR puede activar la vía de las MAP cinasas, induciendo la fosforilación de ERK, lo que conlleva a la transcripción de genes y a la proliferación celular. También puede activar a través de  $G_{\alpha_{q/11}}$  a la fosfolipasa C  $\beta$  (PLC  $\beta$ , del inglés *Phospholipase-C  $\beta$* ), generando diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfatado (IP<sub>3</sub>). Este último es un segundo mensajero que viaja hasta los sitios de almacenamiento de calcio (fundamentalmente retículo endoplasmático) y al unirse a su receptor en retículo, induce la salida de calcio al citosol con la consecuente activación de la proteína cinasa C (PKC, del inglés *Protein kinase C*) (**Figura 5**) (Díaz-Soto *et al.*, 2016).

Luego de la activación de las vías de señalización, el CaSR puede ser endocitado. Este proceso de endocitosis se inicia luego de que el receptor es fosforilado por PKC o cinasas de los GPCRs (GRKs, del inglés *G proteins coupled receptor kinases*). En el mecanismo están involucradas la  $\beta$ -arrestina y la proteína adaptadora-2 (Lorenz *et al.*, 2007). El receptor endocitado puede ser reciclado a la membrana celular a través de un mecanismo dependiente de Rab11a, lo que contribuye a la resensibilización; o translocado al lisosoma para su degradación. También se conoce que la AMSH (del inglés *associated molecule with the SH3 domain of STAM*) o proteína de unión a STAM (stamBP, del inglés *Stam Binding protein*), una proteína que se une al carboxilo terminal del CaSR, dirige a este receptor desde el reciclamiento lento a la regulación negativa, reduciendo su expresión (Moore *et al.*, 2007; Reyes-Ibarra *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Vías de señalización activadas por el CaSR luego de su unión a ligando. El CaSR puede acoplarse a  $G_i$ , induciendo la inhibición de la adenilato ciclasa, disminución de los niveles de AMPc y de la activación de la PKA. También puede acoplarse a  $G_{q/11}$ , donde induce la activación de la cascada de las MAP cinasas y la fosfolipasa C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ). (Tomado de Díaz-Soto *et al.*, 2016).

#### 1.4. Papel del CaSR en cáncer

El papel funcional que juega el CaSR en cáncer ha resultado un asunto muy polémico. Distintos trabajos han permitido concluir que el CaSR puede prevenir o promover la progresión del cáncer en dependencia del tipo de tejido donde se desarrollan los tumores. Por ejemplo, en tejidos como paratiroides y colon, el CaSR inhibe la proliferación e induce la diferenciación terminal. Por ello, se ha encontrado que la pérdida del receptor confiere un potencial maligno a los tumores de colon y paratiroides, lo que convierte al CaSR en un supresor de tumores en este contexto. Por otro lado, en tumores de próstata y mama, la expresión del CaSR está incrementada y esto favorece la metástasis a hueso, actuando como un oncogén (Tennakoon *et al.*, 2016).

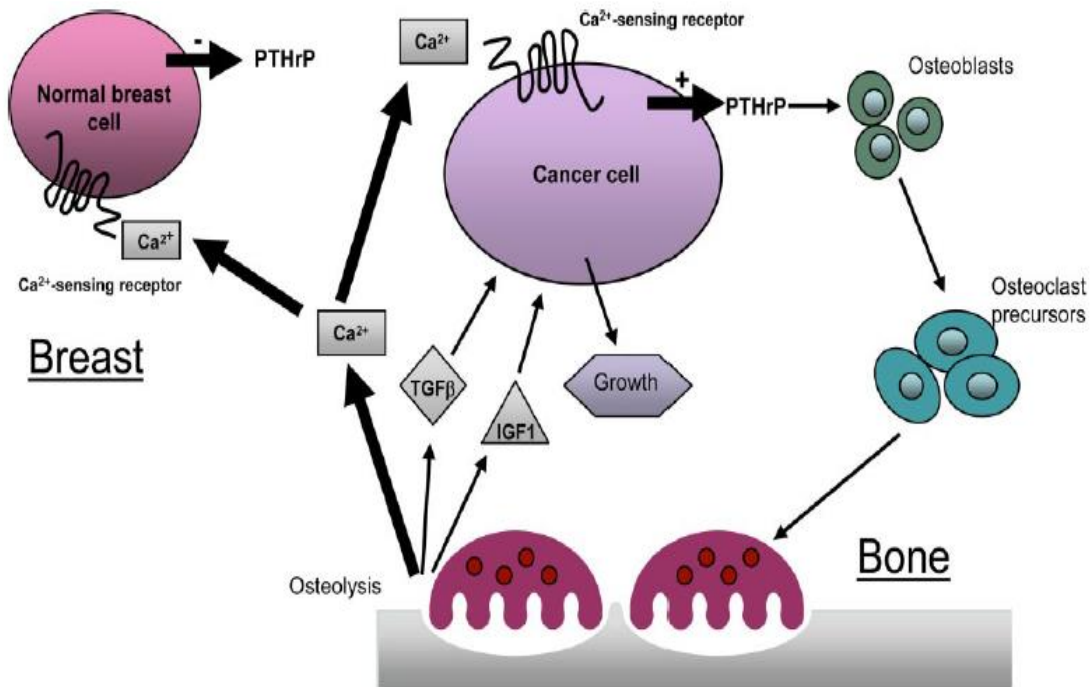
En el caso particular del cáncer de mama, el CaSR está implicado en favorecer la progresión tumoral. La expresión del CaSR en mama ha sido evaluada en estudios clínicos recientes y se ha encontrado que tanto las células epiteliales de mama normales, así como las tumorales expresan el receptor. Sin embargo, hay un aumento considerable de la expresión en células de cáncer de mama altamente metastásicas (Mihai *et al.*, 2006). En el caso de las líneas celulares utilizadas como modelos *in vitro* para el estudio del cáncer de mama, se ha visto que la expresión del CaSR está aumentada en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, ambas de origen tumoral, con respecto a la línea celular de

origen no tumoral MCF-10-A (Huang *et al*, 2009). En cáncer de mama, el CaSR está implicado en inducir la proliferación de las células tumorales, así como la secreción de diferentes factores quimiotácticos, angiogénicos y citocinas que modulan el microambiente tumoral y favorecen la progresión del cáncer. Igualmente está implicado en la expresión del canal no selectivo permeable a calcio TRPC1, asociado a la progresión de diversos tipos de tumores. Además, este receptor juega un papel crucial en la metástasis ósea de las células de cáncer de mama (Díaz-Soto *et al.*, 2016).

Una de las funciones mejor descritas para el CaSR en cáncer de mama es la de regular positivamente la resorción ósea en el contexto de la metástasis a hueso. En este proceso tiene un importante papel el péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP, del inglés *Parathyroid hormone-related protein*). En células epiteliales normales de mama, la activación del CaSR inhibe la secreción del PTHrP, siguiendo un patrón similar al de la PTH en paratiroides. Sin embargo, interesantemente la activación del CaSR en células de cáncer de mama induce aumentos en la secreción del PTHrP (Sanders *et al.*, 2000). El PTHrP induce la resorción ósea, incluyendo la formación y activación de los osteoclastos. La resorción ósea hace que se libere más calcio, lo que induce una mayor activación del CaSR en las células de cáncer de mama metastásico, generándose un círculo vicioso o proceso de retroalimentación positiva entre las células óseas y las células de cáncer de mama metastásico. La osteólisis también trae como consecuencia la liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento insulinoide-1 (IGF-1), los cuales favorecen el crecimiento y proliferación de las células de cáncer de mama metastásico (Saidak *et al*, 2009) (**Figura 6**). Esta modificación en el patrón de secreción del PTHrP entre células no tumorales y tumorales de mama está relacionado a un cambio de acople del CaSR con la proteína G en células tumorales. En éstas el receptor se acopla a la subunidad Gs, a diferencia de lo que ocurre en las células normales de mama donde el acoplamiento es con Gi. Debido a esta diferencia de acople en células tumorales se genera una mayor activación de la adenilato ciclasa, lo que genera aumentos en la producción de AMPc y del grado de activación de la PKA. Lo anterior trae como consecuencia aumentos en los niveles de expresión y secreción del PTHrP en células de origen tumoral (Mamillapalli *et al*, 2008).

En nuestro laboratorio, Hernández-Bedolla y colaboradores en 2014 demostraron que el CaSR regula la secreción de diversas citocinas, factores de crecimiento, quimiotácticos y angiogénicos que pueden modular el microambiente tumoral para favorecer la progresión del cáncer. Esto fue demostrado en la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231. Entre estos factores se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGF-4), proteína de unión al factor

de crecimiento insulinoide-2 (IGFBP-2) y la quimiocina derivada de macrófago (MDC) (Hernández-Bedolla *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Círculo vicioso de retroalimentación positiva entre las células de cáncer de mama metastásico y las células óseas. Mientras que, en células epiteliales de mama de origen no tumoral, el CaSR inhibe la secreción del PTHrP; en células de cáncer de mama metastásico, este receptor induce la secreción de este péptido. Una vez liberado éste induce la diferenciación de osteoblastos a precursores de osteoclastos, lo cual favorece la osteólisis o resorción ósea. Esta resorción ósea hace que se libere más calcio al medio, con lo cual se puede activar más el CaSR en las células de cáncer de mama, generándose así un ciclo de retroalimentación positiva. Además, la osteólisis conduce a la liberación de factores de crecimiento para la célula tumoral tales como el TGF- $\beta$  y el IGF-1 (Tomado de Saidak et al, 2009).

En posteriores trabajos de nuestro laboratorio nos ha interesado dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales el CaSR puede regular la secreción de citocinas, factores quimiotácticos y angiogénicos. Es sabido que antes de ser secretados los factores se almacenan y viajan en vesículas recubiertas de distintas proteínas que regulan la fusión de membranas y el sitio al cual se dirigirán estas durante su transporte por la célula. Entre estas proteínas se encuentran las SNARES y las Rab-GTPasas. En nuestro laboratorio, nos hemos interesado por estudiar la relación entre el CaSR y las Rab-GTPasas, en aras de dilucidar el posible mecanismo molecular que subyace a la secreción regulada por el CaSR.

