

# TITULO DE LA TESIS

"Estudio del potencial anti-metastásico del receptor AT2 como bloqueador de la migración de células tumorales"

## Tesis

Entregada a La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Doctor en Biotecnología Molecular

Facultad De Ciencias

Por

Samuel Alejandro Martínez Meza

Noviembre, 2018

Directores de Tesis Doctores:

Andrew Quest y Sergio Lavandero

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**SAMUEL ALEJANDRO MARTINEZ MEZA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día. ....

**Directores de Tesis:**

**Dr. Andrew Quest** .....

**Dr. Sergio Lavandero** .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Miguel Allende** .....

**Dra. Cecilia Rojas** .....

**Dr. Mauricio Boric** .....

**Dr. Christian Gonzalez** .....

*A los que ya no están....me hubiera gustado tenerlos conmigo. Los extraño mucho...Amor eterno  
Yayita y Oscar*

## RESUMEN BIOGRAFICO



Nací un 29 de Octubre de 1984 en una modesta familia de Puente Alto, compuesta por 3 hermanos, de los cuales yo soy el menor. Mi mamá peluquera y mi papá músico con mucho esfuerzo siempre me alentaron a ser un profesional.

Recuerdo que una profesora, muy diferente, retraída, de fuerte personalidad y con un estilo desgarrado llamada Olga Fuentes me enseñó a apreciar la biología. Creo que era cosa de tiempo para que yo escogiera a la ciencia. Ojala haya tiempo suficiente para que la ciencia me escoja a mí.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias al Dr. Andrew Quest por su guía y enseñanza. Sus consejos han sido de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo y también para mi formación como científico. Gracias a su tutela he aprendido a ser más riguroso y metódico en la generación de conocimiento.

Muchas gracias al Dr. Sergio Lavandero por alentarme siempre a romper los esquemas y aventurarme a nuevos desafíos. Gracias por confiar en que podría llevar a cabo este trabajo.

Muchas gracias a la Dra. Lisette Leyton por aportar siempre con sus tan certeros comentarios y ayudarme a mejorar este trabajo constantemente, siempre con buena disposición y calidez.

Muchas gracias al Dr. Juan Carlos Letelier por su apoyo en los momentos más difíciles de este trabajo. Por creer en que la Ciencia puede tener un impacto social y por enseñarme a luchar por nuestros ideales.

Muchas gracias a todo el equipo de la Dirección de Innovación de la Vicerrectoría de Investigación, Innovación y Creación Artística de la Universidad de Chile, principalmente a Varinka Farren, Javier Ramírez y Marcelo González quienes desde un inicio me guiaron y confiaron en mí.

Quisiera agradecer a los integrantes de la comisión de tesis: Dr. Miguel Allende, Dra. Cecilia Rojas, Dr. Mauricio Boric y Dr. Christian González. Gracias por participar tan activamente y aportar al desarrollo de este trabajo.

Muchas gracias a todos los integrantes de mi laboratorio. Siempre agradezco haberme encontrado con ustedes. A los de antes y a los de ahora. Han sido muy cariñosos conmigo y me han apoyado en todo lo que he necesitado. En mi corazón Fran, Jime Olé, Xime, Jime Che, Jenny, Raúl, Mariancita, Vicky, Carli, Ame, Pame y a mis queridas señoras; Lore, Nata y Jorge. Con ustedes todo fue mejor.

Muchas Gracias a mis padres, mis hermanos y mis sobrinos, por siempre darme todo su amor. Muchas Gracias a mis amigos fuera de las ciencias, los que siempre me alegran la vida Pili, Barby, Mary, Andrea, Nata, Lillita, Lita, Cami y Pablo.

A Gustavo, gracias por darme todo el amor y alegría para seguir adelante. Te Amo.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
Antecedentes generales del Sistema renina angiotensina (SRA)	7
Funcionamiento de los receptores del SRA	10
Los receptores del SRA y su implicancia en el desarrollo de cáncer	12
AT2R: Un blanco terapéutico del SRA para el tratamiento del cáncer	15
El proceso metastásico es regulado por Caveolina-1	19
La vía promotora de la migración, invasión y metástasis: CAV1/Rab5/Rac-1	25
PTP1B modula la fosforilación de Caveolina-1	27
AT2R y la vía CAV1/Rab5/Rac-1	28
Resumen de los antecedentes	30
<b>HIPÓTESIS</b>	32
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	32
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	32
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	
Modelos celulares y cultivo celular	33
Western blot	34
Ensayo en cámara Boyden (Transwell)	35
Ensayo de migración transendotelial (TEM)	36
Silenciamiento del AT2R en células B16F10 mediante shRNA	37
Sobreexpresión del T2R en células MDA-MB-231 mediante transducción adenoviral	37
Determinación del número de células transducidas por citometría de flujo	38
Ensayo de Pull-Down para Rab 5 y Rac-1	38
Ensayo de FRET	39
Inmunoprecipitación de PTP1B	40
Medición de la actividad de PTP1B	41

Ensayo de metástasis en ratones C57BL/6	41
Análisis estadístico	41
<b>3. RESULTADOS</b>	
<b>Objetivo 1</b>	43
AT2R se expresa en las células B16F10, pero no en las células MDA-MB-231	43
<b>Objetivo 2</b>	47
La activación del AT2R ejerce un rol anti-migratorio en las células tumorales que lo expresan	47
La activación del AT2R inhibe la vía CAV1/Rab5/Rac-1 mediante la desfosforilación de CAV1 en Y14	60
La activación del AT2R inhibe Rab5 y Rac-1	66
La inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 promovida por activación de AT2R se debe al aumento en la actividad de PTP1B	73
<b>Objetivo 3</b>	77
La activación del AT2R disminuye la metástasis de las células B16F10	77
El silenciamiento del AT2R aumenta la metástasis de las células B16F10	80
<b>4. DISCUSION</b>	
Expresión diferencial del AT2R entre líneas celular de melanoma murino (B16F10) y cáncer de mama (MDA-MB-231)	83
La activación del AT2R disminuye la capacidad migratoria de células de melanoma murino (B16F10) y de cáncer de mama (MDA-MB-231) en forma dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1	85
AT2R promueve la desfosforilación de CAV1 en Y14	89
La desfosforilación de CAV1 en Y14 promovida por el AT2R se debe al aumento en la actividad de la fosfatasa PTP1B	93
AT2R disminuye la metástasis del melanoma	94
<b>5. CONCLUSIONES</b>	98
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	99

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Funcionamiento del sistema renina-angiotensina	8
<b>Figura 2.</b> Niveles de angiotensina plasmática vs tisular	9
<b>Figura 3.</b> Principales componentes del sistema renina angiotensina	11
<b>Figura 4.</b> Ras en la regulación de la supervivencia y apoptosis de la célula tumoral	17
<b>Figura 5.</b> Modelo de metástasis	20
<b>Figura 6.</b> Modelo de migración celular	21
<b>Figura 7.</b> Estructura de CAV1	23
<b>Figura 8.</b> Vía de promoción de la migración celular CAV1/RAB5/Rac-1	26
<b>Figura 9.</b> Esquema de la fosforilación y desfosforilación del residuo 14 de CAV1	27
<b>Figura 10.</b> Modelo del posible mecanismo de inhibición que AT2R podría ejercer sobre la vía CAV/Rab5/Rac-1	30
<b>Figura 11.</b> Expresión del AT2R y del AT1R en células tumorales	44
<b>Figura 12.</b> Actividad del AT2R en B16F10	46
<b>Figura 13.</b> Esquema del ensayo de trans migración en placa Transwell	48
<b>Figura 14.</b> Migración de células B16-F10 pre-incubadas con agonista del AT2R CGP42112	49
<b>Figura 15.</b> Esquema del ensayo de trans migración endotelial (TEM)	51
<b>Figura 16.</b> Migración transendotelial de células B16F10 pre-incubadas con el agonista del AT2R	52
<b>Figura 17.</b> Migración de células MDA-MB-231 pre-incubadas con el agonista del AT2R	53
<b>Figura 18.</b> Efecto del silenciamiento del AT2R sobre la migración de células B16F10(cav-1)	56
<b>Figura 19.</b> Transducción adenoviral del AT2R en las células MDA-MB-231	58
<b>Figura 20.</b> Efecto de la sobreexpresión del AT2R en la migración de células MDA-MB-231	59
<b>Figura 21.</b> Modelo hipotético del mecanismo de inhibición que AT2R podría ejercer sobre la vía CAV/Rab5/Rac-1	61
<b>Figura 22.</b> Efecto de la activación del AT2R sobre los niveles de	

(Y14) p-CAV1 de células B16F10 que expresan y no expresan el receptor	62
<b>Figura 23.</b> Mutación de la secuencia de CAV1 en Y14	64
<b>Figura 24.</b> Migración de la mutante fosfomimética B16F10(cav-1/Y14E) pre-incubadas con el agonista del AT2R	65
<b>Figura 25.</b> Esquema del ensayo de pull down	67
<b>Figura 26.</b> Efecto del agonista del AT2R en los niveles de Rab 5 y Rac-1 activos de células B16F10	68
<b>Figura 27.</b> Ensayo de FRET	70
<b>Figura 28.</b> Localización del efecto del agonista del AT2R sobre los niveles de Rac-1 activos en células B16F10 mediante FRET	72
<b>Figura 29.</b> Efecto de PTP1B sobre los niveles de (Y14) p-CAV1 y la migración de células B16F10(cav-1)	74
<b>Figura 30.</b> Efecto del agonista del AT2R en la actividad enzimática de PTP1B	76
<b>Figura 31.</b> Ensayo de metástasis	78
<b>Figura 32.</b> Ensayo de metástasis de células B16F10 expuestas al agonista CGP42112	79
<b>Figura 33.</b> Ensayo de metástasis de células B16F10 con el AT2R silenciadas expuestas al agonista CGP42112	81
<b>Figura 34.</b> Modelo propuesto para el mecanismo por el cual el AT2R inhibe la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1	97

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Expresión de componentes del SRA en algunos canceres	15
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos primarios utilizados en la tesis	35
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en la tesis	35

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AF</b>	: Adhesiones focales
<b>Ang II</b>	: Angiotensina II
<b>AT1R</b>	: Receptor AT1
<b>AT2R</b>	: Receptor AT2
<b>CAV1</b>	: Caveolina-1
<b>E</b>	: Acido glutámico
<b>ECA</b>	: Enzima convertidora de angiotensina I
<b>FA</b>	: Frente de avance
<b>FN</b>	: Fibronectina
<b>FRET</b>	: Fluorescence resonance energy transfer
<b>GAP</b>	: Proteína activadora de GTPasa
<b>GDP</b>	: guanosín di-fosfato
<b>GEF</b>	: Factor intercambiador de nucleótidos
<b>GFP</b>	: Proteína fluorescente verde
<b>GTP</b>	: Guanosín tri-fosfato
<b>H</b>	: Hora
<b>HRPO</b>	: Peroxidasa de rabanito
<b>kDa</b>	: Kilodaltons
<b>MCherry</b>	: "Proteína fluorescente roja
<b>MEC</b>	: Matriz extracelular
<b>Min</b>	: Minutos
<b>mL</b>	: Mililitro.
<b>mM</b>	: Milimolar

<b>MMPs</b>	: Metaloproteasas de matriz
<b>nm</b>	: Nanómetro
<b>OD</b>	: Densidad óptica
<b>PBS</b>	: Tampón fosfato salino
<b>PTP</b>	: Proteína fosfatasa
<b>pY14-CAV1</b>	: CAV1 fosforilada en Y14
<b>SDS</b>	: Dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>Seg</b>	: Segundos
<b>SEM</b>	: Error estándar de la media
<b>shRNA</b>	: Short hairpin RNA
<b>SRA</b>	: Sistema renina angiotensina
<b>Src</b>	: proteínas tirosinas quinasas no receptoras de la familia Src
<b>TEM</b>	: Migración transendotelial
<b>WB</b>	: Western blot
<b>Y14</b>	: Tirosina 14
<b>Mg</b>	: Microgramo
<b>μL</b>	: Microlitro
<b>μm</b>	: Micrómetro
<b>μM</b>	: Micromolar

## RESUMEN

El sistema renina-angiotensina (SRA) consiste en una serie de péptidos que circulan por el torrente sanguíneo, señalizando a través de varios receptores de membrana acoplados a una proteína G. Dentro de éstos, el receptor AT2 (AT2R) es uno de los más importantes dado que se encarga de apagar las señales intracelulares encendidas por otros receptores del SRA. Esta acción la ejecuta mediante la activación de proteínas fosfatasa que desfosforilan sustratos proteicos río abajo de estos receptores, impidiendo de esta manera su sobreactivación.

Aunque el SRA se describió inicialmente como un regulador de la presión arterial, actualmente se sabe que también participa en el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Durante el desarrollo de esta enfermedad, algunos receptores del SRA promueven la adquisición del fenotipo cancerígeno, mientras que el AT2R antagoniza estos efectos, impidiendo su avance. Sin embargo, en la etapa de metástasis aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales AT2R podría inhibir dicho proceso.

Nuestros estudios previos han identificado una nueva vía promotora de la migración, invasión y metástasis compuesta por las proteínas caveolina-1, Rab5 y Rac-1 (vía CAV1/Rab5/Rac-1). Esta vía promueve metástasis en el cáncer de mama, colon y melanoma. Su activación ocurre cuando el primer componente de la vía, CAV1 es fosforilada en Y14 (p-Y14-CAV1), lo cual promueve la activación

secuencial de las GTPasas río abajo Rab5 y Rac-1 y que en última instancia promueven la migración celular.

Diversas investigaciones sugieren que la fosforilación de CAV1 en Y14 podría estar controlada por la actividad del AT2R. Considerando que el AT2R actúa activando fosfatasa, se postuló en esta tesis que este receptor inhibe la migración, invasión y metástasis dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1, promoviendo la desfosforilación de CAV1 en Y14 mediante la activación de alguna proteína fosfatasa.

Todos estos antecedentes permiten formular la siguiente hipótesis de trabajo:  
*“La activación del AT2R inhibe la vía de señalización CAV1/Rab5/Rac-1, disminuyendo la migración, invasión y potencial metastásico de células tumorales de melanoma murino B16F10 y de mama MDA-MB-231.*

Para probar esta hipótesis se utilizaron las líneas celulares de cáncer de melanoma B16F10 y de mama MDA-MB-231, dado que ellas si bien utilizan la vía CAV1/Rab5/Rac-1 para migrar, difieren en la expresión del AT2R, convirtiéndolas en buenos modelos para estudiar su efecto sobre esta vía transduccional. Estas células se estimularon con el agonista específico del AT2R CGP42112, de origen sintético, para evaluar sus efectos sobre la migración, invasión y metástasis.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que:

- De las células estudiadas, solo las de cáncer de melanoma expresan el AT2R.
- La activación del AT2R con CGP42112 inhibió la migración y metástasis de las células de cáncer de melanoma, mientras que solo disminuyó la migración de células de cáncer de mama cuando se sobreexpresó el AT2R.
- Este efecto anti-migratorio en el modelo de melanoma se atribuyó a la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 debido a que la activación del AT2R disminuyó los niveles de pY14-CAV1 y, consecuentemente, los niveles Rab5 y Rac-1 activos.
- Finalmente la disminución de los niveles de pY14-CAV1 generado por la estimulación del AT2R con el agonista específico se puede explicar por el aumento en la actividad de PTP1B, fosfatasa responsable de la desfosforilación de este residuo.

Se concluye que AT2R inhibe la migración de células tumorales de melanoma mediante la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.

## SUMMARY

The renin-angiotensin system (RAS) includes several peptides that circulate in the bloodstream and signal through G protein coupled receptors. The AT2 receptor (AT2R) plays a key role for such peptides because its activation quenches intracellular signaling and does so by activating phosphatases.

Although the RAS was initially described as a regulator of blood pressure, it has recently implicated in the development of noncommunicable chronic diseases like cancer. While some RAS receptors promote acquisition of the transformed phenotype, AT2R it is thought to predominantly antagonize such effects. However, the molecular mechanisms of AT2R participation in metastasis have not yet been defined.

Studies from our research group have identified a new pathway that promotes migration, invasion and metastasis. This pathway involves the proteins Caveolin-1 (CAV1), Rab5 and Rac-1 (via CAV1/Rab5/Rac-1) and has been shown to promote metastasis in melanoma, breast and colon cancer cells. Activation of this pathway is triggered by CAV1 phosphorylation Y14 (pY14-CAV1), which then promotes the sequential activation of the downstream GTPases Rab5 and Rac-1 to promote cell migration and invasion

Some reports suggest that CAV1 phosphorylation on Y14 may be modulated by the activity of AT2R. Considering that AT2R works activating

downstream phosphatases, we evaluated whether AT2R inhibits migration, invasion and metastasis by promoting dephosphorylation of CAV1 via phosphatase activation.

All these antecedents lead us to propose the following hypothesis: Activation of AT2R inhibits the CAV1/Rab5/Rac-1 signaling pathway, thereby decreasing migration, invasion and metastatic potential of murine melanoma B16F10 and breast MDA-MB-231 cancer cells.

Here, we evaluated whether AT2R activation prevented migration, invasion and metastasis, by inhibiting the CAV1/Rab5 /Rac-1 pathway. B16F10 melanoma and MDA-MB-231 breast cancer cells were used, because this cancer cells employ the CAV1/ Rab5 /Rac-1 pathway to migrate, but they differ in AT2R expression. These cells were stimulated with a synthetic ligand for AT2R, called CGP42112, to evaluate the effects on migration, invasion and metastasis.

The results obtained in this study showed that:

- AT2R was only expressed in melanomas.
- AT2R activation with CGP42112 inhibited migration and metastasis of melanoma cells, whereas migration of breast cancer cells decreased only when AT2R was overexpressed.

- AT2R mediated inhibition of migration/invasion was attributed to decreased pY14-CAV1 levels and consequently Rab5 and Rac-1 activity.
- Finally, decreased pY14-CAV1 levels following AT2R stimulation were attributed to increased PTP1B activity.

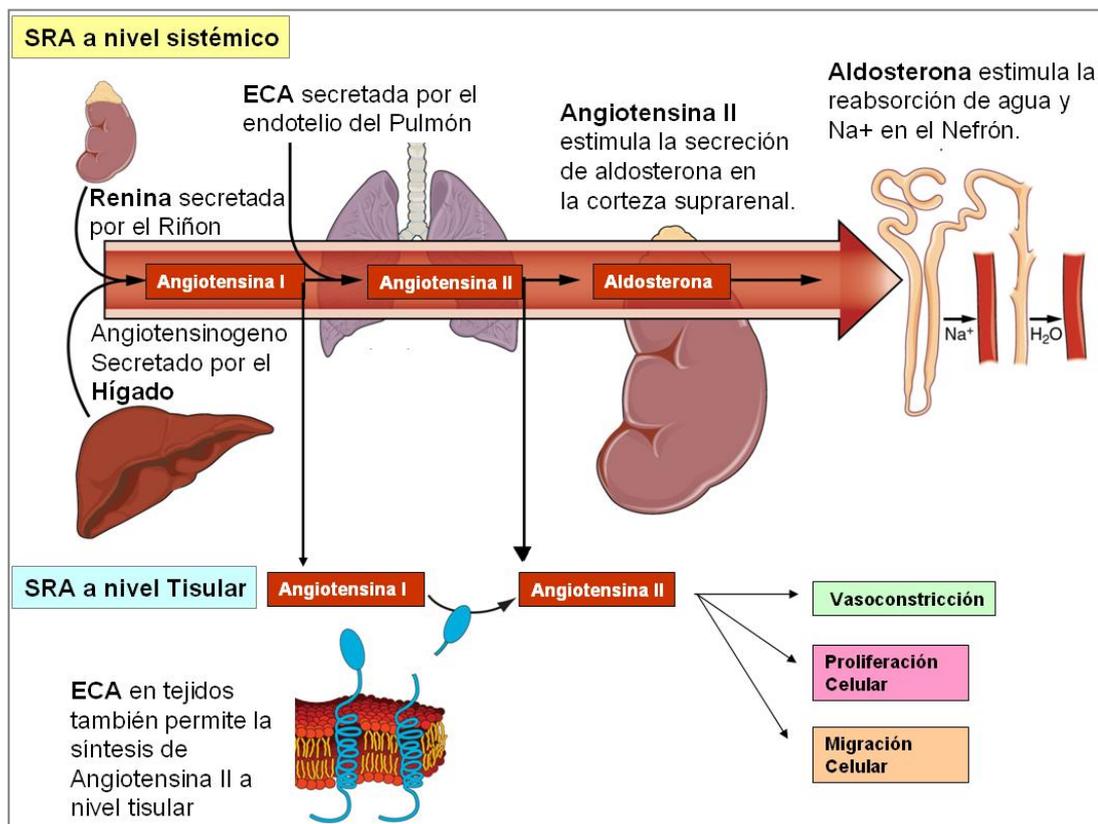
We concluded that AT2R inhibit melanoma cell migration through CAV1/Rab5/Rac-1 pathway inhibition.