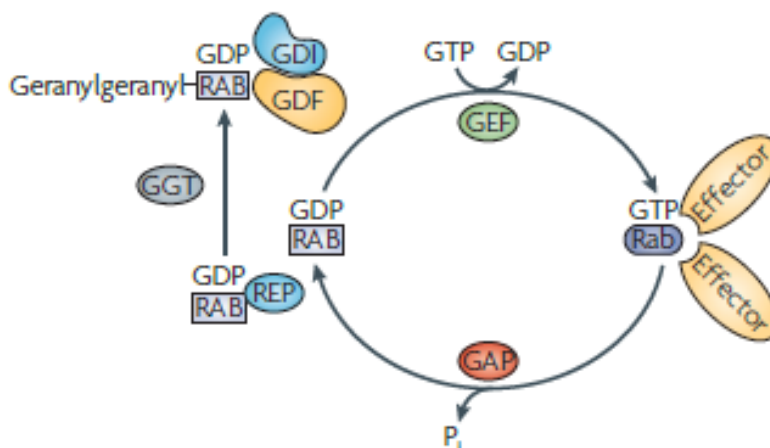
### **1.5. Rab-GTPasas**

Las Rab GTPasas constituyen una gran familia de GTPasas pequeñas que regulan la identidad de membranas, formación de vesículas, motilidad y fusión de membranas a través del reclutamiento de proteínas efectoras como activadoras de clasificación, factores de tethering, cinasas, fosfatasas y motores. Estas moléculas funcionan como interruptores moleculares que pasan de un estado inactivo (unido a GDP) a otro activo (unido a GTP) y viceversa. Las proteínas denominadas factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) favorecen el intercambio de GDP por GTP en las Rabs, induciendo su activación. Por otro lado, existen unas proteínas activadoras de GTPasas (GAP) que inactivan a las Rabs promoviendo su actividad enzimática GTPasa intrínseca y dejándolas nuevamente unidas a GDP. De modo que los GEFs y GAPs modulan a las Rabs regulando su paso de un estado inactivo a uno activo o viceversa, respectivamente. Las Rab GTPasas están ancladas a las membranas a través de su unión covalente a grupos geranyl-geranyl, a través de uno o dos residuos de cisteína del carboxilo terminal (**Figura 7**). La interacción de las Rabs con múltiples efectores como las SNARES o motores y con componentes de cubierta de las vesículas les permite orquestar el tráfico vesicular (Stenmark, 2009).

Las Rabs constituyen la familia más grande de proteínas implicadas en el tráfico de membranas en mamíferos. De hecho, se han encontrado más de 60 isoformas de Rabs en humanos. Distintos tipos de Rabs se asocian con distintas membranas en las células, lo que le da especificidad y direccionalidad al tráfico vesicular intracelular. Por ejemplo, Rab33 y Rab24 regulan la formación del autofagosoma. Rab8 media el tráfico biosintético constitutivo desde la red del trans-golgi a la membrana plasmática. Rab11 y Rab35 median el reciclamiento endocítico lento a través de los endosomas de reciclamiento mientras que Rab4 media el reciclamiento endocítico rápido directamente desde los endosomas tempranos. Rab3, Rab26, Rab27 y Rab 37 median varios tipos de eventos exocíticos regulados y Rab27 también media la translocación de los melanosomas hacia la periferia celular (Stenmark, 2009).

### **1.6. La GTPasa Rab27**

La Rab27 es una pequeña GTPasa que cumple múltiples funciones en la secreción y liberación de exosomas. Se ha encontrado un GEF específico para Rab27, el cual es conocido como MADD. Además de ello, se han encontrado dos GAPs con capacidad para inducir la actividad GTPasa de la Rab27 e inactivarla. A través de sus efectores Slps, Slac2s y rabfilina; la Rab27 contribuye a la formación de un complejo de transporte de vesículas formado por quinesina-1 y miosina VA-VIIA.



**Figura 7.** Las Rab GTPasas funcionan como interruptores moleculares que pasan de un estado inactivo (unido a GDP) y un estado activo (unido a GTP) y viceversa. Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) facilitan el intercambio de GDP por GTP en las Rabs, por lo que inducen su activación. Las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) facilitan la actividad enzimática de GTPasa intrínseca de las Rabs, induciendo la inactivación de éstas. La unión de las Rabs a grupos geranyl-geranyl les permite anclarse a membrana (Tomado de Stenmark, 2009).

Igualmente se han visto implicados estos efectores de Rab27 en la formación de un complejo de docking/tethering para las vías secretorias. Este complejo está integrado por la Rab27, uno de sus efectores y una proteína de membrana. El mismo facilita la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática. Existen dos variantes de la proteína Rab27 denominadas Rab27a y Rab27b. Inicialmente se creyó que las dos variantes de Rab27 tenían sólo funciones redundantes, ya que comparten los mismos efectores, GEFs y GAPs. Sin embargo, hoy se conoce que Rab27b puede actuar a través de mecanismos diferentes a Rab27a en distintos contextos fisiológicos celulares como en la exocitosis de gránulos de los neutrófilos. En la secreción de exosomas en células Hella se ha visto que Rab27a y Rab27b tienen diferente localización subcelular, contrastando con lo que ocurre en las células secretorias convencionales en las cuales ambas isoformas están presentes en gránulos secretorios (Fukuda, 2013). Además de ello se ha visto cierta diferencia entre los niveles de RNAm de Rab27b y Rab27a en biopsias de tumores de mama, siendo mayores los niveles de RNAm de Rab27b con respecto a los de Rab27a en este contexto patológico. Esto lleva a pensar que Rab27b pudiera tener un papel importante en la secreción de factores y citocinas en células de cáncer de mama (Hendrix *et al.*, 2010).

### 1.7. Papel de la GTPasa Rab27b en cáncer

La GTPasa Rab27b está estrechamente vinculada a la progresión de distintos tipos de cáncer, entre ellos el de mama. La expresión incrementada de esta GTPasa promueve la transición del ciclo celular de la fase G1 a S, aumentos en proliferación y en capacidad invasiva tanto en modelos *in vitro* como

*in vivo* de cáncer de mama. Además de esto, la expresión incrementada de esta proteína está asociada con un mal pronóstico para los pacientes que padecen de esta enfermedad. La presencia a nivel de RNAm o proteína de Rab27b, pero no de Rab3d ni Rab27a, fue asociada con las metástasis a nodos linfáticos y el grado de diferenciación o avance del tumor (Hendrix *et al.*, 2010).

En otros trabajos se ha reportado que la expresión incrementada de Rab27b induce aumentos de marcadores mesenquimales en células de cáncer de mama, o sea que esta sobreexpresión favorece la transición epitelio-mesénquima (TEM). También altos niveles de Rab27b se relacionan con el aumento de la agresividad y el potencial metastásico en cáncer de mama. De hecho, se plantea que la detección de Rab27b por técnicas de inmunohistoquímica en biopsias de cáncer de mama pudiera ser una herramienta efectiva para hacer predicciones sobre la supervivencia de pacientes con esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2012).

### **1.8. Evidencias previas de la relación entre el CaSR y la GTPasa Rab27b**

La Rab27b es la Rab GTPasa que más se ha visto relacionada con la secreción de citocinas y factores regulada por el CaSR (César Zavala, Tesis de doctorado en curso). Además de ello, la Rab27b, como se ha mencionado previamente, está estrechamente vinculada a la progresión del cáncer de mama. Por esta razón, nos ha interesado entender a profundidad la relación entre el CaSR y dicha GTPasa en el contexto de esta patología.

Resultados previos del laboratorio nos han mostrado que la secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos inducida por el CaSR ocurre a través de vesículas recubiertas de Rab27b. La participación de Rab27b en este proceso de secreción es clave, ya que cuando células MDA-MB-231 son transfectadas con un shRab27b, la secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos regulada por el CaSR se ve inhibida. Además de esto en nuestro laboratorio se ha comprobado que cuando el CaSR es estimulado con calcio y el calcimimético R-568 en células MDA-MB-231 aumentan los niveles de Rab27b unida a GTP (activa), o sea que el CaSR es capaz de aumentar el grado de activación de la Rab27b (César Zavala, Tesis de doctorado en curso). Adicionalmente se han desarrollado experimentos preliminares en los que al transfectar a las células MDA-MB-231 con un ShCaSR se disminuyen los niveles no sólo del CaSR sino también de Rab27b (Margarita Valadez, resultados no publicados). Esto nos hizo pensar que el CaSR pudiera estar regulando, no sólo la activación sino también los niveles de expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama. Este aumento en los niveles de expresión pudiera estar relacionado a un incremento de la secreción de citocinas y factores de crecimiento, quimiotácticos y angiogénicos; lo que conllevaría a que el tumor se vuelva mucho más agresivo.

## **Justificación**

El cáncer de mama constituye el tipo de tumor maligno más frecuente en mujeres en todo el mundo. Esta patología tiene una alta morbilidad y mortalidad, afectando la calidad de vida de los pacientes y cobrando la vida de millones de personas cada año. Es además la primera causa de muerte en mujeres mexicanas mayores de 22 años. Es por ello que entender los mecanismos moleculares que subyacen a esta patología es de vital importancia no sólo para entender con mayor profundidad esta enfermedad sino también para establecer nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Tanto el CaSR como la GTPasa Rab27b son moléculas que se han visto asociadas a la progresión del cáncer de mama; sin embargo, mucho queda por entender sobre las funciones de ambas proteínas en este contexto patológico. El presente trabajo pretende revelar nuevas funciones del CaSR en el contexto del cáncer de mama y esclarecer su relación con la GTPasa Rab27b. Todo ello permitirá no sólo entender mejor la función del CaSR en cáncer de mama, sino también reforzar a este GPCR y a la Rab27b como marcadores moleculares con valor diagnóstico y como blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

Todos los antecedentes previamente descritos nos condujeron a la siguiente hipótesis de investigación.

## **Hipótesis**

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR) promueve la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama.

Para demostrar la hipótesis de investigación nos planteamos el siguiente objetivo general.

## **Objetivo General:**

- Evaluar la participación del CaSR en la regulación de la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama.

Para dar cumplimiento a dicho objetivo general, lo desglosamos en los siguientes objetivos específicos.

## **Objetivos específicos:**

1. Evaluar los niveles de expresión de Rab27b en diferentes líneas celulares de mama (cancerosas o normales) ante la activación o inhibición del CaSR.
2. Evaluar el papel de la Proteína Cinasa A (PKA) así como de la maquinaria transcripcional y traduccional en la regulación de la expresión de Rab27b por activación del CaSR en células MCF-7.



El Receptor Sensor de Calcio (CaSR) promueve la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama

3. Determinar mediante herramientas bioinformáticas los posibles factores de transcripción que tentativamente se podrían unir al promotor del gen de Rab27b.
4. Evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de Rab27b en células de cáncer de mama en condiciones de hipoxia.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Líneas celulares y medios de cultivo

En el presente trabajo de tesis se utilizaron como modelos *in vitro* las líneas celulares MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231. La primera es una línea de epitelio de mama normal humano (no tumorigénica), proveniente de fibroma, que se cultiva en medio DMEM-F12 (3:1) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, Insulina (0.12 UI/ml), hidrocortisona (0.4 µg/ml) y EGF (20 ng/ml). La línea celular MCF-7 es proveniente de adenocarcinoma ductal de mama y se cultiva en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. La línea celular MDA-MB-231 es proveniente de adenocarcinoma luminal de mama y se cultiva en medio DMEM suplementado con 5% de SFB.