## INTRODUCCION

### **Antecedentes generales del sistema renina-angiotensina (SRA)**

El SRA se conoció inicialmente como el eje regulador fisiológico de la presión arterial. Sin embargo, actualmente sabemos que este sistema es además un regulador más global que controla el funcionamiento de otros importantes sistemas fisiológicos como son el endocrino, inmune, nervioso y reproductor, entre otros (Jandeleit-Dahm y col., 2005; Benigni y col., 2010; Bali & Jaggi., 2013; Wegman-Ostrosky y col., 2013).

El SRA está integrado por enzimas, péptidos y receptores de membrana distribuidos en todo el organismo y en diferentes tipos celulares (Paul y col., 2006). Las enzimas del sistema contribuyen a generación de los péptidos, conocidos como angiotensinas, cuya función es actuar como ligandos de los receptores del sistema (McKinney y col., 2014). Algunos estímulos mecánicos como el descenso en la presión arterial estimulan la secreción de enzimas que generan diversas angiotensinas a nivel sistémico (**Figura 1**).

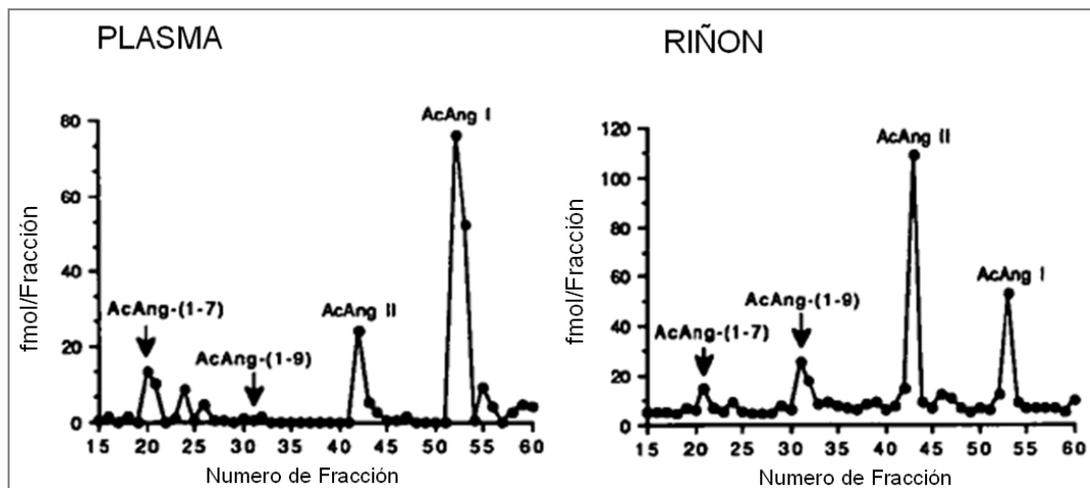


**Figura 1. Funcionamiento del sistema renina-angiotensina (SRA).** Estímulos mecánicos como el descenso en la presión arterial estimulan la secreción de renina por el riñón. Esta enzima convierte el angiotensinógeno, secretado por el hígado, en angiotensina I (Ang I). Este péptido circula por la sangre y por acción de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), presente en la superficie de las células endoteliales del pulmón, la transforma en angiotensina II (Ang II). Sin embargo, Ang I también llega a otros tejidos que expresan ECA, donde es convertida localmente en Ang II y, por lo tanto, aumentando sus niveles a nivel tisular. Ang II presente en el torrente sanguíneo ejerce efectos principalmente sistémicos, aumentando la presión arterial sistólica, gracias a que estimula la secreción de aldosterona y sus efectos directos a nivel de los vasos sanguíneos. Ang II de origen tisular promueve efectos locales en sus células blanco que expresan sus receptores, modulando su proliferación, hipertrofia y migración.

La integridad de estos péptidos en la circulación sanguínea es crucial para generar una respuesta biológica dada su vida media muy corta. Se estima que Ang II tiene una vida media de 16 seg (Munday y col., 1978). Lo anterior implica que los efectos que generan estos péptidos a nivel sistémico mediante cambios en sus concentraciones plasmáticas son transitorios y de corta duración, tal como lo requiere el control de la presión arterial.

En cuanto los efectos que tienen las angiotensinas locales en los tejidos se ha visto que depende principalmente de la síntesis local, dada por la presencia de enzimas como ECA en la membrana de algunos tejidos (Campbell y col.,1991).

La síntesis y acumulación de las angiotensinas en los tejidos genera una elevada concentración local comparado con las niveles que se alcanzan en el plasma, lo cual permite regular el funcionamiento de las células en aspectos como la proliferación y migración celular (Paul y col., 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2. Niveles de angiotensina plasmática vs tisular.** La figura muestra los niveles que alcanzan una serie de 4 angiotensinas en el plasma vs el tejido de un órgano como el riñón. En este caso, péptidos como angiotensina II (Ang II) y angiotensina-(1-9) (Ang-(1.9)) aumentan considerablemente en el tejido, mientras que péptidos precursores como Ang I disminuyen. Esto se debe a la presencia de peptidasas en estos tejidos que sintetizan estos péptidos utilizando a Ang I como precursor, permitiendo la síntesis y acumulación de estos péptidos en el tejido (modificado de Campbell y col.,1991).

## **Funcionamiento de los receptores del SRA**

Dentro de la familia de receptores del SRA, los más estudiados son los receptores AT1 (AT1R), AT2 (AT2R) y el receptor Mas (MasR) (McKinney y col., 2014). El primero presenta una expresión ubicua en el organismo, mientras que el segundo se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario, disminuyendo su expresión en el organismo adulto (Li y col., 2012). El MasR se expresa principalmente en testículo, cerebro, riñón y corazón (Kostenis y col., 2015). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR). El papel clásico del AT2R y MasR en las células es contrarrestar los efectos del AT1R, regulando la actividad de las vías de señalización encendidas por este último. Entre los mecanismos que utiliza el AT2R para antagonizar la actividad del AT1R destacan su capacidad de activar proteínas fosfatasa tales como SHP-1, MKP-1 y PP2A (Faria-costa y col., 2014), las cuales a su vez desactivan las vías de señalización ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT y proteína kinasa C (PKC) (George y cols., 2010). También el AT2R puede afectar negativamente la actividad del AT1R, alterando su reciclamiento al heterodimerizar con este receptor (Henrion, 2012). Finalmente otro de los mecanismos descritos con los que el AT2R puede contrarrestar los efectos del AT1R es disminuyendo su expresión (Jian y col., 2012).

Ang II es el principal péptido del SRA ya que actúa como ligando tanto del AT1R como del AT2R, pudiendo encender y apagar al SRA. Sin embargo, también existen otros péptidos que también pueden hacerlo. El primero es angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)), péptido generado principalmente desde Ang II por acción de la enzima



a receptores específicos para provocar una respuesta celular. La vía de síntesis de estos péptidos comienza con el angiotensinógeno, como precursor, el cual se procesa por diferentes peptidasas y generan los diferentes péptidos del sistema, incluyendo: angiotensina I (Ang I), angiotensina II (Ang II), angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) y angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)). Las peptidasas responsables de la hidrólisis de las diferentes angiotensinas son: ACE: enzima convertidora de angiotensina I; renin: renina; NEP: endopeptidasa neutra; POP: prolil endopeptidasa; CpA: catepsina A y CxA: carboxipeptidasa A (Modificado de McKinney y col., 2014).

### **Los receptores del SRA y su implicancia en el desarrollo de cáncer**

Los diferentes receptores del SRA son expresados por ciertos tipos celulares y en estadios bien particulares del desarrollo del organismo (Grady y col., 1991; Yu y col., 2014) Sin embargo, su distribución y actividad puede cambiar en diferentes contextos, pudiendo llegar a desregular su funcionamiento al punto de promover el desarrollo de algunas enfermedades crónicas, entre las cuales se encuentra el cáncer (Deshayes y Nahmias, 2005).

**El cáncer y sus características.** Esta enfermedad se caracteriza por un aumento descontrolado en la proliferación de un grupo de células o por la desregulación de la muerte celular (Bertram, 2000). Además, algunas de estas células adquieren la capacidad de escapar del tumor inicial, invadir y colonizar otros tejidos hasta provocar la muerte del organismo que la padece (Hanahan y Weinberg, 2000)

Aunque existen diversos tipos de cáncer, todos ellos comparten una serie de características que permiten su progresión. Algunas de ellas son: a) capacidad de generar autosuficiencia en las señales de crecimiento, b) evasión de señales supresoras de crecimiento, c) resistencia a la apoptosis, d) inmortalización, e)

inducción de angiogénesis, f) reprogramación del metabolismo energético, g) evasión de la respuesta inmune, h) inflamación, i) inestabilidad genómica y j) capacidad de generar metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011). Esta última característica es una de las más importantes que adquiere una célula tumoral ya que le permite invadir otros sitios del organismo y provocar alrededor del 90% de las muertes asociadas a la enfermedad (Mehlen y Puisieux, 2006). Por esa razón las investigaciones en el área están enfocadas en elaborar fármacos y/o terapias dirigidas principalmente a detener este proceso.

**SRA y el desarrollo del cáncer.** Los principales componentes del SRA, tales como receptores y peptidasas, juegan un rol importante en el cáncer. A pesar de que la expresión de estos componentes están restringido solo a algunos tipos celulares, se ha descrito su presencia en diferentes tipos de tumores (ver Tabla 1). Durante el desarrollo de esta enfermedad se altera la expresión de varios de estos componentes, permitiendo que el SRA pueda influir en el comportamiento de las células malignas.

La Tabla 1 muestra los principales componentes de RAS que cambian su expresión en esta patología, entre los que se incluyen ECA y los receptores AT1 y AT2. Durante el desarrollo del cáncer, ECA es generalmente sobreexpresada en el tumor o en el tejido circundante (Mcindoe y Zealand, 2017), aumentando la producción local de Ang II (Tabla 1) y contribuyendo a la sobreactivación de algunos receptores pro-cancerígenos, como el AT1R. En cuanto a los receptores, el cambio más común es el aumento de la expresión del AT1R en el tejido tumoral, lo cual potencia el desarrollo del cáncer (Suganuma y col., 2005; Rhodes y col, 2009; Li y col., 2016).

Con respecto al AT2R, contrario a lo que podríamos esperar de un receptor sindicado como anti-cancerígeno, se ha descrito que su expresión generalmente aumenta durante el desarrollo de cánceres como el de melanoma y mama (Paepe y col., 2002; Um y Henz, 2004). Aunque también se ha observado que su expresión disminuye en cánceres como el de pulmón y próstata (Guimond y col., 2013; Goldstein y col., 2017). Es posible que la expresión de este receptor durante el desarrollo del cáncer sea un mecanismo de protección de la célula para tratar de impedir la evolución de la enfermedad. Sin embargo, aún no existen antecedentes que permitan confirmar esta hipótesis con certeza. Por todo lo anterior, es fundamental estudiar el papel de este receptor en más detalle con el fin de evaluar su posible potencial como blanco terapéutico del cáncer.

**Tabla 1. Expresión de componentes del SRA en algunos cánceres**

Tipos de Cáncer	Componentes del SRA expresados
Ovárico, Endometrial y Cervical	AngII y AT <sub>1</sub> R
Mama	ACE, AGT, AngI, AngII, AT <sub>1</sub> R, AT <sub>2</sub> R REN
Próstata	ACE, AGT, AngII, AT <sub>1</sub> R y AT <sub>2</sub> R
Pancreático	ACE, ACE2, AngII, AT <sub>1</sub> R y AT <sub>2</sub> R
Gástrico	ACE, AT <sub>1</sub> R y AT <sub>2</sub> R
Otros	ACE, AGT, AT <sub>1</sub> R, AT <sub>2</sub> R, (P)RR y REN

La tabla muestra los principales componentes del SRA expresados por la mayoría de los cánceres. ACE: enzima convertidora de angiotensina I; ACE2: enzima convertidora de angiotensina tipo 2; REN: renina; (P)RR: Receptor de Pro-renina. (Modificado de George y cols., 2010)

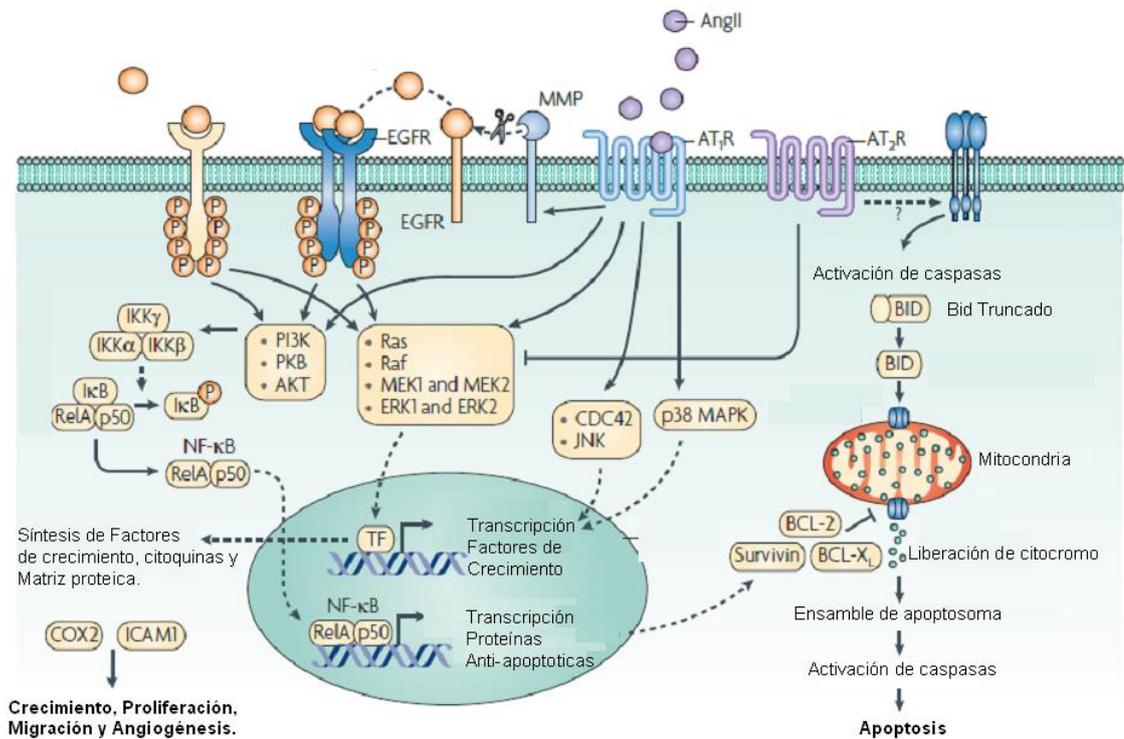
### **AT2R: un blanco terapéutico del SRA para el tratamiento del cáncer.**

El papel que tienen los dos principales receptores del sistema (AT1R y AT2R) en el cáncer es crucial para su progresión ya que modulan la adquisición de las principales características que permiten su desarrollo (Ager y col., 2008). En la mayoría de los casos estudiados, el AT1R juega un rol promotor de la enfermedad mientras que el AT2R tiene un papel antagónico, transformándolo en un atractivo blanco terapéutico.

**AT2R y su acción antiproliferativa.** En las células tumorales, el AT1R es responsable de promover la proliferación en varios tipos de cáncer, mientras que el AT2R contrarresta este efecto (Deshayes y Nahmias, 2005). El AT1R contribuye a mantener señales de crecimiento de manera sostenida, aumentando la actividad de

moléculas claves en el proceso, tales como SRA, ERK1/2 y PKC (Greco y col., 2003). Además, logra el mismo efecto transactivando receptores de factores de crecimiento como EGFR, evento observado tanto en cáncer de próstata como de mama (Deshayes y Nahmias, 2005). Por su parte, el AT2R contrarresta los efectos promovidos por AT1R, evitando la mantención de estas señales de crecimiento gracias a su capacidad de inhibir la autofosforilación del EGFR (George y col., 2010), la activación de fosfatasas que desactivan algunas vías de señalización y también, por promover la actividad de ATIPs (en inglés, *Angiotensin receptor type 2 interacting proteins*), proteínas asociadas al AT2R, las cuales actúan como supresoras de tumores (Xueqiang y col., 2012).

**AT2R y su acción pro-apoptótica.** La regulación de la apoptosis es otro ejemplo del efecto anti-cancerígeno del AT2R (Li y col., 2009). Se ha descrito que mientras el AT1R aumenta la producción de moléculas anti-apoptóticas como survivina y BCL, (George y col., 2010), el AT2R contribuye al efecto inverso al promover la apoptosis de células de cáncer de próstata, procesos en los que participan ERK y las caspasas 8 y 3 (Guimond y col., 2013; Li y col., 2009). También se ha observado el mismo efecto en líneas de cáncer de pulmón, en las cuales se sobreexpresa el AT2R y como consecuencia aumenta la apoptosis por activación de la caspasa-3 (Lara y col., 2011) (**Figura 4**).



**Figura 4. SRR en la regulación de la supervivencia y apoptosis de célula tumoral.** La señalización del SRA regula la proliferación y supervivencia celular. La estimulación de la señalización del AT1R es generalmente pro-inflamatoria, pro-angiogénica, proliferativa y anti-apoptótica. En aspectos como la supervivencia y apoptosis de la célula, el AT1R activa las vías de señalización mitogénicas como MAPK o PI3K, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de la transactivación mediada por el receptor acoplado a proteína G, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o a través de otros mecanismos que incluyen la señalización de CDC42-JNK y p38 MAPK. Dicha señalización finalmente lleva a la activación de los factores de transcripción río abajo, como el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que entre otras cosas, es precursor de la síntesis de factores de crecimiento como citoquinas, matriz y proteínas anti-apoptóticas tales como BCL-XL, survivina y BCL-2. Por su parte, el receptor AT2R juega un rol inhibitorio de la actividad de estas vías de señalización mediante la activación de fosfatasas que desfosforilan algunos componentes de estas vías, evitando por tanto, la supervivencia de la célula y promoviendo su apoptosis (Modificado de George y col., 2010).

**AT2R y su acción anti-angiogénica.** En etapas más avanzadas del cáncer, el AT1R contribuye en la angiogénesis, aumentando la expresión de VEGF, molécula promotora del proceso de angiogénesis (Ager y col., 2011). Además, este receptor se encuentra presente en células que participan en el proceso de angiogénesis tales

como los macrófagos, aumentando su infiltración en el tumor y la expresión de VEGF (Egami y col., 2003). El AT2R, por su parte, antagoniza este proceso al inhibir la fosforilación y activación de VEGFR2 y la óxido nítrico sintasa (eNOS) en células endoteliales, reduciendo de esta manera la migración y formación de túbulos durante el proceso de angiogénesis (Benndorf y col., 2003). Específicamente en el cáncer se ha visto que el efecto anti-angiogénico que tiene AT2R puede reducir incluso la metástasis del cáncer de próstata (Ager y col., 2010).

**AT2R y su acción anti-metastásica.** Finalmente en la metástasis, AT1R favorece el potencial invasivo de células de melanoma al aumentar la expresión de metaloproteasas (MMPs) (Akhavan y col., 2011). Recientemente se ha visto que este receptor promueve metástasis en cáncer de mama, favoreciendo la migración e invasión a través de la activación de la vía PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B (Zhao y col., 2014). También se ha observado el mismo efecto en carcinomas hepatocelulares al aumentar la expresión de TGF- $\beta$ , un importante promotor de la migración celular (Santhekadur y col., 2014)

Aunque en la mayoría de los casos AT2R tiene un efecto anti-cancerígeno, el papel del AT2R es aún controversial en la migración celular. El único efecto anti-metastásico descrito, indica que el AT2R efectivamente disminuye la metástasis en el cáncer de próstata (Ager y col., 2010). Sin embargo, esto sólo se ha explicado como consecuencia del poder anti-angiogénico del receptor, sin relacionar su actividad con mecanismos de migración de la célula tumoral. En contextos no patológicos, el AT2R promueve la migración de algunos tipos celulares neuronales ( Takeuchi y col.,

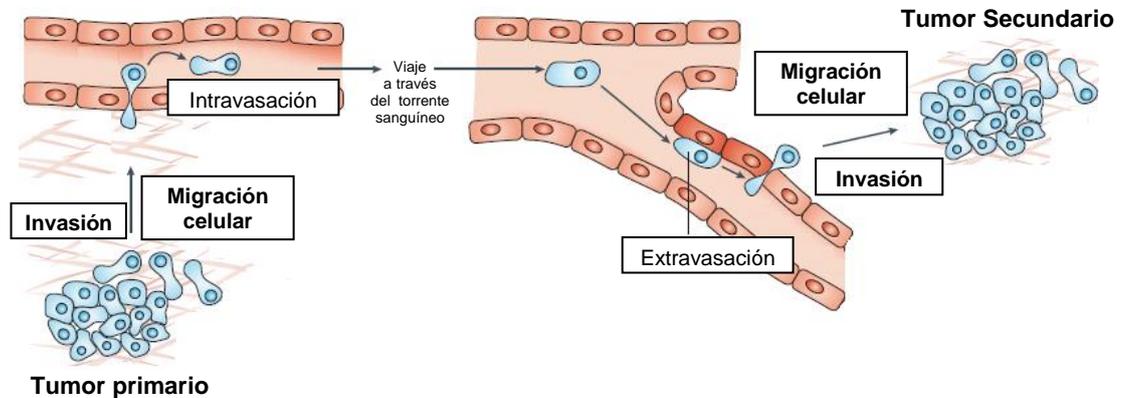
2006; Kilian y col., 2008), mientras que en otros casos, como el de las células endoteliales se comporta como inhibidor de este proceso (Chassagne y col., 2002), dando cuenta de un rol dual, que al parecer, depende del contexto y del tipo celular. Lo anterior deja claro que el AT2R aún no tiene definido una función clara en la migración de células tumorales y mucho menos se conoce el mecanismo que podría explicar su mecanismo de acción.

Esta incógnita ha impulsado el estudio de mecanismos que potencian la metástasis con el fin de entender como AT2R podría influir en ellos.

### **El proceso metastásico es regulado por Caveolina-1**

**Metástasis de células tumorales.** La metástasis es un proceso en el cual las células cancerígenas migran e invaden nuevos tejidos y órganos (**Figura 5**). Durante este proceso, las células primero invaden el tejido que las rodea gracias a la secreción de enzimas que degradan la matriz extracelular (MEC) alrededor del tumor (Friedl y Wolf, 2003). En forma simultánea las células migran a través de la MEC hasta encontrar un vaso sanguíneo, el cual atraviesan en un proceso llamado intravasación (Wyckoff y col., 2000). Una vez que las células tumorales han ingresado al torrente sanguíneo pueden viajar hasta llegar a un nuevo órgano, guiadas gracias a la detección de moléculas quimioattractantes (Balkwill y col, 2012). Finalmente cuando las células tumorales encuentran el órgano que van a colonizar atraviesan nuevamente la pared endotelial en el proceso que se llama extravasación (Stoletov y

col., 2010) para migrar, invadir y conformar un nuevo foco tumoral (tumor secundario) (Reymond y col., 2013).

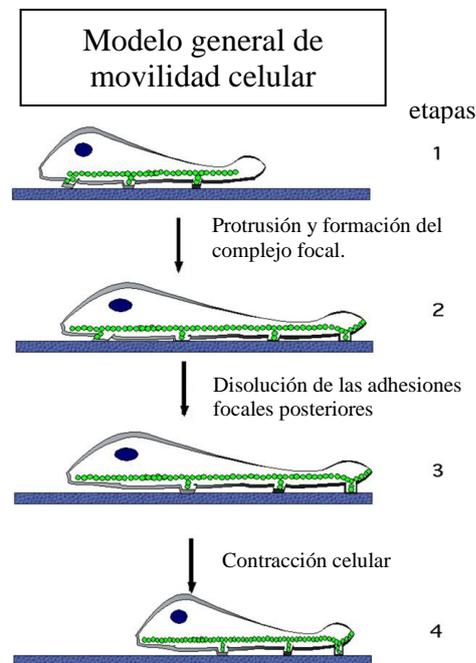


**Figura 5. Modelo de metástasis.** El esquema muestra las diferentes etapas de la metástasis. En primer lugar, las células metastásicas que se liberan del tumor primario comienzan el proceso de invasión de la matriz extracelular (MEC) y su migración a través de ésta. Cuando las células encuentran un vaso sanguíneo atraviesan la pared del endotelio e ingresan al torrente sanguíneo (intravasación). Luego viajan por el torrente sanguíneo hasta otro órgano y vuelven a atravesar la pared para ingresar a este (extravasación). Finalmente las células metastásicas vuelven a migrar e invadir la MEC hasta encontrar un nicho donde conformar el nuevo foco tumoral (Modificado de Sahai 2007).

La migración celular es fundamental durante todo el proceso de metástasis ya que las células deben desplazarse de un lugar a otro para completarlo exitosamente.

**Migración celular.** Para migrar la célula modifica su citoesqueleto para generar prolongaciones de su cuerpo conocidas como lamelipodios y filopodios (Small y Rottner, 2010). Estas prolongaciones son estructuras de locomoción que le permiten formar nuevos contactos con la MEC llamados adhesiones focales (AF). Dichos contactos son complejos proteicos que juegan un papel fundamental durante la migración ya que además de servir como punto de apoyo para retraer el cuerpo celular y migrar en una determinada dirección, se encargan de enviar señales

migratorias hacia el interior de la célula que permite modular el proceso (Beeser & Chernoff, 2004; Wozniak y col., 2004)) (**Figura 6**).



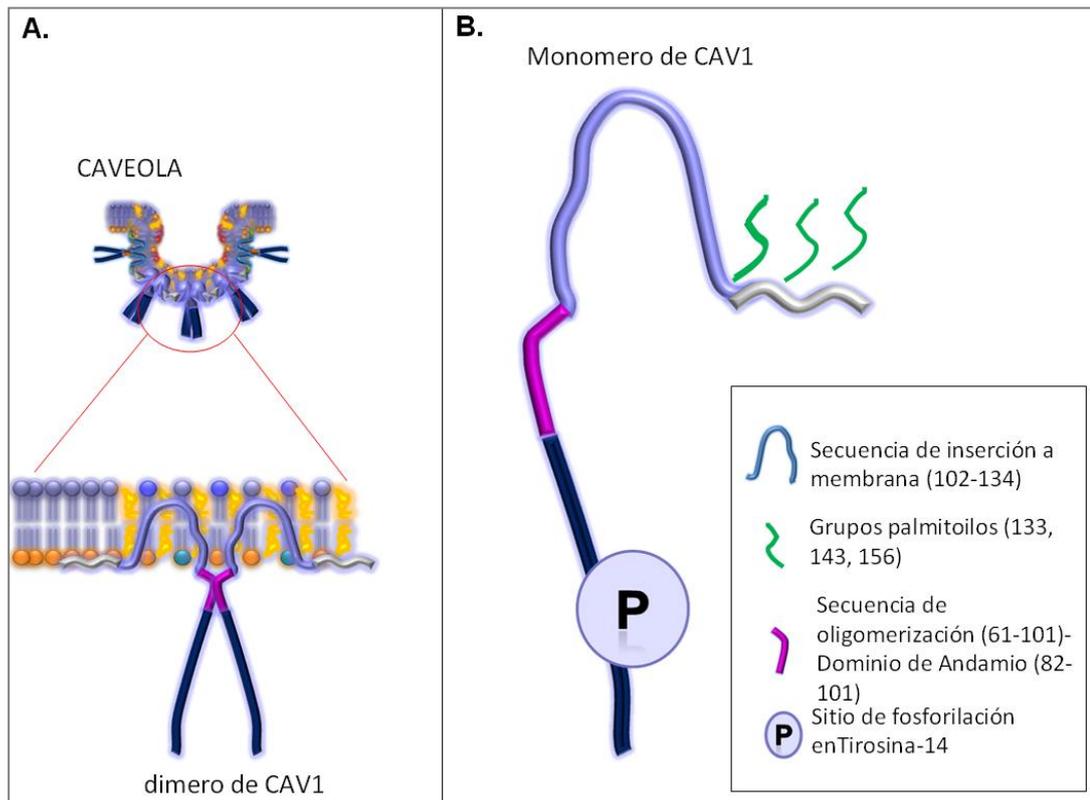
**Figura 6. Modelo de migración celular.** El movimiento que permite la migración celular puede ser dividido en cuatro estadios. En la primera etapa, la célula que está en contacto con la matriz extracelular (MEC) comienza a formar extensiones celulares (filopodia, lamelipodio). En la segunda etapa, dicha extensión forma un complejo focal transitorio con la MEC. En la tercera etapa se desarmen los complejos focales preexistentes para que finalmente en la cuarta etapa la célula se contraiga, desplazándose en una determinada dirección de migración. Cabe destacar que estas etapas no necesariamente se dan en forma secuencial, ya que también pueden ocurrir en forma simultánea. Los pequeños círculos verdes simbolizan la actina polimerizada y el círculo azul, el núcleo. (Modificado de Beeser y Chernoff, 2004).

Una vez que las células han desplazado todo su cuerpo en cierta dirección es necesario que las AF se desarmen para que la célula repita el proceso y avance nuevamente. Para ello las proteínas que la componen son internalizadas en vesículas e incorporadas al tráfico endosomal, el cual las conduce a su reciclamiento o

degradación. Un grupo de proteínas fundamentales en la regulación del tráfico endosomal son las GTPasas Rab, las cuales se encargan de regular la formación, el tráfico y el destino las vesículas (Jordens y col., 2005). De este modo, las GTPasas Rab regulan el recambio de las proteínas que componen las AF, y por tanto, el proceso de migración celular. Algunas investigaciones muestran que alteraciones en la actividad de estas GTPasas Rab, tales como Rab5, pueden acelerar o disminuir la migración de células tumorales e incidir en la metástasis. ( Yu y col., 1999; Lanzetti y col., 2000, 2004; Palamidessi y col., 2008; Torres y col., 2010)

**Caveolina-1 durante la migración.** Existen diversos estímulos migratorios que promueven el remodelamiento del citoesqueleto y recambio de proteínas de AF necesarios para la migración celular. Entre las proteínas que comandan estas acciones se encuentra caveolina-1 (CAV1).

CAV1 es una proteína integral de membrana de 21-24 kDa, tiene un dominio central hidrofóbico que forma una horquilla de inserción en la membrana plasmática. También consta de un dominio entre los residuos 82 y 101, denominado dominio de andamio (CSD) (Caveolin Scaffolding-Domain), el cual permite la interacción con una importante cantidad de moléculas de señalización, claves para ejercer su función (Quest AF y col., 2004; Williams y Lisanti, 2005). Además, cuenta con una región palmitoilada en los residuos de cisteína 133, 143 y 156, que permite su oligomerización y el transporte de colesterol en las caveolas (Monier y col., 1996) **(Figura 7).**



**Figura 7. Estructura de CAV1.** **A.** Esquema de la caveola con CAV1. La amplificación de un dímero de CAV1 muestra el anclaje de esta proteína en la membrana. Se inserta en la membrana gracias a la presencia de su dominio de oligomerización, formando grupos de 14-16 monómeros de la proteína. En este esquema solo se muestra un dímero de CAV1 para simplificar la figura. **B.** Se muestran un monómero de CAV1 con sus diferentes dominios; secuencia de inserción a la membrana, residuos de palmitoilación, secuencia de oligomerización y sitio de fosforilación en Tirosina-14 (Y14) (Modificada de Lobos y col., 2014).

Esta proteína integral de membrana es mayormente conocida por cumplir con una función estructural como componente de las caveolas. Sin embargo, se ha visto que ésta juega un rol fundamental durante la metástasis de varios tipos de cánceres, dado que esta proteína regula el remodelamiento del citoesqueleto de células tumorales. Por ejemplo, algunos trabajos han determinado que la reexpresión de CAV1 en células de cáncer de pulmón promueve la formación de *filopodios*, aumentando la migración celular y el potencial metastático de estas células (Ho y col., 2002). En otras investigaciones se ha visto que el aumento en la expresión de

CAV1 genera incrementos en la extensión celular o “spreading” sobre matrices de colágeno, uno de los fenómenos más importantes durante las primeras etapas de la migración (Nethe y col., 2010). Incluso, se ha descrito que CAV1 potencia la invasión celular ya que promueve la degradación de la MEC, aumentando el potencial invasivo de la célula tumoral (Yamaguchi y col., 2009).

Pero CAV1 no solo se limita a promover migración mediante el remodelamiento del citoesqueleto, sino que también potencia la migración aumentando el recambio de las proteínas de AF. Esto lo hace gracias a su capacidad de influir sobre la regulación de endosomas tempranos (Schnitzer y col., 2001), modulando la actividad de GTPasas pequeñas (Couet y col., 1997) fundamentales durante la migración celular, tales como Rab5 (Quest y col., 2004; Williams y Lisanti, 2005).

Un estudio del papel de CAV1 en la metástasis mostró que esta proteína debe estar fosforilada en el residuo 14, correspondiente a una tirosina (Y) para promover la migración y potenciar la metástasis (Joshi y col., 2008). Se ha descrito que la fosforilación de CAV1 permite que esta proteína se localice en el frente de avance y principalmente en las AF (Nethe y Hordijk, 2011). Una vez allí, la CAV1 fosforilada en Y14 (pY14-CAV1) interactúa con proteínas como FAK y paxilina para promover la formación de estructuras de locomoción, además de favorecer el desensamblaje de las AF, aumentando de esta manera la migración (Goetz y col., 2008). Estos hallazgos han incentivado a explorar aún más los mecanismos que explican como pY14-CAV1 potencia la metástasis.

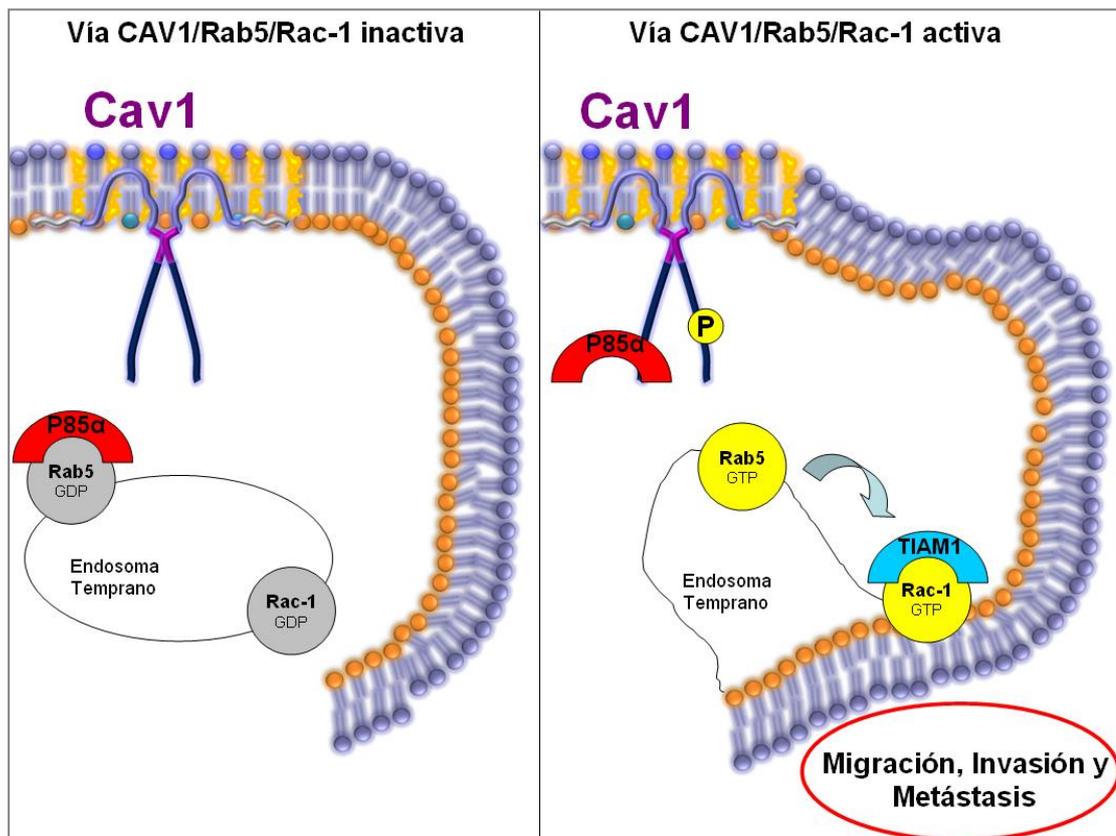
## **La vía promotora de la migración, invasión y metástasis: CAV1/Rab5/Rac1.**

Algunas de nuestras investigaciones han establecido la importancia de pY14-CAV1 en cánceres de melanoma murino y cáncer de mama (Urta y col., 2012; Díaz y col., 2014; Ortiz y col., 2016). Nuestros estudios recientes han permitido dilucidar los mecanismos que explican como pY14-CAV1 puede potenciar la metástasis en estos cánceres.

### **Mecanismo de acción de la vía CAV1/Rab5/Rac1.**

Cuando CAV1 se fosforila en Y14 genera un aumento en los niveles activos de la GTPasa Rab5 ( Goetz y col., 2008; Felicetti y col., 2010; Urta y col., 2012). La activación de Rab5 dada por pY14-CAV1 se debe a que la fosforilación permite el secuestro de p85 $\alpha$ , la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) con actividad Rab-GAP, responsable de mantener a Rab5 en su conformación inactiva (Rab5-GDP). Se ha descrito que cuando Rab5 se encuentra activo (Rab5-GTP) en el endosoma temprano, recluta a TIAM1, una proteína con actividad GEF (en inglés: guanine nucleotide exchange factor) responsable de promover la activación de la GTPasa Rac-1. De este modo, cuando Rac-1-GDP se recicla, transita por el endosoma temprano donde es activada por TIAM1, siendo devuelta a la membrana en su conformación activa (en su conformación Rac-1-GTP). Finalmente, cuando Rac-1 se encuentra activa en la membrana promueve migración celular a través del remodelamiento del citoesqueleto y la formación de estructuras de locomoción (Lanzetti y col., 2004; Palamidessi y col., 2008).

Este circuito de activación secuencial (CAV1→Rab5→Rac1) gatillado inicialmente por la fosforilación de CAV1, sería el responsable de promover migración, invasión y metástasis en el cáncer de mama, colon y melanoma (Díaz y col., 2014) (**Figura 8**).