### 2.2. Curso temporal de la expresión de Rab27b luego de la activación del CaSR en células MDA-MB-231

Para determinar el curso temporal de la expresión de Rab27b luego de la activación del CaSR se sembraron 6 cajas de 60 mm, con células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con 2 ml de PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de CaCl<sub>2</sub> (medio de ayuno). Pasadas las 24 h del ayuno las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix, Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante tiempos de 0, 3, 6, 24 y 48 h. Pasados los diferentes tiempos de estimulación, las cajas se colocaron en una cama de hielo y el medio se aspiró por vacío. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y posteriormente se incubaron durante 10 min con 350 µl de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM, NaVO<sub>3</sub> 1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Posteriormente los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Terminado el tiempo de centrifugación se recuperaron los sobrenadantes y los mismos se congelaron a -70°C para su posterior cuantificación y análisis por Western blot de los niveles de las proteínas Rab27b, S6 y pS6.

### 2.3. Comparación de la expresión de Rab27b ante estímulos del CaSR en las líneas celulares MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231

Con el objetivo de comparar el efecto del CaSR sobre la expresión de Rab27b en diferentes líneas celulares de mama (cancerosas o normales) se sembraron 2 cajas de 60 mm, con células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de SFB, 2 cajas de 60 mm con células MCF-7 en medio

DMEM suplementado con 10% de SFB y otras 2 cajas con células MCF-10-A en medio DMEM-F12 (3:1) suplementado con SFB al 10%, Insulina (0.12 UI/ml), hidrocortisona (0.4 µg/ml) y EGF (20 ng/ml). Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de CaCl<sub>2</sub> (medio de ayuno). Pasadas las 24 h del ayuno las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix, Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Una caja sólo ayunada se utilizó como grupo no estimulado o basal. Luego de pasados los tiempos de estimulación, las cajas se colocaron en una cama de hielo y el medio de estímulo se aspiró por vacío. Las células se lavaron con 2ml de PBS 1X y posteriormente se incubaron durante 10 min con 350 µL de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasas (NaF 1 mM, NaVO<sub>3</sub> 1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Posteriormente los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Luego de concluida la centrifugación se recuperaron los sobrenadantes y los mismos se congelaron a -70°C para su posterior cuantificación y análisis por Western blot de los niveles de las proteínas Rab27b, Rab11, S6 y actina.

#### **2.4. Determinación de la expresión de Rab27b luego de la inhibición del CaSR con el modulador alostérico negativo NPS-2143 en células MCF-7**

Con el objetivo de evaluar el efecto del calcilítico NPS-2143 sobre la expresión de Rab27b promovida por activación del CaSR, se sembraron 4 cajas de 60 mm con células MCF-7 en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de CaCl<sub>2</sub> (medio de ayuno). A las 23 h de ayuno, a 2 de las cajas se le hicieron pretratamientos con el calcilítico NPS-2143 5 µM. A las 24 h de ayuno, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix, Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) en presencia o ausencia del calcilítico NPS-2143 5 µM durante 48 h. Dos cajas solamente ayunadas, una de ellas con pretratamiento con NPS-2143 5 µM se usaron como grupos no estimulados. Pasados los tiempos de estimulación, las células se colocaron en camas de hielo y el sobrenadante de cultivo se aspiró por vacío. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y luego se incubaron durante 10 min con 350 µL de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasas (NaF 1 mM, NaVO<sub>3</sub> 1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Posteriormente los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm

durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Luego de pasado el tiempo de centrifugación se recuperaron los sobrenadantes y los mismos fueron congelados a -70°C para su posterior cuantificación y análisis por Western Blot de los niveles de las proteínas Rab27b y S6.

### **2.5. Determinación del efecto de H89, un inhibidor de la PKA, sobre la expresión de Rab27b en células MCF-7**

Con el propósito de evaluar la participación de la PKA en el mecanismo a través del cual el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b se utilizó el inhibidor H89. Primeramente, se sembraron 4 cajas de 60 mm con células MCF-7 en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con 2 ml de PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de CaCl<sub>2</sub> (medio de ayuno). A las 23 h de ayuno, a 2 de las cajas se le hicieron pretratamientos con el inhibidor H89 a dos concentraciones diferentes: 10 µM o 135 nM. A las 24 h de ayuno, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix, Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) durante 48 h en ausencia o presencia del H89 135 nM o 10 µM. Una caja solamente ayunada se utilizó como grupo no estimulado. A las 24 h de iniciado el tratamiento se realizó una re-incubación con H89 a los dos grupos que desde el inicio tenían estos inhibidores para reforzar el efecto del mismo. Pasado el tiempo de estímulo, las células fueron puestas sobre camas de hielo y se aspiró el sobrenadante de cultivo por vacío. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y luego se incubaron durante 10 min con 350 µL de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM, NaVO<sub>3</sub> 1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Posteriormente los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Terminada la centrifugación se recuperaron los sobrenadantes y los mismos fueron congelados a -70°C para su posterior cuantificación y análisis por Western blot de los niveles de las proteínas Rab27b y actina.

### **2.6. Determinación de la expresión de Rab27b luego de la inhibición de la transcripción y la traducción en células MCF-7**

Para evaluar el efecto de la inhibición de los procesos de transcripción y la traducción sobre la expresión de Rab27b regulada por el CaSR, se sembraron 4 cajas de 60mm con células MCF-7 en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de CaCl<sub>2</sub> (medio de ayuno). A las 23 h de

ayuno, a una de las cajas se le hizo pretratamiento con el inhibidor de la transcripción (actinomicina 1 µg/ml) y a otra, con el inhibidor de la traducción (cicloheximida 70 µM). A las 24 h de ayuno, las células se lavaron con 2ml de PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix,  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) durante 48 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  en ausencia o presencia de la actinomicina 1 µg/ml o de la cicloheximida 70 µM. Una caja solamente ayunada se utilizó como grupo no estimulado. A las 24 h de iniciado el tratamiento, se realizó una re-incubación con actinomicina o cicloheximida en los grupos que desde el inicio tenían estos inhibidores. Pasados los tiempos de incubación, el medio de estímulo o de ayuno se aspiró por vacío. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y luego se incubaron durante 10 min con 350 µL de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Luego de terminada la centrifugación se recuperó el sobrenadante y los mismos fueron congelados a -70°C para su posterior cuantificación y análisis por Western Blot de los niveles de las proteínas Rab27b y actina.

## **2.7. Determinación de la expresión de Rab27b y Hif-1-α en condiciones de hipoxia ante estímulos del CaSR**

Para caracterizar el efecto de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR, se sembraron 4 cajas de 60 mm con células MDA-MB-231 y 4 cajas con células MCF-7 en medio DMEM suplementado con 5% de SFB para las MDA-MB-231 y con 10% de SFB para las MCF-7. Pasadas 24 h de la siembra, cuando las células alcanzaron la confluencia se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 24 h en medio sin suero y bajo calcio suplementado con 0.25 mM de  $\text{CaCl}_2$  (medio de ayuno). A las 24 h de ayuno, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con estímulos para el CaSR (medio mix,  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y el calcimimético R-568 1 µM) o medio de ayuno ( $\text{Ca}^{2+}$  0.25 mM), en ausencia o presencia de  $\text{CoCl}_2$  200 µM (que mimetiza el estado hipóxico de las células). Pasadas 24 h, las células MCF-7 o MDA-MB-231 se colocaron en una cama de hielo y los sobrenadantes de cultivo se recuperaron y congelaron a -70°C para futuros análisis. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X y luego se incubaron durante 10 min con 350 µL de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Leupeptina 10 µg/ml) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM y β-glicerol fosfato 10 mM). Los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga marca Eppendorf modelo centrifuge 5415R. Luego de terminada la centrifugación se recuperó el sobrenadante y los mismos

fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior cuantificación y análisis por Western Blot de los niveles de las proteínas Rab27b, actina y Hif-1- $\alpha$ .

## **2.8. Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras para Western blot**

Los lisados obtenidos de cada experimento fueron cuantificados mediante el método de Lowry. Para este se utilizó una curva patrón de Albúmina de Suero Bovino (BSA), preparada en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM y  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM). Se aplicaron 5  $\mu\text{l}$  de cada punto de la curva y de cada muestra a cuantificar por triplicado. Se añadieron 25  $\mu\text{l}$  el reactivo A+S (preparado con 2 ml del reactivo A y 40  $\mu\text{l}$  del reactivo S) del kit de cuantificación de proteínas de BioRad Catálogo # 500-0115. Posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo B del kit de cuantificación de proteínas de BioRad Catálogo # 500-0115. Se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se leyó la absorbancia a 750 nm en lector de ELISA. Los resultados de la cuantificación fueron procesados usando el software GraphPadPrism, versión 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Un valor de  $R^2 > 0.97$  fue aceptado como buen ajuste de la curva patrón de BSA.

Las muestras se prepararon para su posterior separación por electroforesis y análisis por Western blot de la siguiente manera: se tomó el volumen necesario de cada muestra que contuviera 100  $\mu\text{g}$  de proteína, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de buffer tampón de muestra 4X con  $\beta$ -mercaptoetanol y se completó hasta 200  $\mu\text{l}$  con buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM y  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM), quedando cada muestra a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Estos lisados se hirvieron durante 5 min y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por Western blot.

## **2.9 Western blot**

Un volumen de 40  $\mu\text{l}$  de los lisados preparados (20  $\mu\text{g}$  de proteína total) se cargó en geles de poliacrilamida al 10% y se corrieron a 120 V, usando buffer de corrida SDS-PAGE 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.01%). Posteriormente los geles fueron transferidos durante 2.5 h a 320 mA a membranas de PVDF previamente activadas con metanol. Después de transferida la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.05% (Tris 2.42 g-NaCl 17.53 g-Tween 0.05%) en agitación durante 5 min cada lavado. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche descremada Svelty al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 1 h en agitación constante. Luego del bloqueo, la leche se retiró y el excedente se lavó con agua bidestilada. A continuación, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05% de 5 min cada uno. En este punto las membranas se cortaron a nivel de las proteínas de interés

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR) promueve la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama

usando como guía el marcador de pesos moleculares y se incubó cada fragmento de membrana con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Los distintos anticuerpos primarios fueron preparados en las diluciones adecuadas para cada uno previamente probadas en nuestro laboratorio (**Tabla 1**). Posteriormente los anticuerpos primarios fueron recuperados y se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween 0.05% durante 5 min cada lavado. Las membranas se incubaron entonces durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes en las diluciones adecuadas (**Tabla 1**). Pasado este tiempo se lavaron con abundante agua bidestilada para eliminar el exceso de leche y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05% cada uno durante 5 min en agitación. Posteriormente se realizó un último lavado con TBS sin Tween.