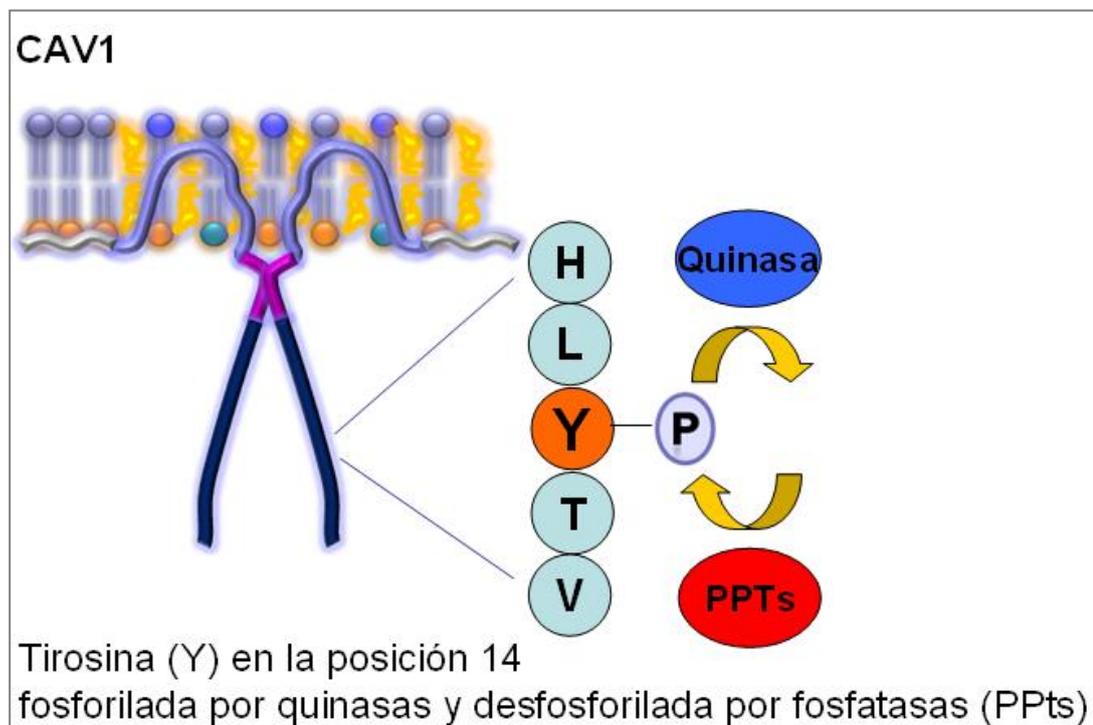


**Figura 8. Vía de promoción de la migración celular CAV1/Rab5/Rac-1.** Para promover la migración, caveolina-1 (CAV1) retiene a p85 $\alpha$ , la subunidad reguladora de PI3K encargada de desactivar a Rab5. Como consecuencia Rab5 permanece activa y en esta conformación recluta a Tiam1, proteína con actividad GEF que es responsable de llevar a Rac-1 de un estado inactivado (asociada a GDP) a otro activado (asociada a GTP). Finalmente la activación de Rac-1 genera estructuras de locomoción en el frente de avance de la célula promoviendo, migración, invasión y metástasis (modelo adaptado desde Díaz y col., 2014).

Dada la importancia de los niveles de **pY14-CAV1** para promover metástasis, se hace muy interesante analizar como se regula esta fosforilación.

## PTP1B modula la fosforilación de Caveolina-1

**La regulación de los niveles de pY14-CAV1.** La fosforilación de CAV1 en Y14 es llevada a cabo por las proteínas tirosina quinasas no receptoras Src, Fyn y Abl en respuesta a estímulos como: insulina, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno e hiperosmolaridad (Nuñez-Wehinger y col., 2014). Sin embargo, también existen fosfatasas responsables de reducir los niveles de fosforilación de este residuo.



**Figura 9. Esquema de la fosforilación y desfosforilación del residuo 14 de CAV1.** El esquema muestra como los niveles de fosforilación de CAV1 en Y14 son controlados por la actividad enzimática de quinasas y proteínas fosfatasas de tirosina (PPTs). Quinasas como Src, Fyn y Abl son responsables de fosforilar este residuo mientras que fosfatasas como PTP1B promueve su desfosforilación.

**PTP1B disminuye los niveles de pY14-Cav1.** PTP1B es una proteína tirosina fosfatasa conocida por regular la señalización de los receptores de insulina y leptina

(Shit y col., 2004; Koren y col., 2007). La importancia de esta proteína en promover enfermedades como la obesidad y diabetes está ampliamente documentada (Cho y col., 2013). Sin embargo, en el contexto del cáncer aún no se ha podido establecer con claridad su rol dado que se ha visto que en algunos casos promueve el desarrollo del cáncer, mientras que en otros lo previene. Por ejemplo, mientras algunos estudios han evidenciado que suprime la transformación celular inducida por los oncogenes *Neu* y *v-Src*, la activación de *Src* y la oncoproteína *p210-bcr-Abl*. Otras investigaciones han revelado que su sobreexpresión induce la metástasis en carcinoma de pulmón (Lessard y col., 2010)

Existen reportes que indican que PTP1B desfosforila el residuo Y14 de CAV1 (Lee y col., 2006; Shin y col., 2006). Este antecedente sugiere que PTP1B podría tener un papel inhibitorio de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Lo anterior es apoyado por resultados obtenidos por nuestro Laboratorio, en los cuales se ha mostrado mediante inmunoprecipitación que CAV1 forma un complejo multiproteico con PTP1B (Natalia Díaz, datos no publicados).

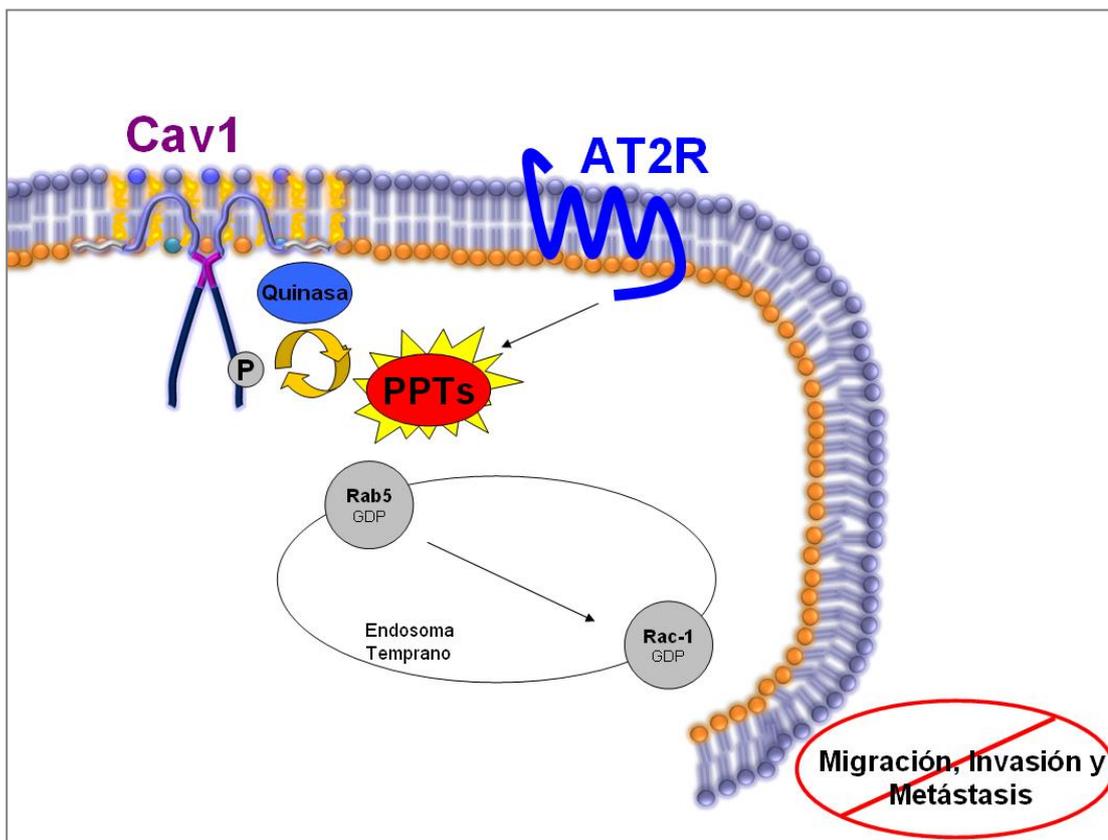
### **AT2R y la vía CAV1/Rab5/Rac-1**

**AT2R y su potencial efecto sobre pY14-CAV1.** Como mencionamos anteriormente uno de los pasos cruciales para encender la vía promotora de la migración CAV1/Rab5/Rac-1 es la fosforilación de CAV en Y14. Algunos componentes del SRA podrían participar en este proceso. Un ejemplo es el AT1R, el cual al ser activado con Ang II promueve la pY14-CAV1 vía *c-Src* como consecuencia del

aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), un conocido activador de estas quinasas (Chen y col., 2012). Este mecanismo es responsable de generar TEM en células epiteliales de riñón. Considerando el rol antagónico de AT2R, es de esperar que la activación de dicho receptor disminuya los niveles de fosforilación mediante la activación de alguna fosfatasa. Sin embargo, aún no hay trabajos que indiquen que su actividad influya sobre alguna fosfatasa que desfosforile a pY14-CAV1 como por ejemplo PTP1B.

A pesar de lo anterior existen antecedentes que sugieren que AT2R podría modular la actividad de esta fosfatasa. Uno de las clásicas acciones del AT2R es disminuir los niveles de ROS a través de la desactivación de NAD(P)H oxidasa (George y col., 2010). Este descenso en los niveles de ROS podría aumentar la actividad de fosfatasas sensibles a ROS. PTP1B es una fosfatasa muy sensible a los cambios de ROS, inactivándose cuando estas moléculas oxidan el residuo Cys localizado en el sitio activo de la enzima ( Mahadev y col., 2001; Liebert y col., 2005). Considerando lo anterior, una disminución en los niveles de ROS podría aumentar la actividad de PTP1B y, por tanto, disminuir los niveles de pY14-CAV1. Lo anterior sugiere que AT2R podría participar como un supresor de la metástasis, inhibiendo la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 mediante la desfosforilación de CAV en Y14.

La **Figura 10** presenta un esquema que resume el posible mecanismo de acción por el cual AT2R podría inhibir la vía CAV1/Rab5/Rac-1.



**Figura 10. Modelo del posible mecanismo de inhibición que AT2R podría ejercer sobre la vía CAV/Rab5/Rac-1.** AT2R actúa promoviendo la desfosforilación de muchas proteínas mediante la activación de fosfatasas (PPTs). Considerando que la vía CAV1/Rab5/Rac-1 promueve la migración, invasión y metástasis cuando CAV1 se fosforila es probable que el AT2R pueda inhibir su actividad, desfosforilando CAV1 mediante la acción de una fosfatasa.

**En resumen los antecedentes indican que:**

- El funcionamiento del SRA influye en el desarrollo del cáncer. Particularmente, los receptores AT1 y AT2 alteran su expresión proteica y actividad en varios tipos de cánceres.
- Estos receptores mantienen su clásico rol antagónico en el contexto del cáncer. Mientras el AT1R promueve el desarrollo de esta enfermedad, el AT2R antagoniza sus efectos.

- El AT2R es propuesto como un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer debido a que previene procesos como la proliferación tumoral, angiogénesis y metástasis. Sin embargo, en el contexto de la metástasis poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales este receptor inhibe la migración de células tumorales.
- La metástasis es potenciada por CAV1 en el melanoma y en el cáncer de mama mediante la actividad de la vía promotora de la migración CAV1/Rab5/Rac-1. Para que CAV1 pueda promover metástasis mediante dicha vía, ella debe estar fosforilada en Y14.
- La fosforilación de CAV1 en Y14 es modulada por las actividades de proteínas quinasas y fosfatasas. Particularmente, la fosfatasa PTP1B es responsable de desfosforilar este residuo. Sin embargo, no se sabe si la actividad de esta fosfatasa podría controlar la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.
- AT1R, el receptor antagónico de AT2R, promueve la fosforilación de CAV1 en Y14. Sin embargo, se desconoce si AT2R promueve la desfosforilación de este residuo. Considerando que AT2R es un conocido activador de fosfatasas, se hipotetiza que el AT2R podría desactivar la vía CAV1/Rab5/Rac-1, promoviendo la desfosforilación de CAV mediante la activación de alguna fosfatasa como PTP1B.

## **Hipótesis de trabajo**

*La activación del AT2R inhibe la vía de señalización CAV1/Rab5/Rac-1, disminuyendo la migración, invasión y potencial metastásico de células tumorales de melanoma murino B16F10 y de mama MDA-MB-231.*

## **Objetivo general**

Determinar si AT2R tiene efectos anti-metastásicos en el cáncer de melanoma y mama.

## **Objetivos específicos:**

- Evaluar la presencia y funcionalidad de los receptores AT1 y AT2 en las células tumorales de melanoma B16F10 y de mama MDA-MB-231.
- Estudiar *in-vitro* si la activación del AT2R inhibe la migración de células tumorales (B16F10 y MDA-MB-231) dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 y determinar el mecanismo responsable.
- Determinar si la activación del AT2R inhibe la metástasis dependiente de la vía transduccional CAV1/Rab5/Rac-1 en modelos animales.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Modelos celulares y cultivo celular:

Se utilizaron las sublíneas obtenidas a partir de la línea celular metastásica de melanoma murino B16F10. Una de las sublíneas utilizadas fueron B16F10(cav-1), que incorporó de manera estable el plasmido pLacIOP(Cav-1) (selección con puromicina 2 µg/mL) que codifica a CAV1, mientras que la transfección con el vector vacío generó las líneas celulares B16F10(mock) (Lobos-González y col., 2013). Para mantener las líneas estables, las células se seleccionaron con 750 µg/ml de higromicina cada 4 semanas. Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI con 10% suero fetal bovino (SFB), estreptomycin 10 µg/ml y penicilina 10.000 U/ml. Las líneas celulares anteriormente mencionadas se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. También, se utilizaron las sublíneas derivadas la línea celular de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231. Las sublíneas celulares utilizadas fueron MDA-MB-231(sh cav-1) y MDA-MB-231(sh ctrl). La primera incorporó de manera estable el plasmidio pLKO.1 (selección con puromicina 2 µg/mL) que codifica un “small hairpin” dirigido contra CAV1 (Urta y cols., 2012) y la segunda incorpora un “small hairpin RNA” no relacionado. Estas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM F12 (GIBCO) con 10% suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina/estreptomycin (GIBCO). Para el ensayo de trasmigración endotelial se utilizaron las células EA.hy que corresponde a una línea celular humana derivada de la fusión de células HUVEC con la línea celular de carcinoma de pulmón A549 (By y col., 2018).

Las líneas celulares anteriormente mencionadas se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2. Western blot**

Para obtener las proteínas totales, se sembraron aproximadamente 100.000 células en placas de 10 cm en medio SBF 10%. Las células se cosecharon en 500 µL PBS con inhibidores de proteasas (BAL, PMSF y OVA). Luego las células se centrifugaron por 2 min a 20.000 x g a 4°C. El pellet se resuspendió en 40 µL de buffer de lisis el cual contiene: 20 mM pH 7.4, detergente NP-40 0,1%, SDS 0,1%, inhibidores de proteasas al 1% (BAL, PMSF y OVA) y fosfatasas para extractos de proteínas totales. Luego de cuantificar mediante el método del BCA se cargaron 50 µg de proteína en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% o 8%, según corresponda. La electroforesis se llevo a cabo durante 1 h a 100 V, posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 2 h a 80 V. Las membranas se bloquearon en gelatina de salmón o leche 5% TBS-Tween 20%, según corresponda. Luego se incubaron con el primer anticuerpo y posteriormente, se incubaron en agitación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugado a HRPO (1:5.000) por 1 h a temperatura ambiente en TBS-Tween 20. Posteriormente, se hicieron tres lavados con TBS-Tween, la detección se realizó mediante el sistema EZ-ECL (Biological Industries) y la señal se capturó por un sistema de quimioluminiscencia modelo Discovery 12iC de Ultralum (Claremont, CA USA). Las bandas obtenidas en el inmunoblot se digitalizaron y analizaron densitométricamente, utilizando el programa ImageJ 1.34 software.

Para los experimentos los anticuerpos primarios se utilizaron en las diluciones descritas en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en la tesis**

Anticuerpo primario	Dilución	Solución de bloqueo	Fabricante
Anti-AT2R	1:1.000	Leche 7% - PBS tween 20	Santa Cruz
Anti-AT1R	1:1.000	Leche 5% - TBS tween 20	Santa Cruz
Caveolina-1	1:3.000	Leche 5% - PBS tween 20	BD Bioscience
p-Caveolina-1	1:3.000	Gelatina 7% - PBS tween 20	BD Bioscience
Anti-PTP1B	1:1.000	Leche 5% - PBS tween 20	Santa Cruz
Rab5	1:3.000	Leche 5% - TBS tween 20	BD Bioscience
Rac-1	1:3.000	Leche 5% - TBS tween 20	BD Bioscience
Anti-GFP	1:2.000	Leche 5% - TBS tween 20	Abcam
Anti-HA	1:1.000	Leche 5% - TBS tween 20	Abcam
p-PKC	1:1.000	Leche 5% - TBS tween 20	Sigma
PKC	1:1.000	Leche 5% - TBS tween 20	Sigma
$\beta$ -actina	1:5.000	Leche 5% - TBS tween 20	Sigma

En la tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados para Western blot, la dilución y la composición de las soluciones de bloqueo utilizadas tanto para bloquear la membrana de nitrocelulosa, como para diluir al anticuerpo.

**Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en la tesis.**

Anticuerpo secundario	Dilución	Solución de lavado	Fabricante
Anti-Ig G conejo	1:5.000	TBS tween 20	BioRad
Anti-Ig G ratón	1:5.000	TBS tween 20	Sigma

En la tabla se muestran los anticuerpos secundarios utilizados para Western blot, la dilución utilizada y la composición de la solución de lavado.

### 3. Ensayo de migración celular en cámara Boyden (transwell)

Se utilizaron insertos de transwell cubiertos por la cara inferior con 100  $\mu$ L de fibronectina (2  $\mu$ g/mL) e incubados a 4°C la noche previa al experimento (Díaz y col., 2015). Al día siguiente, se lavaron los insertos con 500  $\mu$ L de PBS para retirar el exceso de fibronectina y posteriormente a los pocillos de la placa de 24 se les agregó 500  $\mu$ L de medio libre de suero. Se sembraron 50.000 células

suspendidas en 100  $\mu$ L de medio RPMI libre de suero, en la parte superior de cada inserto. Las células se incubaron por 4 h a 37°C. Posteriormente, se tiñó y fijó las células con 500  $\mu$ L de cristal violeta/metanol. Se eliminó el exceso de colorante y cuidadosamente se eliminó las células que quedaron en la cara superior del inserto, dejando sólo las que migraron hacia la cara inferior. Luego, se cuantificó el número de células que migraron, contando las células de 6 campos distintos y en un aumento de 40x.

#### **4. Ensayo de migración transendotelial TEM**

Se sembraron 250.000 células EA.hy suspendidas en medio completo sobre el inserto de transwell y se esperó 72 h para formar la monocapa. Para probar que la capa se formó correctamente se utilizó uno de los Transwell con la monocapa formada para medir la permeabilidad endotelial usando azul dextrano. Se agregó el colorante en el compartimiento superior del inserto de transwell y se dejó 30 min. Luego de este tiempo, se extrajo la solución del compartimiento inferior para luego medir la absorbancia a 620 nm utilizando medio de cultivo como blanco. Se consideró que la monocapa era impermeable si no existen diferencias de absorbancia respecto del blanco. Una vez habiendo comprobado que la monocapa endotelial era impermeable al colorante se realizó el ensayo de TEM. Para ello las células B16F10(mock) y B16F10(cav-1) se lavaron e incubaron con la sonda Cell Tracker Green (5  $\mu$ M) por 45 min en ausencia de suero. Posteriormente, se sembraron 50.000 células B16F10 sobre la monocapa de células endoteliales. Se incubó por 24 h y luego se cuantificó la migración transendotelial (TEM), observando las células

B16F10 verdes al otro lado del inserto de transwell en un microscopio de epifluorescencia. Se cuantificaron 7 campos por condición.

## **5. Silenciamiento del AT2R en células B16F10 mediante shRNA.**

Para silenciar el AT2R se usó el método de transfección con Lipofectamina 2000, según las especificaciones del proveedor utilizando 2 µg del DNA plasmidial. Se transfectó la línea celular B16F10(cav-1) con una mezcla de 5 vectores pLKO.1 que codifican para 5 shRNAs distintos contra el mRNA del AT2R (*MISSION® shRNA Bacterial Glycerol Stock SHCLNG-NM\_007429*) o con el vector vacío (Plasmidio #1864addGene). Luego de una semana de selección con puromicina (5µg/mL) se generaron clones de las células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R) y se evaluó la expresión del AT2R mediante WB.

## **6. Sobreexpresión del AT2R en células MDA-MB-231 mediante transducción adenoviral**

Se utilizó la construcción Ad-GFP-NHA-AT2R donado por el Dr. Walter G. Thomas (Baker Medical Research Institute, Melbourne, Australia). Este adenovirus es bicistrónico ya que co-expresa el AT2R de rata (con epítopo HA en extremo N-terminal) y GFP como marcador de la transducción, dirigidos por el promotor CMV. Para el control de actividad biológica se utilizó el adenovirus AdGFP que conduce la expresión de la proteína GFP bajo el control del mismo promotor. Se sembraron  $1 \times 10^5$  en placas de cultivo, privadas de suero y transducidas con los adenovirus por 48

h a una multiplicidad de infección (MOI) de 25.000 para AdGFP y de 500.000 para AdAT2R.

### **7. Determinación del número de células transducidas por citometría de flujo.**

Para determinar el porcentaje de células transducidas exitosamente se evaluó el porcentaje de células GFP positivas mediante citometría de flujo. Para ello las células previamente transducidas por 48 h en placas de 6 pocillos se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se resuspendieron 50.000 células en 300  $\mu$ L de tampón fosfato salino (PBS) suplementado con 2% suero fetal bovino. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en un FACS Canto (Beckton Dickinson). El porcentaje de células GFP positivas fue determinado tomando como referencia células sin transducir.

### **8. Ensayo de pull down para Rab 5 y Rac-1**

Para detectar la forma activa de las proteínas Rab 5 y Rac-1 se realizó el ensayo de pull down con las proteínas de fusión GST-R5BD y GST-PBD respectivamente, como se describió previamente (Díaz y col., 2014). Brevemente, las células se homogenizaron en una solución isotónica compuesta por HEPES 25 mM (pH7.4), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (benzamidina 100  $\mu$ g/mL, antipaina 10  $\mu$ g/mL, leupeptina 12,5  $\mu$ g/mL). Los extractos se incubaron por 5 min en hielo y centrifugados a 10,000 x g durante 1 min a 4°C. Los sobrenadantes post-nucleares se

usaron para ensayos de precipitación por afinidad utilizando 30 µg de perlas de Glutathion-Sepharosa precubiertos con GST-R5BD o GST-PBD por condición. Las perlas se incubaron con los sobrenadantes por 15 min a 4°C en un agitador rotatorio. Posteriormente, las perlas se recolectaron, lavaron con tampón compuesto por NP-40 al 0,01%, centrifugados a 10,000 x g durante 1 min a 4°C. Las perlas se solubilizaron en buffer de carga, hervidas durante 5 min a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 100 V. Finalmente, se realizó un Western blot convencional utilizando los anticuerpos específicos para detectar la presencia de Rab 5 y Rac-1.

## **9. Ensayo de FRET**

Se sembraron aproximadamente 300.000 células en placas de 60 mm. Las células se transfectaron con el plásmido biosensor Raichu-Rac1 (2,5 µg) donado por el Dr. Alfredo Cáceres de la Universidad Nacional de Córdoba. Este plásmido codifica para una proteína de fusión que contiene a la proteína Rac-1 y a su efector PAK, ambos con fluoroforos acoplados CFP y YFP. Esto permite que la molécula emita en una determinada longitud de onda cuando Rac-1 se encuentra en su conformación activa (535 nm) y otra longitud de onda cuando se encuentra inactiva (480 nm). 24 h luego de la transfección se realizaron múltiples heridas en la monocapa como estímulo migratorio. Para ello se utilizó un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS). Luego del lavado se agregó medio con

3% de SFB para estimular la migración y se midió la fluorescencia a 535 y 480 nm de una célula única utilizando un microscopio Leica Macro zoom como se describe en (Kardash y Cols., 2011). Transcurrido 1 min de medición se agregó CGP42112 (1  $\mu$ M) y se siguió midiendo la fluorescencia hasta completar 30 min. Finalmente los datos se procesaron mediante el software Image J para obtener un mapa de calor de las zonas en donde Rac-1 se encuentra activo en la célula.

## **10. Inmunoprecipitación de PTP1B**

Las células se recolectaron con PBS suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 10 mM, benzamida 100  $\mu$ g/mL, antipain 10  $\mu$ g/mL y leupeptina 12,5  $\mu$ g/mL) en hielo. Posteriormente, ellas se lisaron por 15 min con Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP40 1% y el coctel de inhibidores descritos anteriormente. El homogenizado se centrifugó a 16.000 x g por 2 min y se determinó la concentración de proteínas mediante el método del BCA en el sobrenadante. Se inmunoprecipitaron 2 mg de proteínas con 2,5  $\mu$ g de anticuerpo primario (anti-PTP1B policlonal) por 3 h a 4°C con rotación. Luego se agregaron 25  $\mu$ l de una mezcla 1:1 de proteína A/G agarosa, durante 12 h con rotación a 4°C. A continuación la suspensión se centrifugó a 1500 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 70  $\mu$ L tampón de carga para su posterior análisis por Western blot junto al extracto proteico total “*input*”.

## **11. Medición de la actividad de PTP1B**

Se precipitó PTP1B tal como se describió anteriormente y el precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ L tampón acetato pH 5,6. Luego se agregó 5,5  $\mu$ L de p-nitrofenil fosfato como sustrato, la mezcla se incubó a 37°C y se midió la absorbancia (415 nm) a diferentes tiempos mediante un espectrofotómetro.

## **12. Ensayo de metástasis en ratones C57BL/6**

Estos experimentos se realizaron como se describió previamente (Lobos y col., 2013). Los ratones C57BL/6 de 8-12 semanas de edad se sub-dividieron en cuatro grupos, los cuales recibieron una inyección i.v. por la vena lateral de la cola de 200.000 células B16F10(mock), B16F10(cav-1), B16F10(cav-1/sh ctrl.) y B16F10-(cav-1/sh AT2R). Una vez que los animales llegaron al día 21 post inyección se sacrificaron, para posteriormente extraer el pulmón, el cual se fijó en la solución de Feketes (Ausubel y col., 1996). Una vez fijado el pulmón, se pesó el tejido completo, luego se separó y pesó la masa tumoral (negra) y se registraron las diferencias. En forma paralela se evaluó la metástasis en otros órganos. Se muestran resultados del pulmón, lugar principal de la metástasis.

## **13. Análisis estadístico**

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces por separado. Los datos se

presentan como promedio  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se analizó con el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones entre distintos grupos, con un post test de Dunn y con el test no-paramétrico de Mann-Whitney para comparación entre dos grupos. Para el análisis de los datos, un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

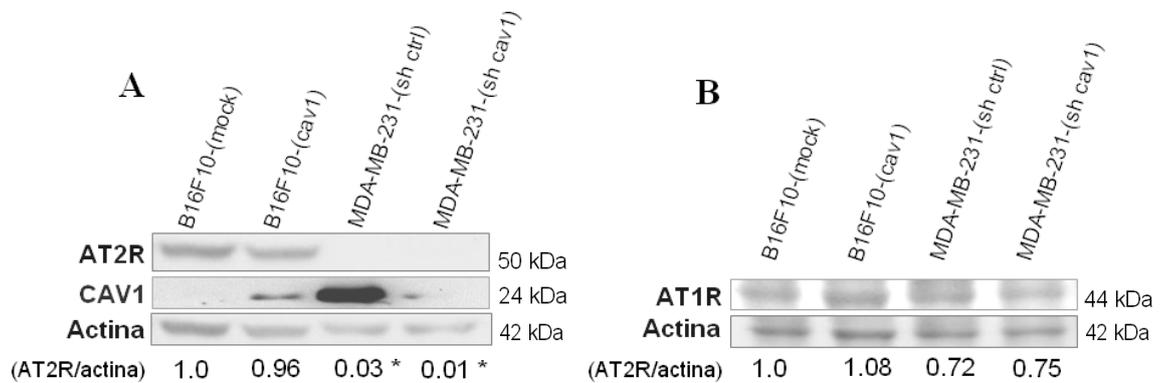
## RESULTADOS

**OBJETIVO 1: Evaluar la presencia y funcionalidad de los receptores AT1 y AT2 en las células tumorales de melanoma B16F10 y de mama MDA-MB-231.**

**AT2R se expresa en las células B16F10, pero no en las células MDA-MB-231**

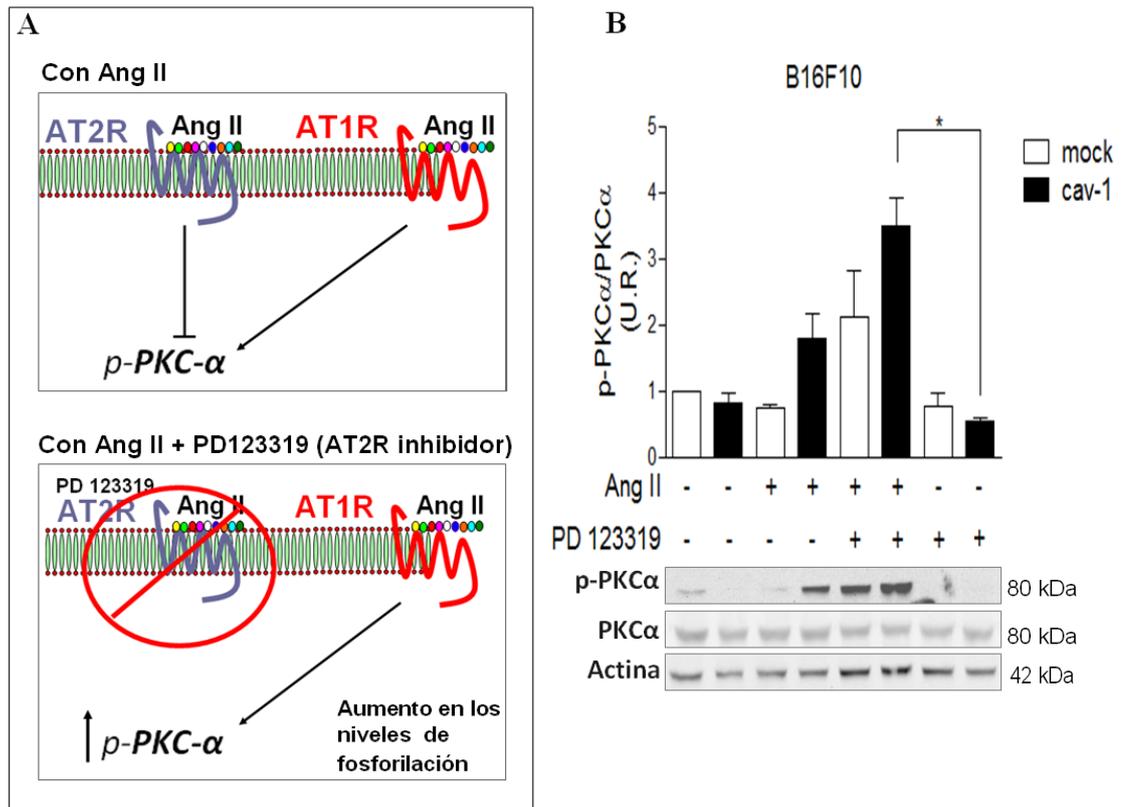
Para evaluar el papel del AT2R en la vía transduccional CAV1/Rab5/Rac-1 se seleccionaron líneas celulares de cáncer que generan metástasis mediante esta vía. Trabajos previos a esta investigación determinaron que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y las células de melanoma murino B16F10 generan metástasis de manera dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Las células MDA-MB-231 y B16F10 expresan altos y bajos niveles de CAV1, respectivamente. En dichos trabajos se determinó que las mutantes que sobre-expresan CAV1 en el caso de B16F10 (B16F10(cav-1)) aumentaron su migración y metástasis en comparación a las células B16F10(mock) mediante la vía CAV1/Rab5/Rac-1, mientras que los mutantes en que se silenció la expresión de CAV1, como es el caso de las MDA-MB-231 (MDA-MB-231(sh cav-1)), ocurrió todo lo contrario ( Urra y col., 2012; Díaz y col., 2014). Aunque la literatura sugiere que el AT2R podría ser un potencial blanco terapéutico en este tipo de cáncer (Guimond y col., 2013; Namsolleck y col., 2014) aún no existen antecedentes que determinen su expresión en estas dos líneas celulares. Por esta razón se determinaron los niveles de expresión del AT2R en las líneas celulares B16F10(cav-1), B16F10(mock), MDA-MB-231(sh cav-1) y MDA-MB-231(sh ctrl) mediante análisis por Western blot.

Los resultados muestran que las células tumorales de cáncer de melanoma B16F10(mock) y B16F10(cav-1) expresan niveles similares del AT2R (**Figura 11A**). Su expresión es independiente de CAV1 ya que los niveles proteicos son similares en ambos tipos celulares B16F10(mock) y B16F10(cav-1). En cuanto a las MDA-MB-231, no se detectó expresión del AT2R.



**Figura 11. Expresión del AT2R y del AT1R en células tumorales.** Los extractos proteicos de las células B16F10 y de las MDA-MB-231 se separaron mediante SDS-PAGE al 12% y se analizaron mediante Western blot (WB) con el anticuerpo anti-AT1R, anti-AT2R, anti-CAV1, y anti-Actina. **(A)** WB representativo de tres experimentos independientes donde se evaluaron los niveles proteicos del AT2R de B16F10(mock) ( $1,0 \pm 0,04$ ), B16F10(cav-1) ( $0,96 \pm 0,22$ ), MDA-MB-231(sh ctrl) ( $0,03 \pm 0,01$ ) y MDA-MB-231(sh cav-1) ( $0,01 \pm 0,01$ ). Los datos se expresan como el promedio del análisis densitométrico de los niveles proteicos del AT2R respecto a actina, normalizado con respecto a los niveles de B16F10(mock). **(B)** WB representativo de tres experimentos independientes donde se evaluaron los niveles proteicos del AT1R de B16F10(mock) ( $1,00 \pm 0,22$ ), B16F10(cav-1) ( $1,08 \pm 0,26$ ), MDA-MB-231(sh ctrl) ( $0,72 \pm 0,08$ ) y MDA-MB-231(sh cav-1) ( $0,75 \pm 0,22$ ). Los valores corresponden al promedio del análisis densitométrico de los niveles proteicos del AT2R respecto de actina, normalizado con respecto a los niveles de B16F10(mock). Todas las comparaciones estadísticas se realizaron con respecto a las células B16F10(mock) y las diferencias estadísticas se indican como  $*p < 0,05$ .

Como la principal función del AT2R es antagonizar los efectos de AT1R en la célula, también se evaluaron los niveles de este último receptor. Los resultados muestran que la expresión es similar en los todos los tipos celulares evaluados (**Figura 11B**). La presencia del AT1R permitió determinar la funcionalidad de AT2R, evaluando la capacidad de AT2R de antagonizar los efectos de AT1R mediante la desfosforilación de moléculas que son clásicamente fosforiladas por el AT1R, como por ejemplo la proteína kinasa C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ). Para este fin, las células se estimularon con Ang II, un agonista de ambos receptores, que induce fosforilación de PKC $\alpha$  (p-PKC $\alpha$ ) a través del AT1R y desfosforilación de la misma molécula a través del AT2R (**Figura 12A**). Las células se incubaron, con Ang II (1  $\mu$ M) por 15 min en presencia o ausencia del antagonista de AT2R PD123319 (1  $\mu$ M) y también con el antagonista solo. Los resultados muestran que la incubación de las células con Ang II aumentó los niveles de p-PKC $\alpha$  en las células B16F10(cav-1), mientras que disminuyó los niveles en el caso de las B16F10(mock). Sin embargo, independiente de los cambios que induce Ang II, la inhibición del AT2R con PD123319 siempre aumentó los niveles de fosforilación de PKC $\alpha$  en ambos tipos celulares. Sin embargo, estos cambios solo resultaron ser significativos al comparar con el inhibidor. Este resultado si bien sugiere que AT2R es el responsable de mantener bajos los niveles de p-PKC $\alpha$  no permite comprobar la funcionalidad de este receptor en las células B16F10 (**Figura 12B**).

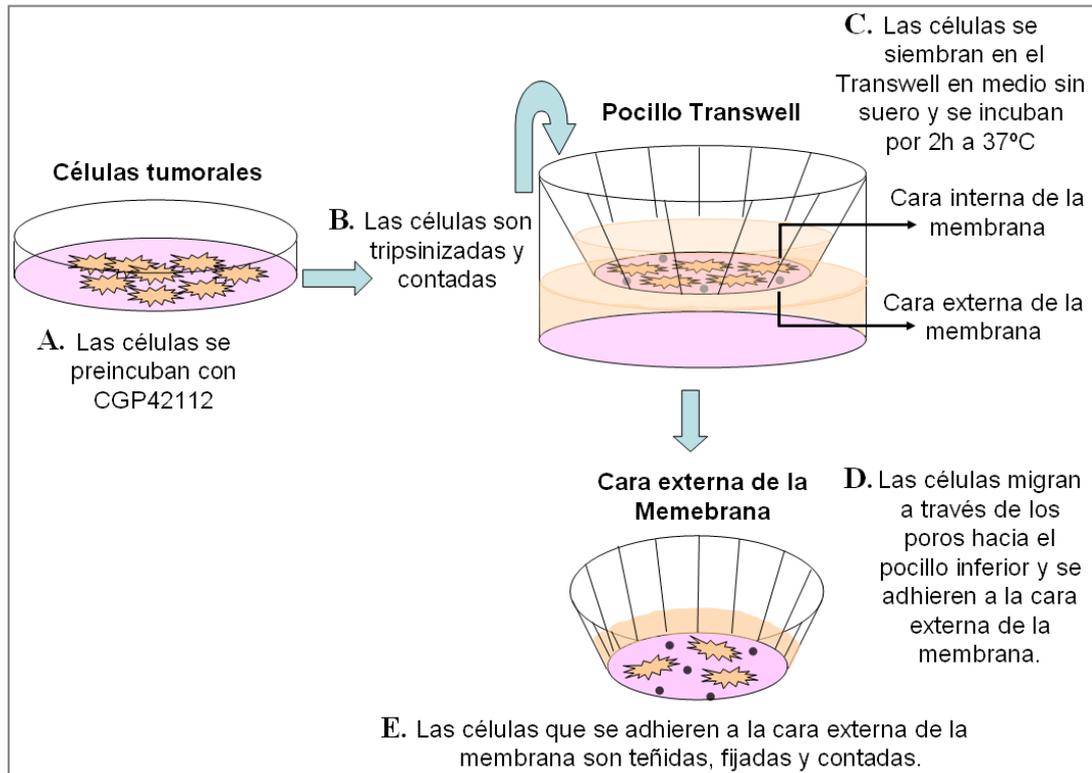


**Figura 12. Actividad del AT2R en B16F10.** Para evaluar la actividad del AT2R, las células se pre-incubaron con Ang II (1  $\mu\text{M}$ ) y PD 123319 (10  $\mu\text{M}$ ) por 15 min, luego se extrajeron las proteínas de ambos tipos celulares para ser separados mediante SDS-PAGE al 8% y analizados mediante WB usando los anticuerpos anti-p-PKC $\alpha$ , anti-PKC $\alpha$  y anti-Actina. (A) Esquema del cambio de los niveles de fosforilación de PKC $\alpha$  cuando los receptores AT2 y AT1 son activados o inhibidos. El recuadro superior muestra que en presencia de Ang II, AT1R promueve la fosforilación PKC $\alpha$  mientras que simultáneamente AT2R promueve su desfosforilación. El recuadro inferior muestra lo que sucede cuando además de Ang II se agrega un inhibidor del AT2R. La inhibición del AT2R aumenta los niveles de fosforilación como consecuencia del bloqueo en la actividad del receptor. (B) Análisis densitométrico de los niveles de fosforilación de PKC $\alpha$  luego de la exposición por 15 min con Ang II y/o PD123319. El gráfico corresponde al promedio de los niveles de la fosforilación de PKC $\alpha$  de 3 experimentos independientes expresado como unidades relativas (U.R.). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas como \*  $p < 0.05$ .