**Tabla 1.** Diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios y secundarios de Western blot

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución (en TBS-Tween 0.05%)</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución (en Leche 5%TBS-Teewn 0.05%)</b>
Anti-Rab27b	1:30,000	Anti-conejo	1:10,000
Anti-Rab11	1:250	Anti-conejo	1:5,000
Anti-S6	1:5,000	Anti-conejo	1:15,000
Anti-pS6	1:30,000	Anti-conejo	1:20,000
Anti-Actina	1:20,000	Anti-ratón	1:30,000
Anti-Hif-1- $\alpha$	1:500	Anti-conejo	1:10,000
Anti-StamBP	1:5,000	Anti-cabra	1:20,000

El revelado de las membranas se realizó usando el sustrato luminol y solución *westpico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific 34080)* con peróxido de hidrógeno a una dilución 1:1 (vol:vol), se homogenizó y se añadió a la membrana durante 1 min. Se eliminó el exceso de mezcla de la membrana, se cubrió con una película plástica y se colocó en un cassette para autorradiografía. Una vez en el cuarto oscuro, se tomó una placa para rayos X (Afga Gevaert) y se usó por contacto a diferentes tiempos con la membrana. Se revelaron con revelador y fijador de la marca *Care Stream*

dental. Las placas se dejaron secar y posteriormente se marcaron los pesos moleculares en estas de acuerdo con el marcador. La cuantificación densitométrica se realizó empleando el software *Image J*.

### **2.10. Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que se unen al gen de Rab27b**

La secuencia del gen de Rab27b se obtuvo de la base de datos Ensembl en la dirección <https://www.ensembl.org/index.html>, la misma fue descargada con una secuencia de 1000 pb en la región 5' flanqueante del primer exón. El análisis de los factores de transcripción que putativamente pueden unirse a este segmento de 1000 pb río arriba del primer exón del gen de Rab27b se realizó mediante el programa bioinformático ALGGENE PROMO ([http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)). Se evaluaron los factores de transcripción para toda la región con margen de disimilitud menor al 15% en un primer análisis y luego con uno menor al 1% en el programa ALGGENE PROMO. Los resultados obtenidos a través de esta herramienta bioinformática se contrastaron con los obtenidos mediante el análisis del gen en el software Gen Promoter Miner (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>). Para detectar el promotor más probable en esta región se usó el programa Berkeley Drosophila Genome Project [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

### **2.11. Análisis Estadístico**

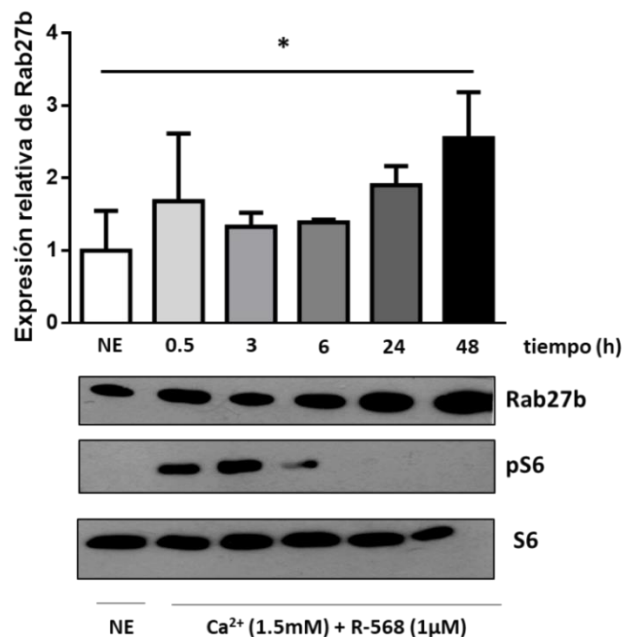
El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la aplicación de pruebas de comparación múltiple de medias de Bonferroni o Tuckey o a través de una prueba *t* de student. Para ello se usó el software *GraphPadPrism*, versión 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .



### 3. Resultados

#### 3.1. La activación del CaSR durante 48 horas induce un aumento significativo de la expresión de Rab27b en células MDA-MB-231

Con el objetivo de evaluar el efecto de la activación del CaSR sobre la expresión de Rab27b primeramente se decidió llevar a cabo un curso temporal de la expresión de esta Rab GTPasa ante estímulos del CaSR. Para ello células de la línea de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 fueron estimuladas con  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y el calcimimético R-568 1  $\mu\text{M}$  durante tiempos de 0, 3, 6, 24 y 48 h. Pasados estos tiempos se lisaron las células y se evaluó la expresión de Rab27b mediante Western blot. El resultado de esta evaluación por Western blot mostró que existe una tendencia al aumento de la expresión de Rab27b en el tiempo cuando el CaSR es estimulado, con una diferencia estadísticamente significativa luego de las 48 h de estímulo (**Figura 8**). Este resultado demostró que el CaSR fue capaz de regular positivamente la expresión de Rab27b en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y que la cinética de este proceso fue relativamente lenta, dado que se requirieron tiempos largos de estimulación para obtener una diferencia estadísticamente significativa.



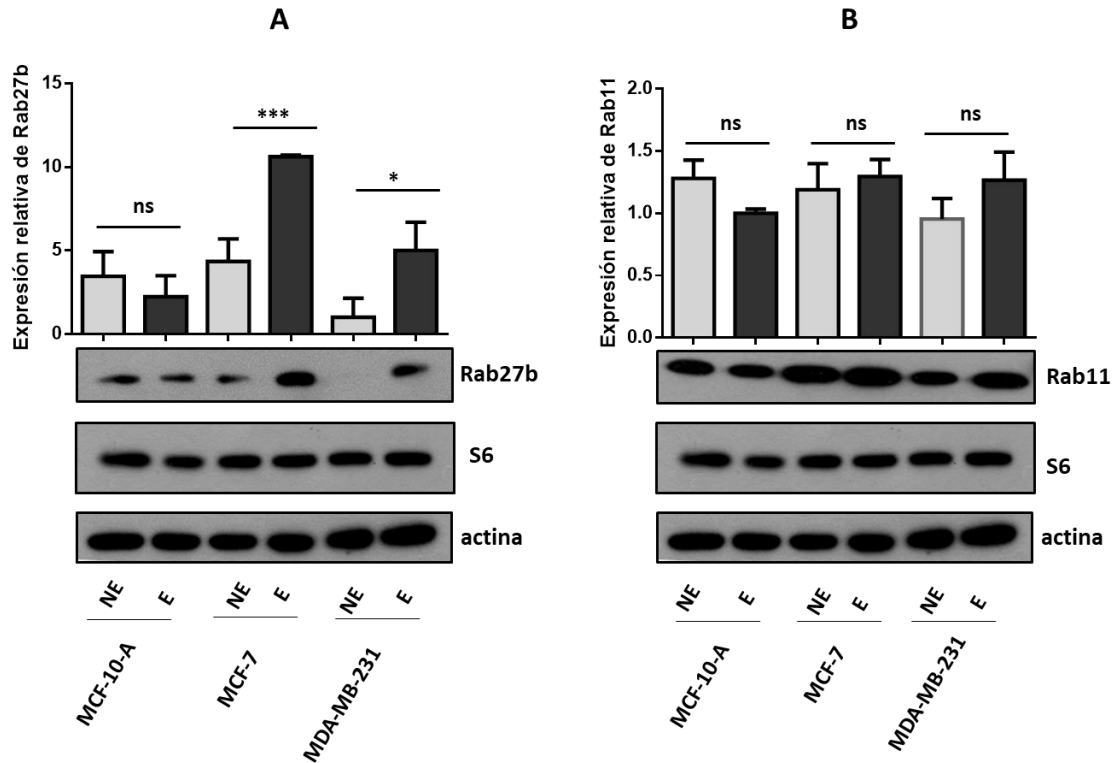
**Figura 8.** Curso temporal de la expresión de Rab27b ante estímulos del CaSR en células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron ayunadas de suero durante 24 h a 37°C con medio bajo  $\text{Ca}^{2+}$  (0.25 mM). Las células fueron estimuladas durante 3, 6, 24 y 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y R-568 1  $\mu\text{M}$ . Se muestran las medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test de Tuckey, \* $p < 0.05$ . La condición no estímulo (NE) corresponde a la expresión basal de Rab27b, células que fueron sólo ayunadas.

Además, se evaluó la expresión de la proteína S6 como control de carga y la fosforilación de S6 como prueba de la activación del CaSR, dado que esta proteína se encuentra río abajo en una de las vías activadas por el receptor. Se encontró que la fosforilación de la proteína S6 comienza desde la 0.5 h de estímulo del CaSR, con un pico máximo a las 3 h y ya para las 6 h comienza a disminuir hasta que decae totalmente su activación para las 24 y 48 h. (**Figura 8**).

### **3.2. El CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en células de origen tumoral pero no en células de origen epitelial normal de mama**

En este punto surgió la inquietud de si el hecho de que el CaSR promueve la expresión de Rab27b sería un evento particular de la línea celular MDA-MB-231 o si también ocurriría en otras líneas de origen tumoral de mama o de epitelio normal de mama. Para dar respuesta a esta interrogante se desarrolló un experimento usando 3 líneas celulares de mama de diferente origen: MCF-10-A (epitelial no tumorigénica), MCF-7 (adenocarcinoma basal de mama) y la propia MDA-MB-231 (adenocarcinoma luminal de mama). Estas células fueron ayunadas con medio bajo calcio y posteriormente estimuladas con 1.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 1  $\mu\text{M}$  de R-568 durante 48 h, como control de basal se utilizaron células sólo ayunadas, sin ningún tipo de estimulación para cada línea celular. Posteriormente se evaluó la expresión de Rab27b para cada una de estas líneas en condiciones basal y estimulada (**Figura 9A**). El resultado de este experimento mostró que cuando el CaSR fue estimulado durante 48 h en células de origen tumoral de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), la expresión de Rab27b aumentó significativamente con respecto a la condición basal. Este aumento fue mucho más significativo para la línea celular MCF-7 que para la MDA-MB-231, por lo que la MCF-7 constituye un mejor sistema *in vitro* para evaluar el evento molecular en estudio. Interesantemente, a diferencia de lo ocurrido para las líneas de cáncer de mama, en el caso de la línea de origen tumoral MCF-10-A la activación del CaSR no indujo aumentos de la expresión de Rab27b, de hecho, se encontró una tendencia a la disminución, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Esto sugiere que el hecho de que el CaSR regule positivamente la expresión de Rab27b pudiera ser un evento específico de células de cáncer de mama y no del epitelio de mama normal, aunque se requieren estudios similares en otras líneas de origen tumoral y no tumoral para confirmar con más fuerza esta aseveración.