**OBJETIVO 2: Probar *in-vitro* si la activación del AT2R inhibe la migración de células tumorales (B16-F10 y MDA-MB-231) dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 y determinar el mecanismo responsable.**

**La activación del AT2R ejerce un rol anti-migratorio en las células tumorales que lo expresan.**

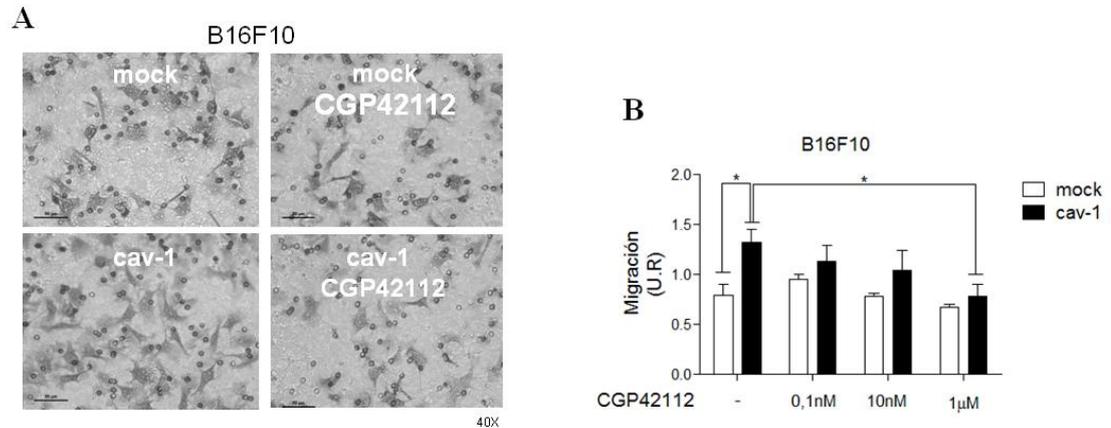
Para evaluar el efecto que tiene AT2R sobre la migración celular fue necesario activarlo. Como Ang II, su ligando endógeno, es también ligando para otros receptores tales como AT1R, se usó el ligando específico CGP42112 para AT2R. Se evaluó si la activación del AT2R disminuye el potencial migratorio de las células tumorales mediante el ensayo de trans migración en cámara Boyden (Transwell). Este ensayo consiste en sembrar células tumorales en el pocillo superior, en medio sin suero, para que éstas migren hacia el pocillo inferior, atravesando un filtro poroso, en respuesta a un estímulo migratorio, que en este caso es el medio de cultivo con suero. Transcurrido un tiempo, las células se fijan y se tiñen para finalmente cuantificar el número de células que migraron desde el pocillo superior al inferior (**Figura 13**). Usando esta técnica se determinó si la preincubación de estas células con el ligando CGP42112 disminuye la migración celular. Para determinar la concentración efectiva a la que CGP42112 disminuyó la migración se probaron diferentes concentraciones entre 0,1 nM hasta 1µM.



**Figura 13. Esquema del ensayo de trans migración en placa Transwell.** **A.** En primer lugar, las células se preincuban con CGP42112. **B.** Transcurrido el tiempo de incubación (30 min), las células son lavadas, tripsinizadas y contadas. **C.** Se siembran 200.000 células en el Transwell (pocillo superior) resuspendidas en 200  $\mu$ l de medio sin suero y se incuban por 2 h a 37°C. El fondo del Transwell es una membrana porosa, la cual puede ser atravesada por las células desde el interior del Transwell (cara interna de la membrana) hacia el pocillo inferior (cara externa de la membrana) en respuesta a un estímulo migratorio que proviene desde ahí. **D.** Una vez que las células atravesaron la membrana, se adhieren a la cara externa de la membrana gracias a que esta cara fue incubada previamente con fibronectina, una proteína que permite que la célula se adhiera y se extienda. Las células que aún permanecen dentro del Transwell son removidas e eliminadas. **E.** Finalmente, las células que se encuentran adheridas en la cara externa de la membrana son teñidas, fijadas con Cristal Violeta y contadas con ayuda de un microscopio invertido.

La **Figura 14A** muestra una fotografía representativa de la cara inferior del Transwell. En las condiciones control (en ausencia de ligando), las B16F10(cav-1) migraron más que B16F10(mock) debido a que tienen más activa la vía migratoria CAV1/Rab5/Rac-1. Sin embargo, cuando se preincubó por 30 min con CGP42112 a diferentes concentraciones del ligando, disminuyó la migración de las células B16F10(cav-1) solamente en forma significativa cuando se usó una concentración 1

$\mu$ M. Interesantemente, la migración disminuyó a niveles similares a los que muestran las células B16F10(mock), lo que sugiere una inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 (Figura 14B).



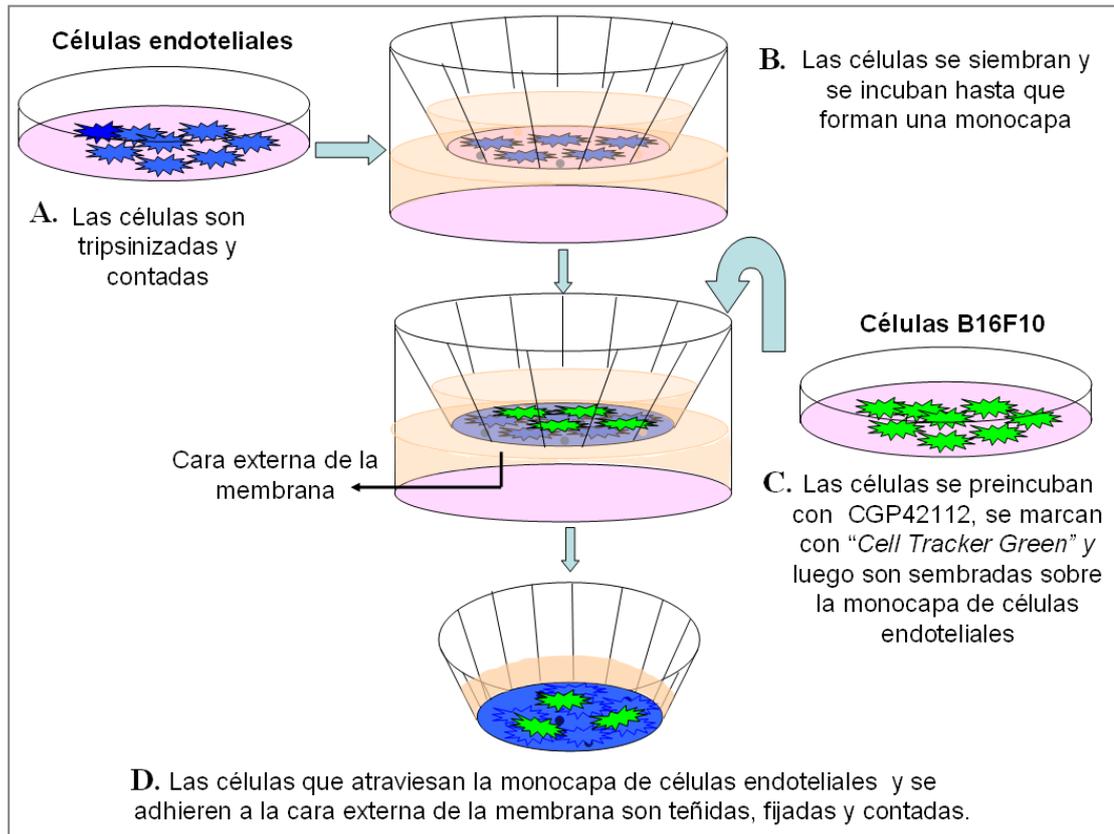
**Figura 14. Migración de células B16-F10 pre-incubadas con agonista del AT2R CGP42112.** Para el ensayo de trans migración en Transwell, las células se preincubaron por 30 min a diferentes concentraciones con CGP42112 y luego se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se sembraron 200.000 células en la cámara superior del Transwell en RPMI sin suero, mientras la cámara inferior contenía RPMI con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 h, posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se eliminaron las células de la cámara superior del pocillo (células que no migraron). Finalmente mediante un microscopio se fotografió el fondo del pocillo superior y se contabilizaron las células que lo atravesaron. En **A** se muestra una fotografía 40X representativa del ensayo trans migración en Transwell del fondo de la cámara superior del pocillo en la cual se muestran las células que migraron luego del estímulo. En **B** se muestra gráfico con la cuantificación del promedio del número de células que migraron en 3 experimentos independientes expresado como unidades relativas (U.R.). Las comparación estadística de todas las condiciones fue hecha con respecto a las células B16F10(cav-1) en ausencia de estímulo y sus diferencias están indicadas como \*(p<0,05).

Durante la metástasis, las células tumorales además de migrar e invadir la matriz extracelular deben superar obstáculos para llegar a su destino, siendo uno de éstos la pared endotelial de los vasos sanguíneos. Para que las células tumorales logren llegar a otro sitio del organismo deben atravesar la pared endotelial para entrar en el torrente sanguíneo (intravasación) y luego para salir de este medio (extravasación) ( Wyckoff y col., 2000; Stoletov y col., 2010). Este proceso además

de la migración le exige a las células tumorales una interacción con las células endoteliales que les permita el libre acceso al torrente sanguíneo.

Resultados de nuestro Laboratorio (no publicados) muestran que la vía CAV/Rab5/Rac-1 potencia la migración incluso cuando las células deben atravesar la pared endotelial. Considerando la importancia de esta etapa en la metástasis, se estudió si los efectos del AT2R sobre la migración podrían mantenerse mientras las células deben atravesar la pared endotelial.

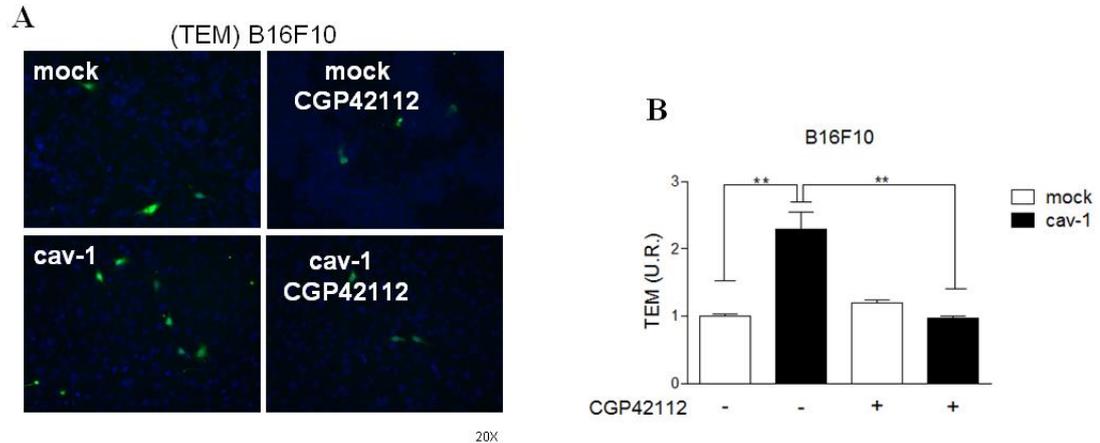
Para responder esta interrogante, se realizó el ensayo de trasmigración endotelial (TEM), el cual consiste en sembrar células tumorales en la cámara superior en medio de cultivo, incubar por 24 h y cuantificar las células que atraviesan un filtro poroso que se encuentra cubierto por una monocapa de células endoteliales humanas Ea.hy. A diferencia del ensayo anterior, en este caso las células que atraviesan la membrana no solo debieron migrar por más tiempo sino también atravesar la monocapa de células endoteliales, invadir su matriz y establecerse en la cara externa de la membrana (**Figura 15**).



**Figura 15. Esquema del ensayo de trasmigración endotelial (TEM).** **A.** Las células endoteliales (EA.hy) se tripinizan, se cuentan y se siembran sobre el pocillo superior. **B.** Luego de 72 h de incubación, estas células proliferan hasta formar una monocapa sobre la membrana porosa. **C.** Por su parte las células B16F10 son preincubadas por 30 min, marcadas con "Cell Tracker Green", tripsinizadas y contadas para ser sembradas sobre la monocapa de células EA.hy previamente formada. **D.** Durante las 24 h de incubación, las células migratorias que atraviesan la monocapa de células EA.hy y la membrana porosa en respuesta al estímulo migratorio se adhieren a la cara externa de la membrana. Finalmente estas células son fijadas y contadas con ayuda de un microscopio invertido.

La **Figura 16A** muestra una fotografía representativa de la cara externa de la membrana del TEM. Los resultados muestran un resultado similar al obtenido con el ensayo anterior. Se observa una diferencia significativa entre las condiciones controles, en que las células B16F10(cav-1) migran más que B16F10(mock). Sin embargo, esta diferencia desaparece cuando se preincubó por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M), tal como ocurrió en el ensayo anterior **Figura 16B**. El resultado corroboró el efecto anti-migratorio del AT2R sobre células que expresan CAV1, sugiriendo

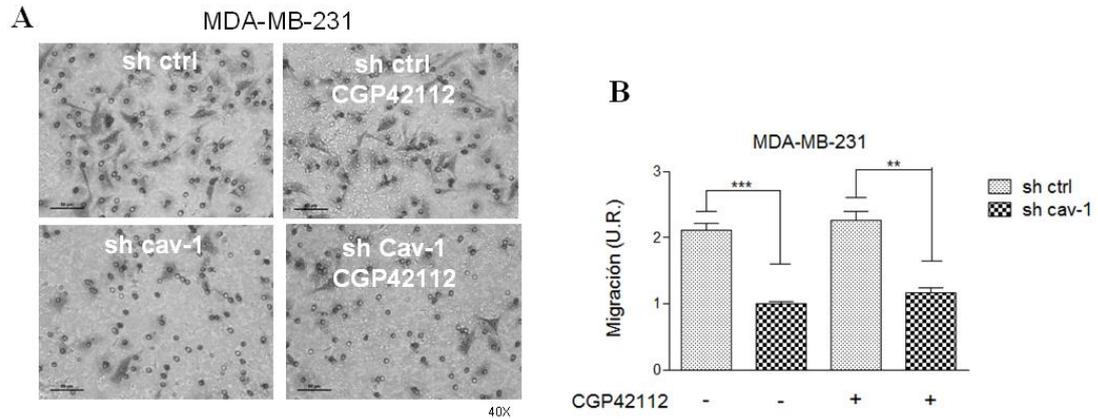
nuevamente que el efecto de AT2R podría ser sobre la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Además, sugiere que una pre-incubación de 30 min con CGP42112 es suficiente para influir en procesos migratorios más complejos, como en la metástasis.



**Figura 16. Migración transendotelial de células B16F10 pre-incubadas con el agonista del AT2R.** Para el ensayo de migración transendotelial (TEM), las células se preincubaron con CGP42112 (1  $\mu$ M) por 30 min y luego se marcaron con *Cell Tracker Green*, se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se sembraron 50.000 células en el pocillo TEM, el cual tiene previamente formada la monocapa de células endoteliales (EA.hy) en RPMI sin suero, mientras la cámara inferior contiene RPMI con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 h y luego se fijaron y marcaron con DAPI. Mediante un microscopio se fotografió la cara externa de la membrana y se contabilizaron las células que atravesaron la monocapa. En **A** se muestra una fotografía representativa a 20x del ensayo de TEM de la cara externa de la membrana en la cual se muestran las células que migraron (en verde) luego del estímulo. En **B** se muestra el gráfico con la cuantificación del promedio del número de células que migraron en 3 experimentos independientes expresados como unidades relativas (U.R.) La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1) en ausencia de estímulo y sus diferencias están indicadas como \*\* $p < 0,01$  o \* $p < 0,05$ .

Por otra parte, también se evaluó el efecto anti-migratorio del AT2R en las MDA-MB-231. Los altos niveles de CAV1 presentes en estas células de manera endógena hace que presenten un potenciamiento de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. El silenciamiento de CAV1 en estas células disminuye considerablemente sus niveles de migración, tal como podemos apreciar en la **Figura 17 A y B**. En este caso, a diferencia de lo que ocurría con las B16F10, las células estimuladas con CGP42112,

no modificaron su migración, lo cual puede ser explicado por la ausencia del AT2R en estas células, lo que se constató en el objetivo anterior mediante WB (**Figura 11A**).



**Figura 17. Migración de células MDA-MB-231 pre-incubadas con el agonista del AT2R.** Las células se pre-incubaron por 30 min con ligando del AT2R, luego se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se sembraron 150.000 células en la cámara superior del Transwell en DMEM F12 sin suero, mientras en la cámara inferior se adicionó DMEM F12 con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 h, posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se lavaron para eliminar las células de la cámara superior del pocillo (células que no migraron). Finalmente mediante un microscopio se fotografió el fondo del pocillo superior y se contabilizaron las células que la atravesaron la membrana. En **A** se muestra una fotografía representativa tomada a un aumento de 40x de la cara externa de la membrana del Transwell en la cual se aprecian las células que migraron luego de la pre-incubación con CGP42112 (1 μM) y el vehículo (agua). En **B** se muestra el gráfico del promedio del número de células que migraron en 3 experimentos independientes luego de una pre-incubación de 30 min con CGP42112 (1 μM) expresados como unidades relativas (U.R.). La comparación estadística fue hecha entre las células MDA-MB-231(sh ctrl) vs MDA-MB-231(sh cav-1) con o sin estímulo de manera independiente y sus diferencias están indicadas como \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01 y \*p<0,05.

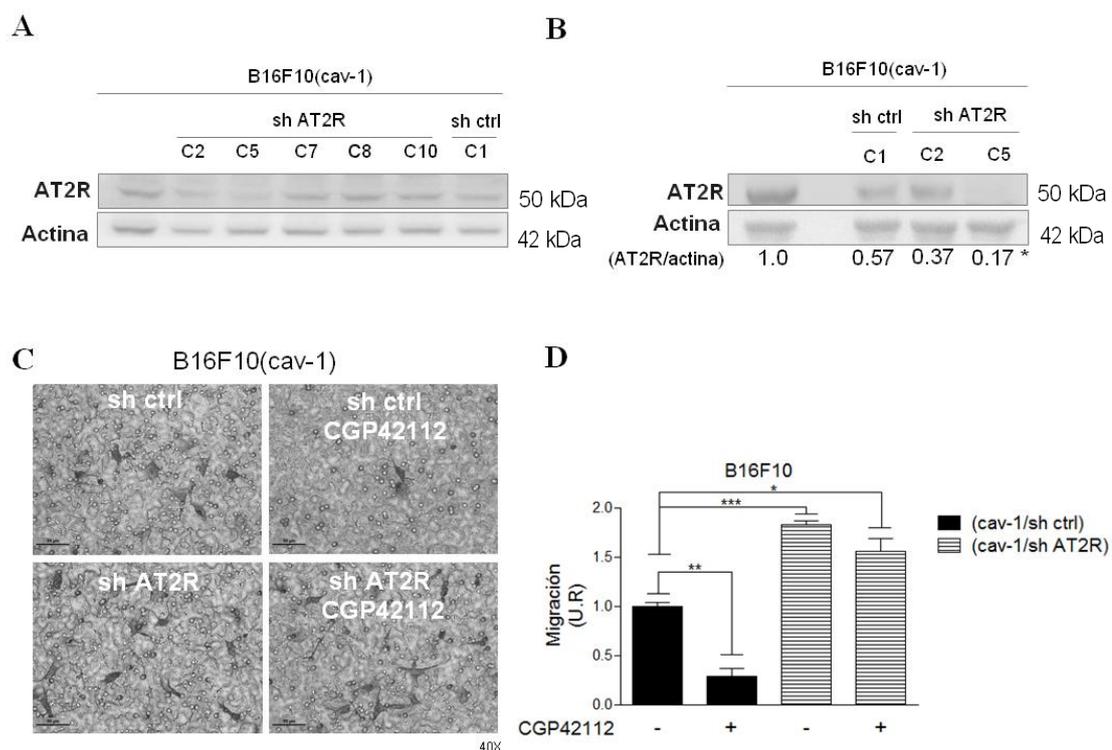
El efecto anti-migratorio observado con CGP42112 sugiere que la activación del AT2R tiene un efecto anti-migratorio en estas líneas celulares. Dada la gran similitud que existe entre este receptor y otros componentes del SRA fue necesario asegurarnos de que el efecto anti-migratorio de CGP42112 era debido a la activación del AT2R y no mediante otro receptor. Para ello se silenció el AT2R en las células

que expresaban el receptor (B16F10) y se sobreexpresó el AT2R en las células que no lo expresaron endógenamente (MDA-MB-231). Luego se evaluó como varía el potencial migratorio de estas células en presencia o ausencia del ligando CGP42112.

El silenciamiento del receptor se llevó a cabo solo en las células B16F10(cav-1) ya que eran las únicas en las que el receptor ha mostrado tener un efecto anti-migratorio. Estas células se transfectaron con una mezcla de 5 plásmidos que codifican un shRNA contra el RNA mensajero del AT2R (shAT2R) o alternativamente con el plásmido scramble (sh ctrl). Luego mediante selección clonal se obtuvieron mutantes con diferentes niveles de expresión del AT2R. Este tratamiento básicamente consistió en que luego de transfectar las células con la mezcla de shRNA contra AT2R o el sh ctrl se realizó una selección con antibióticos por 2 semanas para quedarse solamente con las células que hayan incorporado el plásmido. Luego, las células son sembradas de manera muy diluida, con el fin de tener células únicas aisladas en la placa (Clon), que luego de ser amplificadas por 2 semanas dan origen a la línea celular B16F10(cav-1/sh AT2R) o B16F10(cav-1/sh ctrl).

El silenciamiento del AT2R en las células B16F10 solo fue exitoso mediante el tratamiento de selección clonal. La **Figura 18A** muestra la caracterización mediante un ensayo de WB de los clones B16F10(cav-1/sh AT2R) y solo de un clon B16F10(cav-1/sh ctrl). Aunque no se puede establecer diferencias estadísticas debido a que solo se trata de un único experimento, se puede observar que los clones B16F10(cav-1/sh AT2R) que disminuyen los niveles de AT2R, al menos de manera parcial, son los clones 2 y 5. Por esta razón elegimos estos dos clones para evaluar la

presencia de AT2R con un número suficiente de ensayos que permitan hacer comparaciones estadísticas entre ellos. La **Figura 18B** compara los niveles proteicos del AT2R de las células B16F10(cav-1/sh AT2R) (clones 2 y 5), con las células B16F10(cav-1) y B16F10(cav-1/sh ctrl) mediante tres ensayos independientes. Los resultados muestran que tanto las células B16F10(cav-1/sh ctrl) como las B16F10(cav-1/sh AT2R), disminuyeron los niveles proteicos de AT2R. Esto ocurrió probablemente por que el sh ctrl afectó la expresión de AT2R o bien como consecuencia del proceso de selección clonal. Sin embargo, gracias a este procedimiento se logró un silenciamiento parcial del AT2R en el caso del clon 5, el cual se utilizó para todos los ensayos posteriores. A pesar de lo anterior, el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas de expresión del AT2R entre el clon 5 y las células B16F10(cav-1/sh ctrl), sugiriendo que aun podrían ser un modelo útil para estudiar el efecto de AT2R sobre la migración.



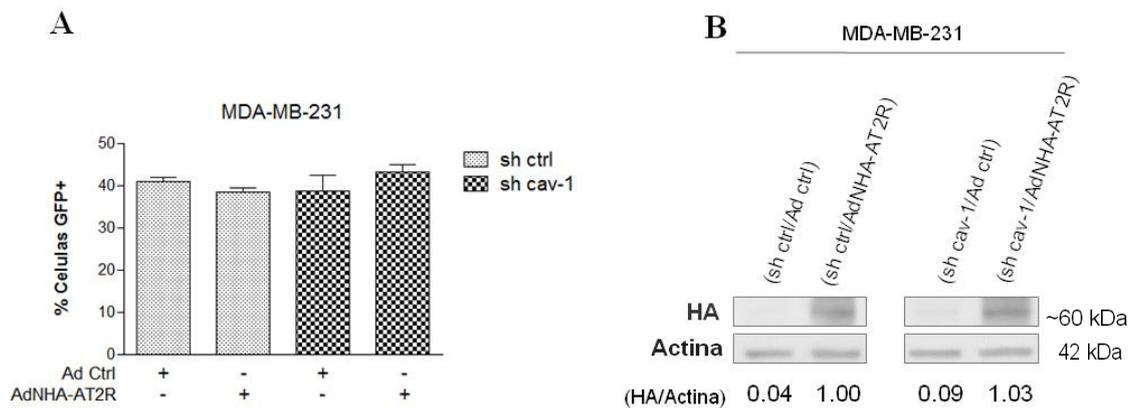
**Figura 18. Efecto del silenciamiento del AT2R sobre la migración de células B16F10(cav-1).** Para silenciar el AT2R en las células B16F10(cav-1) se sembraron  $5 \times 10^5$  células y luego se transfectaron con una mezcla de 5 vectores pLKO.1 que codifican para 5 shRNA distintos contra el mRNA del AT2R o con el vector vacío. Luego de una semana de selección con puromicina ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) se generaron clones de las células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R) y se evaluó la expresión del AT2R mediante WB. En la figura **A** se muestra un WB correspondiente a un único ensayo en donde se evaluó la expresión de AT2R en alguno de los clones obtenidos y de las células B16F10(cav-1). En la figura **B** se muestra un WB con la expresión de AT2R y Actina en células B16F10(cav-1) ( $0,96 \pm 0,16$ ), B16F10(cav-1/sh ctrl) ( $0,57 \pm 0,08$ ), B16F10(cav-1/sh AT2R) clon 2 (C2) ( $0,37 \pm 0,05$ ) y B16F10(cav-1/sh AT2R) clon 5 (C5) ( $0,17 \pm 0,02$ ). Los valores corresponden al promedio del análisis densitométrico de los niveles proteicos del AT2R respecto a actina y normalizados respecto a los niveles de B16F10(cav-1) (\* $p < 0,05$  vs control,  $n=3$ ). Para el ensayo de trans migración en Transwell, las células se preincubaron por 30 min con CGP42112 ( $1 \mu\text{M}$ ) o el vehículo (agua) y luego se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se sembraron 200.000 células en la cámara superior del Transwell en RPMI sin suero, mientras la cámara inferior contenía RPMI con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por 2 h, posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se eliminaron las células de la cámara superior del pocillo. Finalmente mediante un microscopio se fotografió el fondo del pocillo superior y se contabilizaron las células que lo atravesaron. En **C** se muestra una fotografía representativa tomada a un aumento de 40X del fondo de la cara exterior de la membrana del Transwell en la cual se aprecian las células que migraron luego de la pre-incubación con CGP42112 ( $1 \mu\text{M}$ ) y el vehículo. La figura **D** muestra un gráfico con el promedio de 3 experimentos

independientes del número de células B16F10(cav-1/sh AT2R) (clon5) y B16F10(cav-1/sh ctrl) que migraron luego de la pre-incubación con CGP42112 (1  $\mu$ M) o el vehiculo. Los datos se expresaron como unidades relativas (U.R.) La comparación estadística de todas las condiciones fue hecha con respecto a las células B16F10(cav-1/ sh ctrl) y sus diferencias están indicadas como \*\*\*( $p < 0,001$ ); \*\*( $p < 0,01$ ) y \*( $p < 0,05$ ).

La **Figura 18C** muestra las fotografías representativas del ensayo de migración en donde las células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R) se pre-incubaron por 30 min con CGP42112, mientras que en la **Figura 18D** se observa la cuantificación de dicho ensayo. Los resultados indican que solo aquellas células que aun conservan el receptor (B16F10(cav-1/sh ctrl)) disminuyeron su migración, mientras que aquellas que ya no lo expresaban B16F10(cav-1/sh AT2R) no disminuyeron su migración en respuesta al estímulo con CGP42112. Interesantemente, los resultados mostraron que en ausencia del estímulo, las células B16F10(cav-1/sh AT2R) migraron significativamente más que las B16F10(cav-1/sh ctrl), indicando que la ausencia del receptor incrementa el potencial migratorio de las células B16F10. Lo anterior sugiere que el receptor también se encuentra constitutivamente activo ya que al menos una porción de el estaría inhibiendo la migración celular en ausencia de estímulo. Sin embargo, debido a que este ensayo no incorporó la presencia de las células B16F10(cav-1), no podemos descartar que esta diferencia se deba mas bien a una disminución del potencial migratorio de las células B16F10(cav-1/sh ctrl).

El papel del AT2R en la migración se confirmó con las células MDA-MB-231(sh cav-1) y MDA-MB-231(sh ctrl) transducidas con un adenovirus que permite la sobreexpresión de un plasmido bicistrónico que codifica para GFP y NHA-AT2R

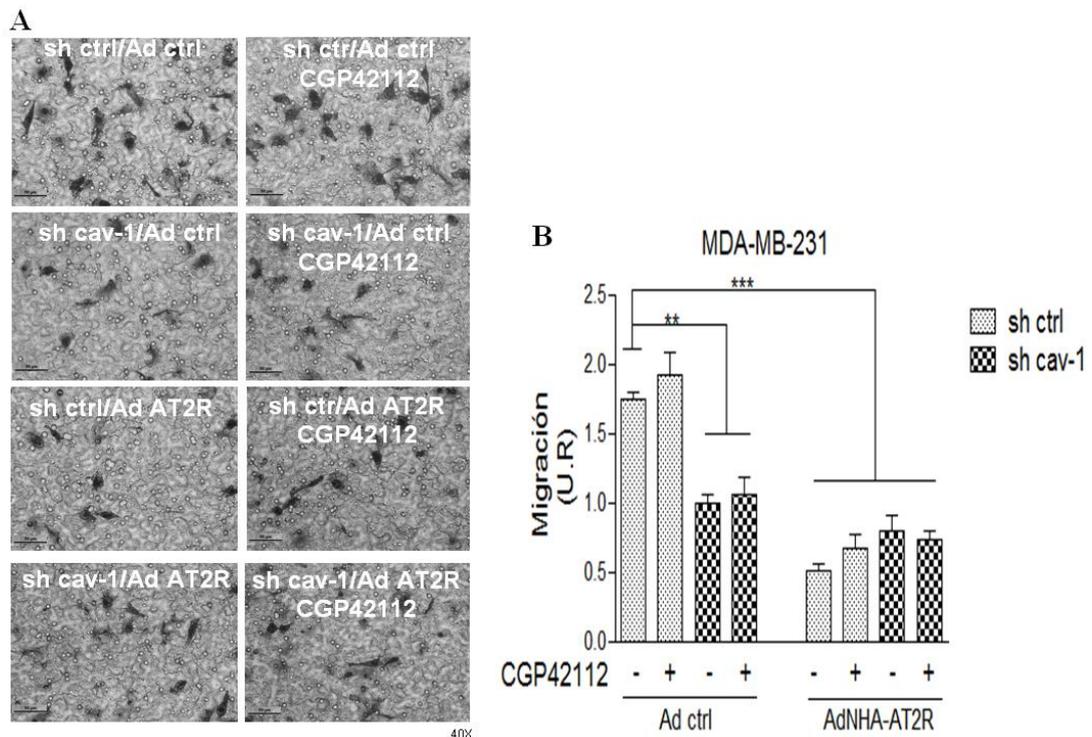
de rata, o bien, con un plasmido que solo codifica para GFP (Ad GFP), utilizado como condición control. La **Figura 19A** muestra el análisis del porcentaje de células GFP+ determinado por citometría de flujo, el cual fue de aproximadamente un 40% en las diferentes las condiciones. Para confirmar la presencia del receptor en las células transducidas con el AdNHA-AT2R se analizó la presencia de HA mediante un WB **Figura 19B**. El resultado indica que HA estaba expresado solo en las células infectadas con el AdNHA-AT2R, corroborando de esta manera la presencia del receptor. Sin embargo, no podemos establecer diferencias estadísticas debido a que no contamos con el número suficiente de ensayos para llevar a cabo dicho análisis.



**Figura 19. Transducción adenoviral del AT2R en las células MDA-MB-231.** Para sobreexpresar el AT2R en células MDA-MB-231 se llevó a cabo una transducción adenoviral que contiene un plasmido bicistrónico que co-expresa NHA-AT2R (AT2R con un epítipo HA en extremo N-terminal) y GFP como control transcripcional, dirigidos por el promotor CMV. Como control se utilizó el adenovirus Ad GFP que condujo a la expresión de la proteína GFP bajo el control del mismo promotor. Las células se sembraron en placas de cultivo, privadas de suero y transducidas con los adenovirus por 48 h a una multiplicidad de infección (MOI) de 500.000 para Ad AT2R y de 25.000 para Ad GFP. Panel **A** muestra el porcentaje de células GFP+ detectadas mediante citometría de flujo de 3 experimentos independientes. Panel **B** corresponde a la inmunodetección del epítipo HA en extractos proteicos totales de células transducidas, resuelto en SDS-PAGE al 8%

Los resultados del ensayo de migración con las células MDA-MB-231(sh cav-1) y MDA-MB-231(sh ctrl) transducidas muestran que la expresión del AT2R en

estas células disminuyó significativamente la migración de las células MB-231-(sh ctrl) (**Figura 20A y B**). Sin embargo, debemos considerar que los efectos provienen de un AT2R de rata, por lo que no podemos estar seguros de que ocurriría lo mismo con un AT2R de origen humano. A pesar de lo anterior, estos resultados sugieren que el AT2R también tiene una acción anti-migratoria en las células MDA-MB-231 de manera dependiente de CAV1 ya que el efecto solo se detectó en células que expresan esta proteína, tal como ocurrió en los ensayos de migración con las células B16F10. Interesantemente, en este caso no fue necesario el estímulo con el agonista CGP42112 para disminuir la migración, lo cual nuevamente plantea la posibilidad de que AT2R se encuentre constitutivamente activo.



**Figura 20. Efecto de la sobreexpresión del AT2R en la migración de células MDA-MB-231.** Para el ensayo de trans migración en Transwell, las células transducidas se incubaron por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M) o con el vehículo y luego fueron tripsinizadas y contadas. Posteriormente se sembraron 150.000 células en la cámara superior del Transwell en medio de cultivo sin suero, mientras la cámara inferior contenía medio de cultivo con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 h, posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se eliminaron las

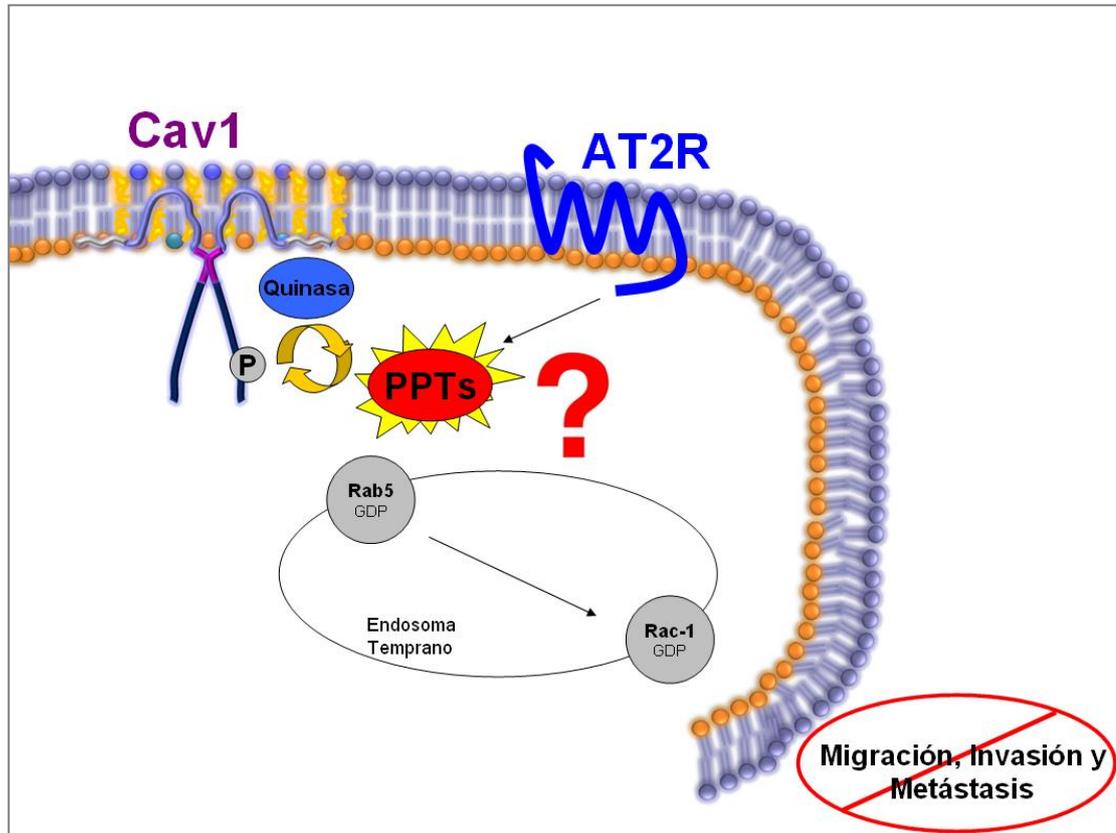
células de la cámara superior del pocillo. Finalmente mediante un microscopio se fotografió la cara externa de la membrana de Transwell y se contabilizaron las células que lo atravesaron. Panel **A**. Fotografía representativa tomada a un aumento de 40X la cara externa de la membrana de Transwell en la cual se aprecian las células que migraron luego de la pre-incubación con CGP42112 (1 $\mu$ M) y aquellas que se incubaron con el vehículo. Panel **B**. Gráfico con el promedio del número de células MDA-MB-231(sh cav-1) y MDA-MB-231(sh ctrl) transducidas que migraron de 3 experimentos independientes. Los datos se expresaron como unidades relativas (U.R.). La comparación estadística de todas las condiciones fue hecha con respecto a las células MDA-MB-231(sh ctrl) y sus diferencias están indicadas como \*\*\*( $p < 0,001$ ); \*\*( $p < 0,01$ ) y \*( $p < 0,05$ ).

### **La activación del AT2R inhibe la vía CAV1/Rab5/Rac-1 mediante la desfosforilación de CAV1 en Y14.**

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el AT2R tiene un efecto inhibitorio sobre la migración de células que expresan CAV1. Sin embargo, se desconoce aún si este receptor ejerce su efecto anti-migratorio, inhibiendo la vía CAV1/Rab5/Rac-1 o mediante una vía alternativa que involucre a CAV1. Para resolver esta incógnita se evaluó el efecto del AT2R sobre los principales componentes de la vía, comenzando por CAV1.