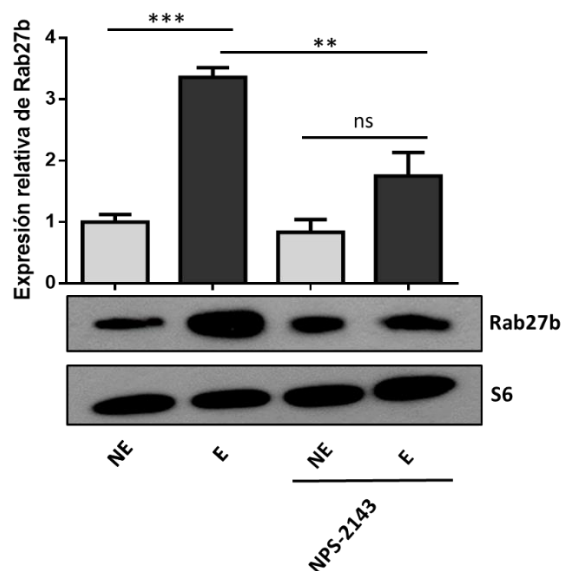
Por otro lado, con el fin de evaluar si el CaSR activa la expresión de otras GTPasas también se determinó la expresión de la GTPasa Rab11, que forma parte de los endosomas de reciclamiento lento (**Figura 9B**). En este caso cuando el CaSR fue activado no se observaron aumentos significativos en la expresión de Rab11 con respecto a la condición basal en ninguna de las tres líneas celulares estudiadas. Lo anterior demostró que el efecto de regulación positiva de la expresión inducida por el CaSR no es un evento general para todas las Rabs y sugiere que pudiera ser específico para Rab27b.



**Figura 9.** Efecto de la activación del CaSR sobre los niveles de expresión de Rab27b y Rab11 en células MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231. **A.** La expresión de la GTPasa Rab27b es regulada positivamente por activación del CaSR en las líneas celulares de origen tumoral (MCF-7 y MDA-MB-231) pero no en la línea celular de origen no tumoral (MCF-10-A). Las células pertenecientes a las 3 líneas celulares fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ). Como condición basal se usaron células solamente ayunadas, sin ningún tipo de estímulo para cada línea celular. Se muestran las medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. La prueba estadística utilizada fue un test de Bonferroni, ns-no significativa, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ . **B.** La expresión de la GTPasa Rab11 (presente en endosomas de reciclamiento lento) no es regulada por el CaSR en líneas celulares de origen tumoral (MCF-7, MDA-MB-231) ni en la línea de origen no tumoral (MCF-10-A). Las células pertenecientes a las 3 líneas celulares fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ). Como condición basal se usaron células solamente ayunadas, sin ningún tipo de estímulo para cada línea celular. Se muestran las medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. La prueba estadística utilizada fue un test de Bonferroni, ns-no significativa.

### 3.3. El calcilítico NPS-2143 inhibe la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR en células MCF-7

Con el propósito de comprobar con mayor especificidad el papel del CaSR en la regulación de la expresión de Rab27b, decidimos evaluar el efecto sobre este proceso del NPS-2143, que es un modulador alostérico negativo del CaSR (Alfadda *et al*, 2014). Para ello se compararon los niveles de expresión de Rab27b entre células en condición no estimulada y estimulada con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia del NPS-2143 (**Figura 10**).



**Figura 10.** La regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por estímulos del CaSR se inhibe con el modulador alostérico negativo NPS-2143 en células MCF-7. Las células MCF-7 fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ) (E) en presencia o ausencia del calcilítico NPS-2143. NE-células solamente ayunadas, sin ningún tipo de estímulo, en presencia o ausencia del NPS-2143. Se muestran las medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. La prueba estadística utilizada fue un test de Bonferroni, ns-no significativa, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

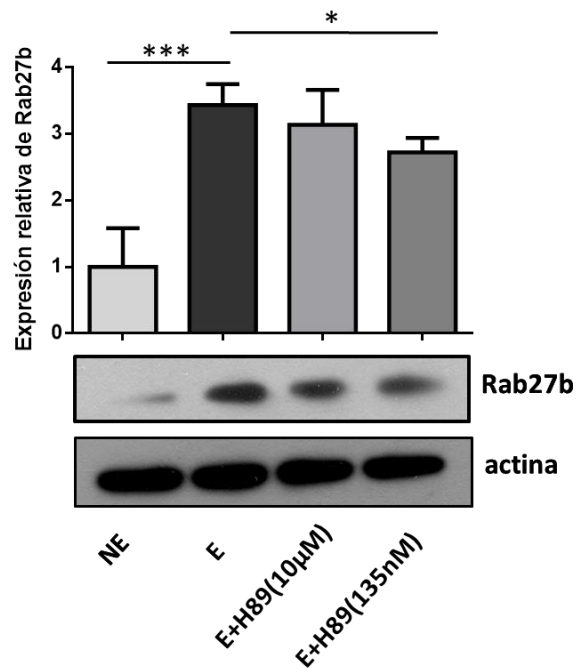
Los resultados de estos experimentos mostraron nuevamente que la activación del CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en la línea células de cáncer de mama MCF-7. Lo interesante aquí es que esta regulación positiva se perdió cuando las células fueron tratadas con el modulador alostérico negativo del CaSR, NPS-2143. Esto constituye una prueba fehaciente del papel del CaSR en la regulación de los niveles de esta GTPasa en células de cáncer de mama.

### 3.4. La Proteína Cinasa A (PKA) participa en la regulación positiva de la expresión de Rab27b ejercida por el CaSR en células MCF-7

La regulación positiva ejercida por el CaSR sobre los niveles de la proteína Rab27b se encontró sólo en células de origen tumoral y no en las células MCF-10-A de epitelio normal de mama. Debido a que se ha reportado una mayor activación de la PKA cuando el CaSR es estimulado en células de cáncer de mama a través de la vía *Gas*-adenilato ciclasa- AMPc; nos preguntamos si la PKA pudiera estar involucrada en el mecanismo a través del cual el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b. Para evaluar esta posibilidad, células MCF-7 fueron estimuladas con  $\text{Ca}^{2+}$  y R-568 durante 48 h en presencia o ausencia del inhibidor de la PKA H89. El mismo se probó en dos concentraciones diferentes, una de 10  $\mu\text{M}$  que es la que clásicamente se usa, pero que se ha demostrado que no sólo inhibe a la PKA sino al menos a otras 8 cinasas. La otra concentración probada fue la de 135 nM, que

previamente se había demostrado que es la concentración efectiva media para inhibir específicamente a la PKA (Lochner & Moolman, 2006).

Interesantemente se encontró que el tratamiento de las células con H89 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  no inhibió el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre los niveles de la proteína Rab27b mientras que cuando se usó la concentración específica para inhibir sólo a la PKA (H89 135 nM) sí se disminuyó parcialmente la regulación positiva ejercida por el CaSR sobre la expresión de Rab27b (**Figura 11**). Este resultado sugiere que la PKA activada por el CaSR pudiera estar mediando los aumentos en los niveles de expresión de Rab27b en células de cáncer de mama, aunque no se descarta que otras vías activadas por el CaSR también puedan estar implicadas en este proceso.

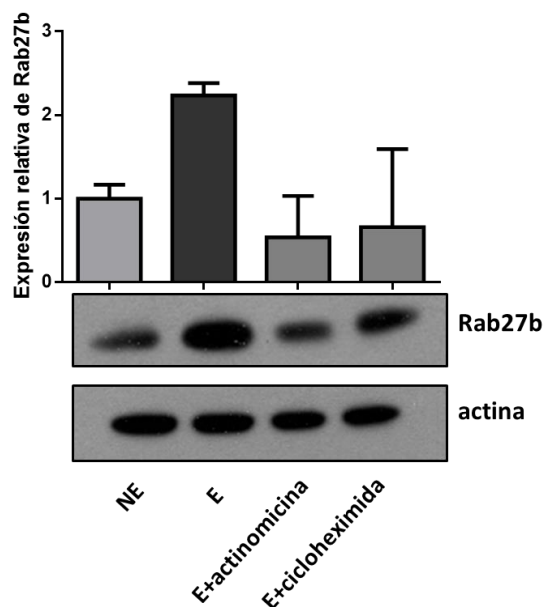


**Figura 11.** El inhibidor de la PKA (H89) abroga parcialmente la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR. Las células MCF-7 fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia del inhibidor de la PKA (H89) a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  o 135 nM. Como condición basal se usaron células solamente ayunadas, sin ningún tipo de estímulo. Se muestran las medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se usó una prueba *t* de student, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

### 3.5. Los mecanismos transcripcionales y traduccionales celulares están implicados en la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR en células MCF-7

El CaSR una vez estimulado a través de diferentes vías de señalización puede activar factores de transcripción (Thiel, Lesch, & Keim, 2012). Debido a esto, nos preguntamos si el hecho de que el CaSR induzca aumentos en los niveles de expresión de Rab27b necesita del correcto funcionamiento

de la maquinaria transcripcional y traduccional, lo que nos permitiría esclarecer el mecanismo a través del cual el receptor ejerce su efecto sobre la GTPasa. Con el propósito de evaluar el papel de la maquinaria transcripcional y traduccional celular en la regulación positiva ejercida por el CaSR sobre la expresión de Rab27b, se evaluaron los niveles de esta GTPasa en condición basal, así como ante estímulos de  $\text{Ca}^{2+}$  y R-568 en presencia o ausencia de actinomicina (inhibidor de la transcripción) y cicloheximida (inhibidor de la traducción).

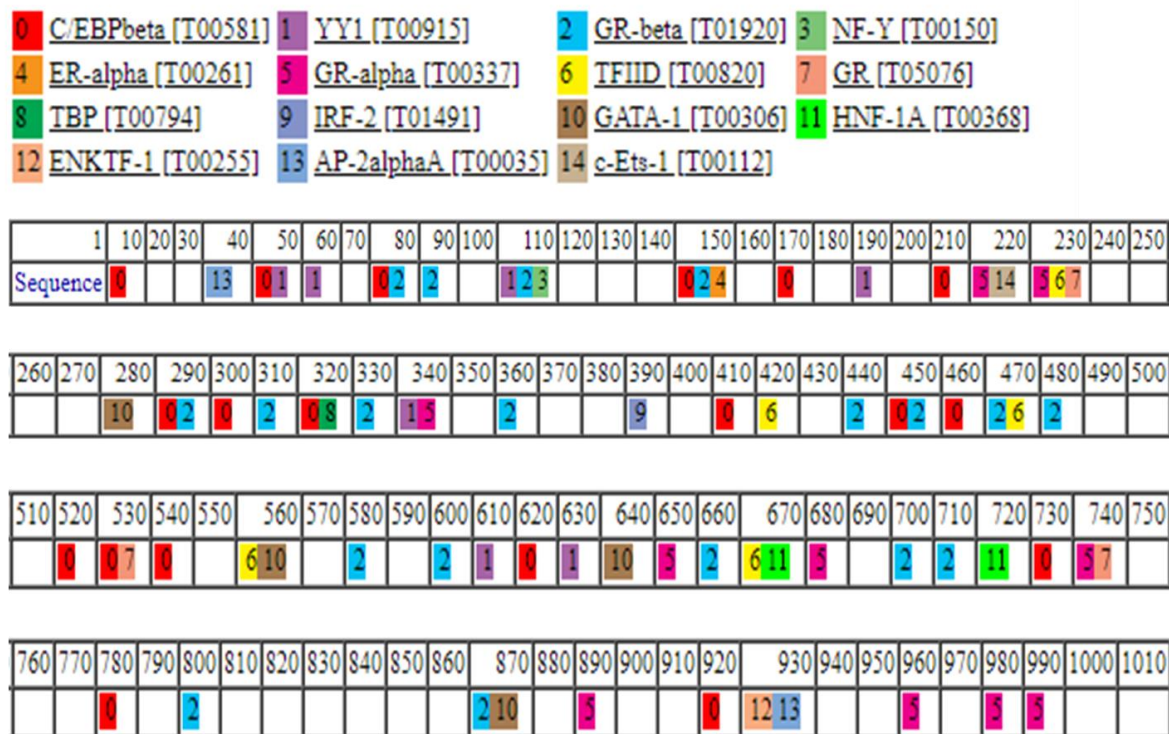


**Figura 12.** La inhibición de la transcripción con actinomicina y de la traducción con cicloheximida abrogan la regulación positiva de la expresión de Rab27b inducida por el CaSR. Las células MCF-7 fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 48 h con  $\text{Ca}^{2+}$  (1.5 mM) y R-568 (1  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia del inhibidor de la transcripción (actinomicina 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y de la traducción (cicloheximida 70  $\mu\text{M}$ ). Como condición basal se usaron células solamente ayunadas, sin ningún tipo de estímulo. Se muestran las medias  $\pm$  SD de 2 experimentos independientes.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que cuando el CaSR fue estimulado en presencia del inhibidor de la transcripción (actinomicina), se abrogó la regulación positiva ejercida sobre la expresión de Rab27b, llegando la expresión de esta proteína hasta niveles basales. La inhibición de la maquinaria traduccional también ejerció un efecto negativo sobre los niveles de Rab27b cuando el CaSR fue estimulado, aunque la disminución fue menor a la encontrada cuando se inhibió la maquinaria transcripcional (**Figura 12**). Estos resultados, aunque son preliminares, muestran que tanto la maquinaria transcripcional como la traduccional están implicadas en la regulación positiva de la expresión de Rab27b ejercida por el CaSR.

### 3.6. Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que pueden unirse al gen de Rab27b

El hecho de que la maquinaria transcripcional sea necesaria como parte del mecanismo mediante el cual el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b sugiere que probablemente el receptor activa algún o algunos factores de transcripción que pudieran estar induciendo la expresión del gen de Rab27b. Esto nos condujo a realizar un análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que se unen a este gen. Para ello se descargó la secuencia del gen a través de la base de datos *Ensembl* y se seleccionó para el análisis un fragmento de 1000 pares de bases río arriba del nucleótido de inicio del primer exón del gen. Se utilizó la herramienta bioinformática ALGGEN PROMO para el análisis de los factores de transcripción que tentativamente se unen a esta región promotora del gen (**Figura 13**).



**Figura 13.** Análisis bioinformático de los posibles factores de transcripción que putativamente se unen a la región río arriba del primero exón del gen de Rab27b. Se descargó la secuencia del gen de Rab27b de la base de datos *Ensembl* y se escogió un segmento con una longitud de 1000pb en la región flanqueante 5' del primer exón del gen. Para la detección de los factores de transcripción se utilizó el programa bioinformático ALGGEN PROMO. El mismo arrojó que se pueden unir a esta región promotora hasta 14 posibles factores de transcripción. Los factores fueron predichos dentro de un margen de disimilitud menor o igual al 1%.

El análisis bioinformático mostró que a la región flanqueante 5' del gen de Rab27b tentativamente se pueden unir hasta 65 factores de transcripción diferentes si se utiliza un margen de disimilitud menor al 15%. Para hacer más estricto el análisis decidimos realizar nuevamente el mismo fijando un margen de disimilitud menor al 1% y obtuvimos que existen 14 factores de transcripción que tentativamente pueden unirse a esta región del gen de Rab27b bajo esta condición. Varios de los factores de transcripción encontrados presentan diferentes sitios posibles de unión en la secuencia. Haciendo uso del programa bioinformático *Berkeley Drosophila Genome Project* se dedujo que el promotor más probable se encuentra entre los nucleótidos 660 y 710 de este segmento del gen. De los 14 factores putativos que pueden unirse al segmento de 1000 nucleótidos, 4 se unen específicamente a esta región promotora más probable, estos son GR- $\alpha$ , GR- $\beta$ , TFIID y HNF-1A. Es interesante señalar que, de estos factores, el receptor de glucocorticoides (GR, del inglés *Glucocorticoid Receptor*) se encuentra vinculado a la progresión del cáncer de mama y a su vez puede ser activado por la PKA. Independientemente de que éste sea el sitio promotor más probable, no se pueden descartar otros factores de transcripción que se pueden unir a otras regiones de esta secuencia río arriba del primer exón. Entre ellos los factores de transcripción AP-2- $\alpha$  (Proteína activadora 2-alfa), GATA-1, YY1 (Ying-Yang-1), IRF-2 (Factor regulatorio de Interferones -2) y ER- $\alpha$  (Receptor a estrógenos- $\alpha$ ) resaltan por el hecho de que, al igual que GR, son factores implicados en la progresión de los tumores de mama y/o son activados por la PKA.

### 3.7. La hipoxia potencia el efecto ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b

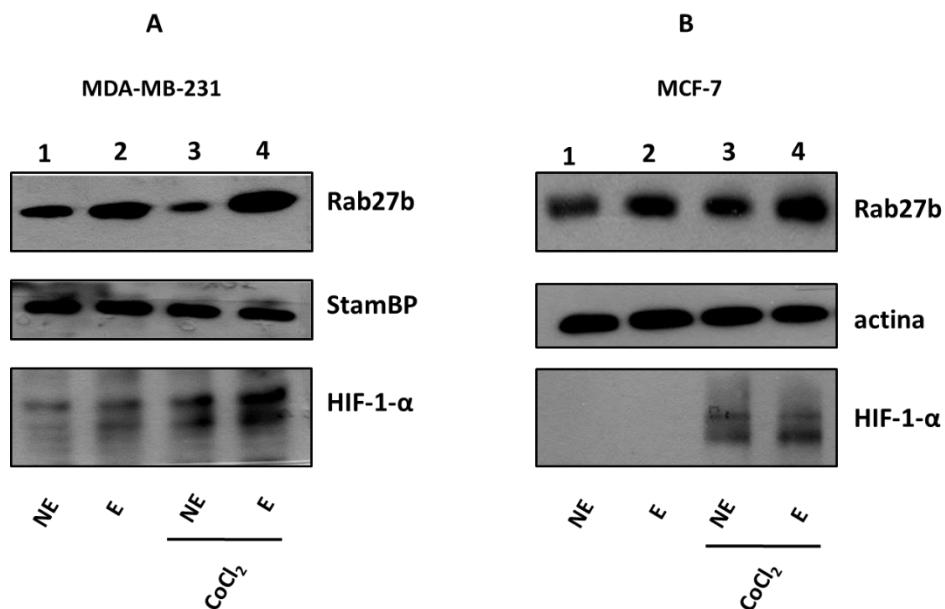
Está bien descrito en la literatura que la generación de un microambiente tumoral hipóxico potencia la agresividad de muchos tumores malignos, entre ellos los que se desarrollan en tejido mamario. Los aumentos en los niveles del factor de transcripción HIF-1- $\alpha$ , en condiciones de baja presión parcial de oxígeno, hacen que esta proteína induzca la expresión de múltiples genes asociados con una mayor agresividad del cáncer. Por ello nos preguntamos si la simulación de las condiciones de hipoxia en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 podría potenciar el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre los niveles de expresión de la proteína Rab27b. Para comprobar esta hipótesis, células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas durante 24 h con medio bajo  $\text{Ca}^{2+}$  0.25 mM o estimuladas con  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM y R-568 1  $\mu\text{M}$ . Ambas condiciones fueron probadas en presencia o ausencia de  $\text{CoCl}_2$  200  $\mu\text{M}$ , ya que se ha visto que esta sal simula la condición de hipoxia al inducir aumentos en los niveles de la proteína Hif-1- $\alpha$  (Wu & Yotnda, 2011).

Como puede observarse en la **Figura 14A**, la activación del CaSR indujo aumentos en los niveles de expresión de Rab27b en condiciones de normoxia en la línea celular MDA-MB-231, pero este aumento de los niveles de la GTPasa fue mucho más pronunciado cuando el CaSR fue estimulado en



condiciones similares a la hipoxia tumoral. Además de ello en este ensayo se evaluaron los niveles de HIF-1- $\alpha$  con objetivo de comprobar la correcta simulación de la condición de hipoxia con el CoCl<sub>2</sub>. En la **Figura 14A** se puede observar que el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> indujo aumentos en los niveles de la proteína Hif-1- $\alpha$  en las células MDA-MB-231, lo que le dio validez al método de mimetización de la condición hipóxica. Interesantemente, encontramos que cuando el CaSR fue activado tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, los niveles de Hif-1- $\alpha$  se incrementaron con respecto a la condición de no estímulo del CaSR. Además, se determinaron los niveles de la proteína StamBP, los cuales no se vieron modificados en todas las condiciones probadas, por lo que sirvieron como controles de carga del mismo.

El experimento realizado en células MCF-7 (**Figura 14B**) también demostró que la activación del CaSR en condiciones de normoxia induce aumentos en los niveles de Rab27b, pero estos aumentos se encontraron aún más incrementados en condiciones similares a la hipoxia. Igualmente, la incubación con CoCl<sub>2</sub> funcionó como método para simular la hipoxia ya que se constató un incremento considerable de los niveles de Hif-1- $\alpha$  en presencia de esta sal. También se encontró un ligero aumento de los niveles de Hif-1- $\alpha$  en condición de hipoxia con el CaSR estimulado con respecto a la condición de no estímulo, aunque este aumento no fue tan marcado como el encontrado en células MDA-MB-231.



**Figura 14.** La inducción de hipoxia por incubación con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M potencia el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b en células MDA-MB-231 (A) y MCF-7 (B). Las células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron ayunadas durante 24 h con medio bajo calcio (0.25 mM). Posteriormente fueron estimuladas durante 24 h con Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM y R-568 1  $\mu$ M en presencia o ausencia de CoCl<sub>2</sub> para simular la condición hipóxica. Como condición basal se usaron células tratadas durante 24 h con medio bajo Ca<sup>2+</sup> 0.25 mM en ausencia o presencia de CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M.

Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren que la hipoxia que se genera en los tumores pudiera estar potenciando el hecho de que el CaSR regule positivamente la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama.

## 4. Discusión

El papel que juega el Receptor Sensor de Calcio (CaSR) en cáncer ha resultado un tema polémico, puesto que en dependencia del tipo de tumor el CaSR puede funcionar como oncogén como ocurre en cáncer de mama y de próstata o como gen supresor de tumores, como en el caso de cáncer de colon y paratiroides (Tennakoon *et al.*, 2016). En cáncer de mama está bien descrito que el CaSR cumple diversas funciones que favorecen la progresión tumoral. Entre ellas está la de regular positivamente la secreción del PTHrP, que promueve la osteólisis en el contexto de la metástasis ósea, lo cual genera la liberación de calcio que activa más al CaSR generándose un círculo vicioso (Sanders *et al.*, 2000; Saidak *et al.*, 2009). Además de esto el CaSR regula a través de diferentes vías de señalización la secreción de múltiples factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas que pueden modular el microambiente tumoral, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Hernández-Bedolla *et al.*, 2015). Debido a la importancia de la secreción regulada por el CaSR en el contexto del cáncer de mama resulta de gran interés entender los mecanismos moleculares que median estos procesos de secreción. En nuestro laboratorio se ha encontrado que la GTPasa Rab27b juega un papel primordial en la secreción de factores regulada por el CaSR, puesto que en ausencia de esta GTPasa la secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos se ve considerablemente disminuida. Además de esto, se ha comprobado que cuando el CaSR es estimulado induce la activación de la GTPasa Rab27b, promoviendo su unión a GTP (César Zavala, tesis de doctorado en curso). Por ello en el presente trabajo nos propusimos profundizar en la relación entre ambas proteínas, evaluando el papel que tiene el CaSR en la regulación de los niveles de expresión de la GTPasa Rab27b.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en células de origen tumoral de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) pero no en las células de epitelio de mama normal (MCF-10-A). Mientras que cuando se realizó el análisis para la GTPasas Rab11, involucrada en mecanismos de reciclamiento lento, el comportamiento fue completamente diferente, lo que sugiere que pudiera ser un evento específico para la regulación de Rab27b. Además, el presente trabajo mostró que en células MCF-7 el NPS-2143, modulador alostérico negativo del CaSR, puede inhibir la regulación positiva de la expresión de Rab27b. También encontramos que el CaSR pudiera estar regulando positivamente la expresión de Rab27b a través de la activación de la PKA, probablemente activando algún factor de transcripción dado que la inhibición de la maquinaria transcripcional abrogó completamente la regulación positiva ejercida por el CaSR sobre la expresión de Rab27b. Según un análisis bioinformático realizado en la región 5' que flanquea al primer exón del gen que codifica para Rab27b, existen una serie de factores de transcripción que putativamente pudieran unirse a esta región y a su vez pueden ser activados por la

PKA y/o juegan un papel crucial en la progresión del cáncer de mama. Entre estos se encuentra GR (receptor de glucocorticoides), AP-2- $\alpha$  (Proteína activadora 2-alfa), GATA-1, YY1 (Ying-Yang1), IRF-2 (Factor regulatorio de Interferones -2) y ER- $\alpha$  (Receptor a estrógenos- $\alpha$ ). De manera interesante también encontramos que la simulación de condiciones de hipoxia *in vitro*, induciendo el aumento de los niveles de Hif-1- $\alpha$  por tratamientos con CoCl<sub>2</sub>, potencia el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre los niveles de expresión de Rab27b.

El hecho de que el CaSR regule positivamente la expresión de Rab27b en células de origen tumoral y este efecto no se manifieste en células MCF-10-A de epitelio normal de mama sugiere que la inducción de la expresión de Rab27b puede ser un mecanismo que surge luego de la transformación maligna de las células epiteliales de mama. Además, implica una nueva función para el CaSR en el contexto de cáncer de mama: inducir la expresión de una GTPasa que se asocia a vesículas secretorias y permite la translocación de estas hacia la periferia celular y su fusión con la membrana plasmática. El aumento en expresión de Rab27b inducido por el CaSR es probablemente un mecanismo desarrollado por las células tumorales para aumentar la secreción de factores de crecimiento que permiten su proliferación, citocinas que modulen el microambiente tumoral inmune a su favor e induzcan inflamación pro-tumoral, así como quimiocinas y otros factores angiogénicos que favorezcan el reclutamiento de células endoteliales para la formación de vasos sanguíneos necesarios para la metástasis.

Una posible explicación al hecho de que el CaSR induzca la expresión del gen de Rab27b en células de cáncer de mama y no en epitelio normal de mama puede ser el hecho de que este GPCR se acopla a Gi en células normales y a Gs en células tumorales (Mamillapalli *et al*, 2008). El acople del CaSR a Gs en células tumorales de mama induce aumentos en la actividad de la adenilato ciclasa, incrementándose las concentraciones de AMPc intracelulares, lo que conlleva a la activación de la PKA. La PKA es un importante efector que induce la fosforilación y activación de una plétora de factores de transcripción. Es importante señalar que en trabajos previos se había asociado este cambio de acople con el cambio en el patrón de expresión y secreción del PTHrP en células tumorales de mama con respecto a células no tumorales (Mamillapalli *et al*, 2008). Por lo que no sorprendería que este fuera un probable mecanismo a través del cual el CaSR regule la expresión de Rab27b en cáncer de mama. Sin embargo, no podemos descartar el papel de otras vías de señalización activadas por el CaSR a través de G $\beta\gamma$  que también están asociadas al aumento en expresión de genes. De hecho, aquí mostramos que la inhibición de la PKA con H89 135 nM no llevó los niveles de Rab27b hasta la condición basal, lo que sugiere que probablemente otras vías activadas por este receptor puedan estar involucradas en el mecanismo a través del cual se inducen los aumentos en los niveles de Rab27b.

Los aumentos en los niveles de una proteína en las células pueden estar dados a través de incrementos en la tasa de transcripción de su gen, de traducción del ARNm y/o inhibición de un mecanismo de regulación por proteólisis en proteosoma. En nuestro trabajo la inhibición de la maquinaria transcripcional abrogó el efecto ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b, llevándola hasta niveles basales. La inhibición de la maquinaria traduccional también disminuyó los niveles de expresión de la proteína Rab27b ante estímulos del CaSR. Ambos resultados sugieren que el CaSR está induciendo aumentos en la expresión de Rab27b de un modo dependiente de la maquinaria transcripcional y traduccional; sin embargo, no podemos descartar el hecho de que también pueda estar inhibiendo la proteólisis en proteosoma de Rab27b. Dado que el mecanismo parece depender de la PKA es probable que sea este efector quien esté activando a algún o algunos factores de transcripción. De hecho, en el análisis bioinformático realizado en la región promotora del gen de Rab27b encontramos una serie de factores que pueden unirse al promotor y que además se sabe que son fosforilados y activados por la PKA. Un candidato muy prometedor entre estos posibles factores es el receptor a glucocorticoides (GR), el cual se encontró que se une a la región promotora más probable según nuestro análisis bioinformático en el fragmento 5' flanqueante del primer exón del gen con un bajo valor de disimilitud. El factor de transcripción GR se ha visto asociado a la evasión de la apoptosis e inducción de la proliferación en cáncer de mama en diferentes trabajos de investigación (Vilasco *et al.*, 2011). Además, está demostrado que la PKA aumenta su actividad transcripcional induciendo el incremento de la afinidad de GR por sus sitios de unión en el DNA en respuesta a glucocorticoides (Rangarajan, Umesono, & Evans, 1992). Obviamente no puede descartarse el papel de otros factores de transcripción que puedan unirse al promotor de Rab27b. Entre ellos GATA-1 es un factor que se ha visto implicado en la transición epitelial-mesenquimal en cáncer de mama (Li *et al.*, 2015). Los factores AP-2- $\alpha$  y ER- $\alpha$  pueden ser fosforilados y activado por la PKA (García *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999); El factor YY1 se ha encontrado sobreexpresado en células de cáncer de mama y su depleción está relacionada con una disminución en la formación de tumores, migración e invasión (Wan *et al.*, 2012). De igual manera IRF-2 se ha encontrado relacionados a la progresión del cáncer de mama (Doherty *et al.*, 2001). Aunque estos resultados nos dan una idea general de qué posibles factores de transcripción podrían estar mediando el efecto ejercido por el CaSR a través de la PKA sobre la expresión del gen de Rab27b, está claro que debe realizarse un análisis bioinformático más avanzado y donde se compilen los resultados arrojados por múltiples softwares predictores de sitios de unión para factores de transcripción. Igualmente deben realizarse experimentos *in vitro* que demuestren la implicación de estos factores en el mecanismo antes mencionado.

Por otro lado, la hipoxia que se genera en el microambiente tumoral es un factor estrechamente relacionado al aumento de la agresividad de los tumores. El factor inducible por hipoxia-1- $\alpha$  (HIF-1- $\alpha$ ) aumenta sus niveles en condiciones de baja presión parcial de oxígeno, una situación que se da en las zonas del tumor alejadas de los vasos sanguíneos. Este incremento en los niveles de Hif-1- $\alpha$  potencia la agresividad de los tumores, puesto que el mismo funciona como factor de transcripción, induciendo la expresión de múltiples oncogenes (Schito & Semenza, 2016). En nuestro trabajo se encontró que cuando el CaSR es activado en condiciones similares a la hipoxia la expresión de Rab27b se eleva aún más con respecto a la condición de normoxia. No está demostrado que el factor de transcripción Hif-1- $\alpha$  se una al gen de Rab27b e induzca su expresión, sin embargo, cuando este factor está elevado por alguna razón los niveles de Rab27b también se incrementan en presencia de  $Ca^{2+}$  y R-568. Es probable que Hif-1- $\alpha$  quizás aumente la expresión de uno o varios de los factores proteicos implicados en el mecanismo ejercido por el CaSR, dígase efectores de las vías de señalización o factores de transcripción. Todo este análisis apunta a que en las zonas hipóxicas de los tumores de mama, el CaSR puede estar induciendo mayores niveles de expresión de Rab27b, lo que podría favorecer la secreción de factores que le permitan a la célula cancerosa adaptarse a esa condición de baja presión parcial de oxígeno. Entre estos podrían estar factores angiogénicos y quimiotácticos que contribuyan a la formación de nuevos vasos sanguíneos y al escape de la célula cancerosa hacia otros tejidos y órganos diferentes al del tumor primario.

En resumen, este trabajo permitió dilucidar una nueva función para el CaSR en el contexto de cáncer de mama, que es específica de la condición tumoral y no se manifiesta en epitelio mamario normal. Esta función es la de regular positivamente la expresión de la GTPasas Rab27b, estrechamente vinculada a la secreción de factores que aumentan la agresividad de los tumores. Este hecho cobra más importancia teniendo en cuenta que la sobreexpresión de Rab27b ha sido correlacionada en diferentes estudios con el grado de avance de la enfermedad, así como con una baja supervivencia de los pacientes (Hendrix *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Todo lo anteriormente planteado potencia al CaSR como una molécula asociada a la progresión del cáncer de mama, lo que lo convierte en un posible blanco terapéutico en el tratamiento de esta penosa enfermedad.

## 5. Conclusiones

1. El CaSR regula positivamente la expresión de la GTPasa Rab27b en células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7), pero no en células epiteliales normales de mama (MCF-10-A).
2. La PKA, así como la maquinaria transcripcional y traduccional celular están implicadas en el mecanismo a través del cual el CaSR regula positivamente la expresión de Rab27b en células de cáncer de mama MCF-7.
3. Un análisis bioinformático mostró que el promotor del gen de Rab27b tiene sitios consenso de unión para los factores de transcripción GR, AP-2- $\alpha$ , GATA-1, YY-1, IRF-2 y ER $\alpha$  que pueden ser activados por la PKA y/o están relacionados a la progresión del cáncer de mama.
4. La simulación *in vitro* de la hipoxia tumoral potencia el efecto positivo ejercido por el CaSR sobre la expresión de Rab27b en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

## 6. Perspectivas

1. Profundizar en las vías de señalización activadas por el CaSR que pudieran estar involucradas en el mecanismo de regulación de la expresión de Rab27b.
2. Comprobar experimentalmente la participación de los factores de transcripción GR, AP-2- $\alpha$ , GATA-1, YY-1, IRF-2 y ER- $\alpha$  en el mecanismo a través del cual el CaSR promueve la expresión de Rab27b.
3. Identificar las quimiocinas y citocinas secretadas por células cancerosas de mama en las condiciones en las cuales la GTPasa Rab27b está elevada como consecuencia de la activación del CaSR.
4. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de Rab27b inducida por activación del CaSR en la comunicación parácrina entre las células cancerosas de mama y otras células que formen parte del microambiente tumoral como las células endoteliales y los macrófagos.



## 7. Referencias bibliográficas

- Alfadda, T. I., Saleh, A. M. A., Houillier, P., & Geibel, J. P. (2014). Calcium-sensing receptor 20 years later. *Journal of Pysol Cell Physol*, 307(95), 221–231.
- Bengtsson T., Sarndahl E., S. O. & A. T. (1990). Involvement of GTP-binding proteins in actin polymerization in human neutrophils. *Cell Biology*, 87, 2921–2925.
- Brown E., Gerardo Gamba, Daniela Riccardi, Michael Lombardi, Robert Butters, Olga Kifor, Adam Sun, Matthias A. Hediger, J. L. & S. C. H. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366, 575–580.
- Chang, W., Pratt, S., Chen, T., Nemeth, E., Huang, Z., & Shoback, D. (1998). Coupling of Calcium Receptors to Inositol Phosphate and Cyclic AMP Generation in Mammalian Cells and *Xenopus laevis* Oocytes and Immunodetection of Receptor Protein by Region-Specific Antipeptide Antisera . *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(4), 570–580.
- Chang, W., & Shoback, D. (2004). Extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors — an overview. *Cell Calcium*, 35, 183–196.
- Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C., & Ali, S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1002–1015.
- Díaz-Soto, G., Rocher, A., García-Rodríguez, C., Núñez, L., & Villalobos, C. (2016). *The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. International Review of Cell and Molecular Biology* (327), 321-369.
- Doherty, G. M., Boucher, L., Sorenson, K., & Lowney, J. (2001). Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Annals of Surgery*, 233(5), 623–629.
- Fukuda, M. (2013). Rab27 Effectors, Pleiotropic Regulators in Secretory Pathways. *Traffic*, 14(9), 949–963.
- García, M. A., Campillos, M., Marina, A., Valdivieso, F., & Vázquez, J. (1999). Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Letters*, 444(1), 27–31.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Hanlon, C. D., & Andrew, D. J. (2015). Outside-in signaling – a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *Journal of Cell Science*, *128*, 3533–3542.
- Hendrix, A., Maynard, D., Pauwels, P., Braems, G., Denys, H., Van Den Broecke, R., ... Westbroek, W. (2010). Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(12), 866–880.
- Hernández-Bedolla, M. A., Carretero-Ortega, J., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., & Reyes-Cruz, G. (2015). Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(1), 166–182.
- Huang, C., Hydo, L. M., Liu, S., & Miller, R. T. (2009). Activation of choline kinase by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor,  $\text{G}_{\alpha 12}$  and Rho-dependent in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, *21*(12), 1894–1900.
- Janicic, N., S, E., Pausova, Z., Seldin, M. F., Rivi, M., Szpirer, J., ... H, G. N. (1995). Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human Chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat Chromosome 11 and mouse Chromosome 16. *Mammalian Genome*, *6*, 798–801.
- Kifor, O., Diaz, R., Butters, R., & Brown, E. M. (1997). The  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensing Receptor (CaR) Activates Phospholipases C, A2, and D in Bovine Parathyroid and CaR-Transfected, Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, *12*(5), 715–725.
- Li, Y., Ke, Q., Shao, Y., Zhu, G., Li, Y., Geng, N., ... Li, F. (2015). GATA1 induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells through PAK5 oncogenic signaling. *Oncotarget*, *6*(6), 4345–4356.
- Lochner, A., & Moolman, J. A. (2006). The many faces of H89: A review. *Cardiovascular Drug Reviews*, *24*(3–4), 261–274.
- Lorenz, S., Frenzel, R., Paschke, R., Breitwieser, G. E., & Miedlich, S. U. (2007). Functional Desensitization of the Extracellular Calcium- Sensing Receptor Is Regulated via Distinct Mechanisms: Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases , Protein. *Endocrinology*, *148*(June), 2398–2404.
- Mamillapalli, R., Vanhouten, J., Zawalich, W., & Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein Usage by the Calcium-sensing Receptor Reverses Its Effect on Parathyroid Hormone-related

- Protein Secretion in Normal Versus Malignant Breast Cells \*. *The Journal of Biology Chemistry*, 283(36), 24435–24447.
- Mihai, R., Stevens, J., Mckinney, C., & Ibrahim, N. B. N. (2006). Expression of the calcium receptor in human breast cancer - a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *European Journal of Surgery Oncology*, 32(5), 511–515.
- Moore, C. A. C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. *Annu. Rev. Physiol.*, (69), 451–482.
- O’Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E. W., Handel, T. M., Seshagiri, S., & Gutkind, J. S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(6), 412–424.
- Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2015). Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology*, 30(5), 340–348.
- Rangarajan, P. N., Umesono, K., & Evans, R. M. (1992). Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Molecular Endocrinology*, 6(9), 1451–1457.
- Redig, A. J., & Mcallister, S. S. (2013). Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. *Journal of Internal Medicine*, 274(2), 113–126.
- Reyes-Ibarra, A. P., García-Regalado, A., Ramírez-Rangel, I., Esparza-Silva, A. L., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., & Reyes-Cruz, G. (2007). Calcium-Sensing Receptor Endocytosis Links Extracellular Calcium Signaling to Parathyroid Hormone-Related Peptide Secretion via a Rab11a-Dependent and AMSH-Sensitive Mechanism. *Molecular Endocrinology*, 21(6), 1394–1407.
- Saidak, Z., Mentaverri, R., & Brown, E. M. (2009). The Role of the Calcium-Sensing Receptor in the Development and Progression of Cancer. *Endocrine Reviews*, 30(2), 178–195.
- Sanders, J. L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Butters, R. R., & Brown, E. M. (2000). Extracellular Calcium-Sensing Receptor Expression and Its Potential Role in Regulating Parathyroid Hormone- Related Peptide Secretion in Human Breast Cancer. *Endocrinology*, 141(12), 4357–4364.
- Schito, L., & Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer*, 2(12), 758–770.

- Shah, R. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 283.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525.
- Tennakoon, S., Aggarwal, A., & Kállay, E. (2016). The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1398–1407.
- Thiel, G., Lesch, A., & Keim, A. (2012). Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation. *Endocrinology*, 153(10), 4716–4728.
- Thomas, S. M., Bhola, N. E., Zhang, Q., Contrucci, S. C., Wentzel, A. L., Freilino, M. L., ... Grandis, J. R. (2006). Cross-talk between G Protein – Coupled Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways Contributes to Growth and Invasion of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 66(24), 11831–11840.
- Vázquez-prado, J., Bracho-valdés, I., Cervantes-villagrana, R. D., & Reyes Cruz, G. (2016). G Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Molecular Pharmacology*, 90, 573–586.
- Vilasco, M., Communal, L., Mourra, N., Courtin, A., Forgez, P., & Gompel, A. (2011). Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(1), 1–10.
- Wan, M., Huang, W., Kute, T. E., Miller, L. D., Zhang, Q., Hatcher, H., ... Sui, G. (2012). Yin yang 1 plays an essential role in breast cancer and negatively regulates p27. *American Journal of Pathology*, 180(5), 2120–2133.
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*, (54), 4–7.
- Zhang, J. X., Huang, X. X., Cai, M. B., Tong, Z. T., Chen, J. W., Qian, D., ... Mai, S. J. (2012). Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–10.