Nuestros estudios previos mostraron que la fosforilación de CAV1 en tirosina-14 (Y14) es uno de los pasos claves para que CAV1 promueva la migración de las células B16-F10(cav-1) a través de la vía CAV1/Rab5/Rac-1( Urra y col., 2012; Díaz y col., 2014; Ortiz y col., 2016). Sumado a lo anterior, algunos artículos han mostrado que el AT1R, el receptor antagónico del AT2R, promueve la transición epitelio-mesénquima en células de epiteliales promoviendo un aumento en los niveles de (Y14)p-CAV1 mediante la activación de c-Src kinasas, que son en última

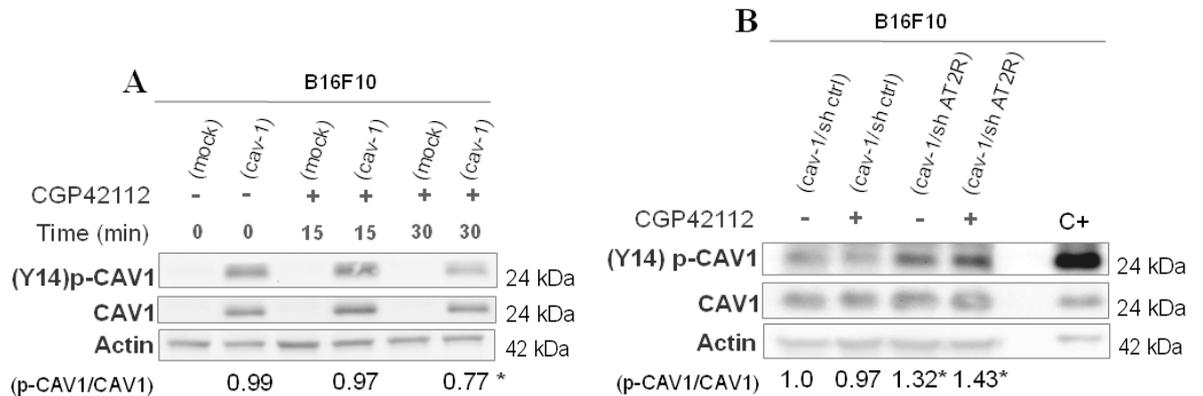
instancia las responsables de fosforilar CAV1 en Y14 (Chen y col., 2012). Considerando que el AT2R revierte los efectos del AT1R, activando fosfatasas que desfosforilan los blancos de AT1R, era probable que AT2R pueda inhibir la migración activando alguna fosfatasa que desactive la vía CAV1/Rab5/Rac-1 mediante la desfosforilación de CAV1 (**Figura 21**).



**Figura 21. Modelo hipotético del mecanismo de inhibición que AT2R podría ejercer sobre la vía CAV/Rab5/Rac-1.** AT2R es una proteína que promueve la desfosforilación de diversas proteínas mediante la activación de fosfatasas. Considerando que la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 depende de la fosforilación de CAV1, es probable que la inhibición ejercida por AT2R sobre la vía se mediante la desfosforilación de CAV1.

Para probar esta hipótesis se evaluaron los niveles de (Y14)p-CAV1 en células B16F10(cav-1) y B16F10(mock) preincubadas por 15 y 30 min con CGP42112. La **Figura 22A** muestra un WB representativo de 3 experimentos, en el cual se observa una disminución significativa en los niveles de (Y14)p-CAV1 de las

células B16F10(cav-1) preincubadas con el ligando por 30 min, indicando que la activación del AT2R efectivamente promueve la desfosforilación de (Y14)p-CAV1. Sin embargo, el efecto observado es sobre toda la CAV1 celular y no necesariamente sobre una sub-población de la proteína que está promoviendo la migración (Ortiz y col., 2016).



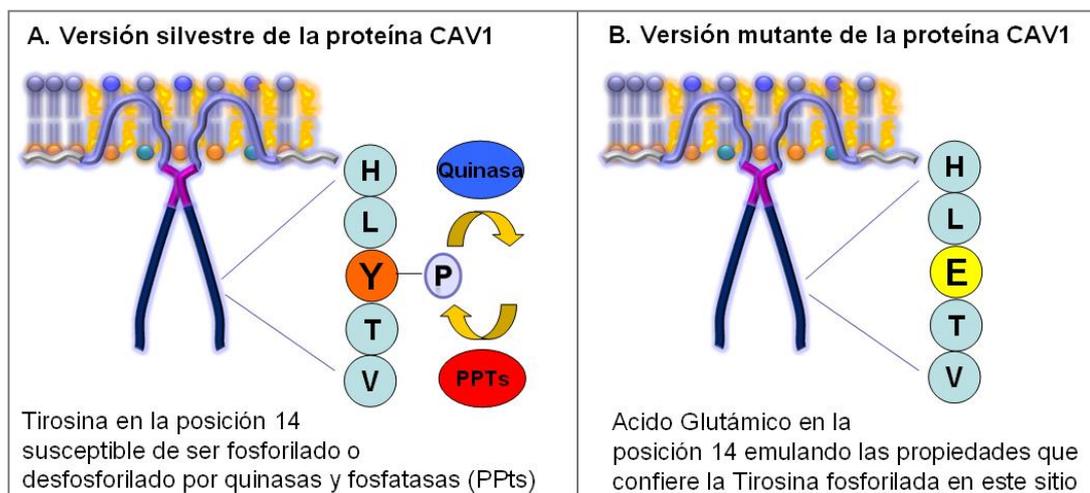
**Figura 22. Efecto de la activación del AT2R sobre los niveles de (Y14) p-CAV1 de células B16F10 que expresan y no expresan este receptor.** Los niveles de fosforilación de CAV1 en Y14 ((Y14) p-CAV1) se evaluaron luego de la pre-incubación con CGP42112 (1 $\mu$ M) o el vehículo. Los extractos proteicos de las células se separaron por SDS-PAGE al 10% y se analizaron mediante WB con el anticuerpo anti-p-CAV1, anti-CAV1 y anti-actina. **Panel A.** WB representativo de 3 experimentos independientes, donde se analizaron los niveles de (Y14)p-CAV1 de B16F10(cav-1) luego de la pre-incubación con CGP42112 (1 $\mu$ M) por 0 (0,99 $\pm$ 0,09), 15 (0,97 $\pm$ 0,06) y 30 (0,77 $\pm$ 0,03) min. Los valores corresponden al promedio del análisis densitométrico de los niveles proteicos de (Y14) p-CAV1 respecto de CAV1 total y normalizados respecto a los niveles de B16F10(cav-1) a tiempo 0. Las diferencias estadísticas de las diferentes condiciones respecto a las células B16F10(cav-1) a tiempo 0 se indican como \* $p$ <0,05. **Panel B.** WB con los niveles de (Y14)p-CAV1 de células B16F10(cav-1/sh ctrl) sin (1,00 $\pm$ 0,07) y con estímulo (0,97 $\pm$ 0,06) y de las células B16F10(cav-1/sh AT2R) sin (1,32 $\pm$ 0,04) y con estímulo (1,43 $\pm$ 0,10). Los valores corresponden al promedio del análisis densitométrico de 3 experimentos independientes de los niveles proteicos (Y14) p-CAV1 respecto de CAV1 y normalizados respecto a los niveles de B16F10(cav-1/sh ctrl) sin estímulo. La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1/sh ctrl) sin estímulo y sus diferencias se indican como \* $p$ <0,05. Como control positivo (C+) de CAV1 fosforilada se utilizó células B16F10(cav-1) tratadas con 5 mM de peróxido de hidrógeno por 20 min.

Para corroborar que el AT2R es responsable de disminuir los niveles de (Y14)p-CAV1 se analizó el efecto de CGP42112 sobre la fosforilación en células

B16F10(cav-1) carentes del receptor (B16F10(cav-1/sh AT2R)). La **Figura 22B** corresponde a un ensayo de WB que muestra los niveles de (Y14)p-CAV1 en células B16F10(cav-1/sh AT2R) y B16F10(cav-1/sh ctrl), preincubadas o no por 30 min con CGP42112. El resultado muestra que la ausencia del receptor impide que CGP42112 disminuya los niveles de fosforilación de CAV1 ya que al estimular las células B16F10(cav-1/sh AT2R) no cambiaron sus niveles de fosforilación de Y14-CAV1. Estos datos sugieren que efectivamente CGP42112 induce desfosforilación de CAV1 mediante el AT2R. Sin embargo, CGP42112 no disminuyó la fosforilación de CAV1 en células B16F10(cav-1/sh ctrl) como lo hizo con las células B16F10(cav-1) (**Figura 22A**). Estos resultados sugieren que la disminución en la expresión de AT2R que también sufrieron las células B16F10(cav-1/sh ctrl) (**Figura 18B**) después del silenciamiento del receptor pudo haber mermado el efecto que CGP42112 tiene sobre la fosforilación de CAV1. Interesantemente, al comparar los niveles de fosforilación de las células B16F10(cav-1/sh ctrl) en ausencia de estímulo con las células B16F10(cav-1/sh AT2R) se observa que la ausencia del receptor generó un aumento de (Y14) p-CAV1 independiente de la acción de CGP42112. Este resultado, a similitud de los obtenidos en los ensayos de migración anteriores (Ver **Figuras 18D y 20B**) sugieren que el AT2R o, al menos una parte de él, se encuentra constitutivamente activo. Sin embargo, es importante considerar que debido a que las células B16F10(cav-1/sh ctrl) no responden al estímulo con CGP42112 como lo hicieron las células B16F10 en la **Figura 20A**, no son adecuadas para evaluar los cambios en los niveles de fosforilación que provoca la ausencia del AT2R.

Aunque estos resultados confirman que la activación de AT2R disminuye la fosforilación de CAV1 en Y14, aún no se puede aseverar que este efecto es

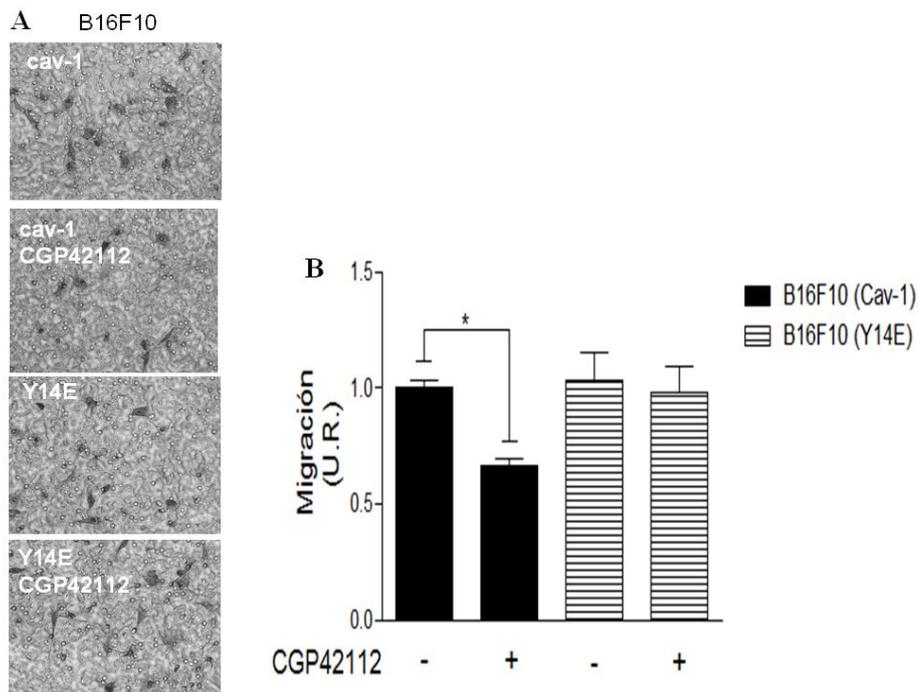
responsable de la inhibición de la migración observada cuando se activó el receptor con el agonista CGP42112. Para confirmar que el AT2R efectivamente inhibe la migración de B16F10 mediante la desfosforilación de CAV1 en Y14, se realizaron ensayos de migración con la mutante fosfomimética de B16F10(Cav-1/Y14E). Esta mutante tiene la particularidad de que el residuo Y14 de CAV1 se reemplazó por ácido glutámico (E), aminoácido que simula la presencia de un fosfato en ese sitio. Esto le confiere a la célula, las mismas propiedades que tendría si CAV1 estuviera fosforilada en Y14, es decir, aumenta su capacidad migratoria, invasiva y metastásica, pero sin que estas propiedades sean susceptibles a sufrir algún cambio mediante desfosforilaciones (**Figura 23**).



**Figura 23. Mutación de la secuencia de CAV1 en Y14. Panel A.** Esquema de la parte de la secuencia aminoacídica de la versión silvestre de la proteína CAV1 en donde se muestra tirosina (Y) en la posición 14 fosforilada (P). Las propiedades que confiere la fosforilación de Y14 son modificadas por la actividad de quinasas y fosfatasas (PPTs). **Panel B.** Versión mutada en donde la tirosina (Y) en la posición 14 se cambió por ácido glutámico (E), generando una proteína fosfomimética que tiene propiedades similares a las que tiene CAV1 en migración, invasión y metástasis, pero sin ser susceptible de ser inhibidas por PPTs.

La **Figura 24** corresponde a un ensayo de trans migración en cámara Boyden (Transwell) en que las células B16F10(cav-1) y B16F10(cav-1/Y14E) se

preincubaron por 30 min con CGP42112 utilizando como control las células sin tratamiento. El resultado muestra que CGP42112 no disminuyó la migración de las células B16F10(cav-1/Y14E) como lo hace con las células B16F10(cav-1). Este resultado corrobora que la activación del AT2R inhibe la migración de B16F10 mediante la desfosforilación de CAV1 en Y14.



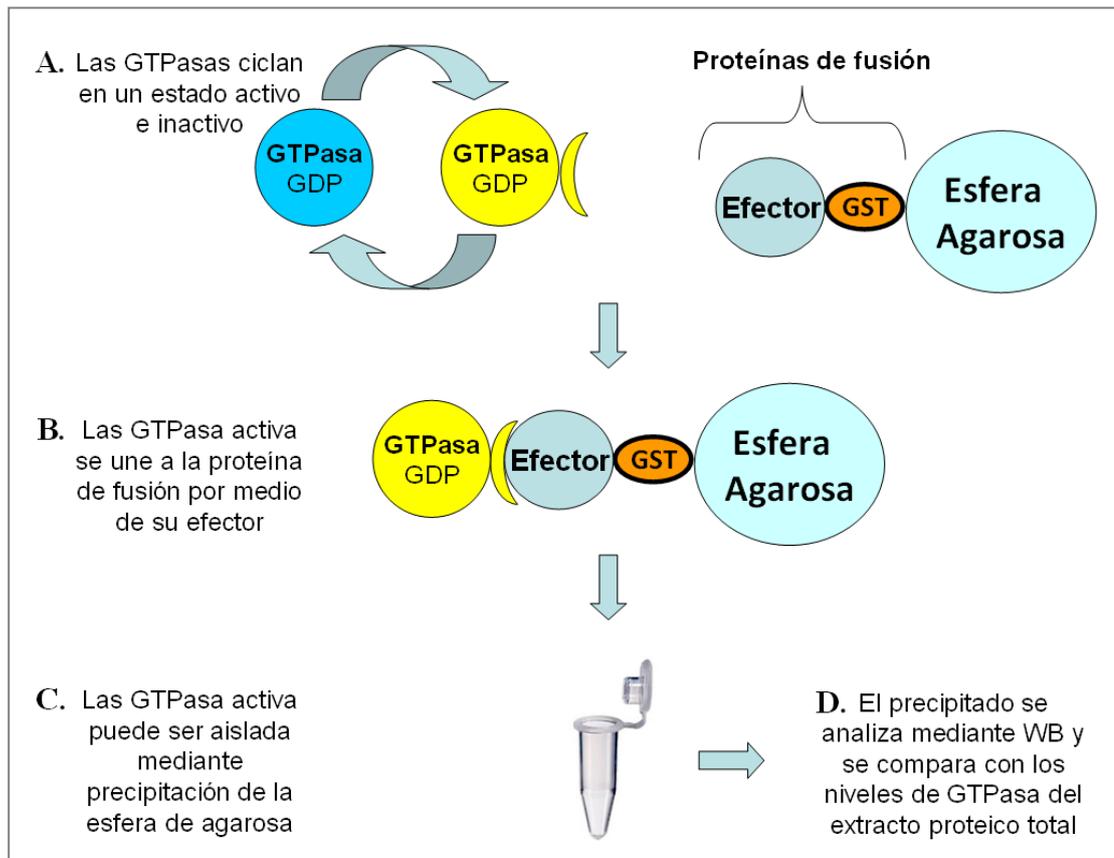
**Figura 24. Migración de la mutante fosfomimética B16F10(cav-1/Y14E) preincubadas con el agonista del AT2R.** Las células B16F10(cav-1) y B16F10(cav-1/Y14E) se preincubaron 30 min con CGP42112 (1 $\mu$ M) o con el vehiculo (agua) luego se tripsinizaron y contaron. Posteriormente se sembraron 200.000 células en la cámara superior del Transwell en RPMI sin suero, mientras la cámara inferior contenía RPMI con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 h, posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se eliminaron las células de la cámara superior del pocillo (células que no migraron). Finalmente mediante un microscopio se fotografió el fondo del pocillo superior y se contabilizaron las células que lo atravesaron. **Panel A.** Fotografía 40X representativa del ensayo transmigración en Transwell del fondo de la cara externa de la membrana del Transwell en la cual se muestran las células que migraron luego del estímulo. **Panel B.** Gráfico con la cuantificación del promedio del número de células que migraron en 3 experimentos independientes expresados

como unidades relativas (U.R.) respecto al control B16F10(cav-1). La comparación estadística de todas las condiciones fue hecha con respecto a las células B16F10(cav-1) en ausencia de estímulo y esta diferencia está indicada como \*( $p < 0,05$ ).

### **La activación del AT2R inhibe Rab5 y Rac-1.**

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la disminución en la migración dependiente de la activación del AT2R se debe a que este receptor promueve la desfosforilación de CAV1. Aunque estos resultados sugieren fuertemente que el AT2R estaría inhibiendo la migración disminuyendo la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1, no descarta otras vías alternativas en las que la desfosforilación de CAV1 también podría afectar negativamente la migración.

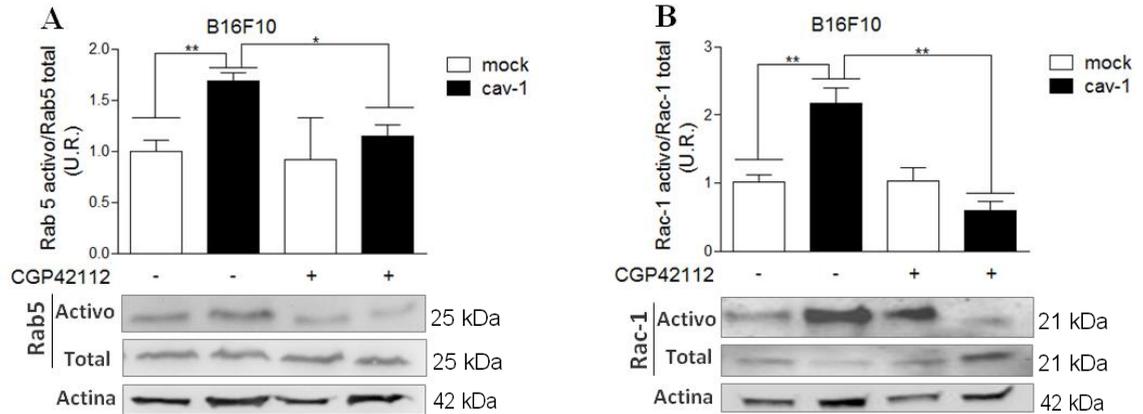
Para resolver esta incógnita, se evaluó si el AT2R tenía un efecto sobre los principales componentes de la vía río abajo de CAV1 tales como Rab5 y Rac-1. Para ello se determinaron los niveles de activación de Rab5 y Rac-1 mediante ensayos pull down. Este ensayo estima los niveles de las proteínas activadas respecto del total, utilizando una proteína de fusión GST-R5BD (R5BD, dominio de unión a Rab5, de la proteína Rabaptina-5) o GST-PBD (PBD, dominio de unión a Rac-1, de la proteína p21), las cuales solo se pueden unir a Rab5 o Rac-1 en su conformación activa, es decir, cuando se encuentran unidas a GTP. En este ensayo, las células se pre-incubaron con el agonista y luego se extrajeron proteínas. El extracto total de proteínas se incubó con las proteínas de fusión para unir a la proteína activa, la cual se recuperó después de sucesivas centrifugaciones. Los niveles de Rab5 y Rac-1 activos se evaluaron mediante WB (**Figura 25**).



**Figura 25. Esquema del ensayo de pull down.** **Panel A.** Las GTPasas se encuentran en un constante ciclo de activación y desactivación que depende de su unión a GDP o GTP. **Panel B.** La conformación activa de la proteína se une a su efector. La proteína de fusión utilizada en este ensayo estaba conformada por el sitio de unión del efecto a la GTPasa y GST, el cual permite la unión a la esfera de agarosa. **Panel C.** La GTPasa activa se aísla, precipitando las esferas de agarosa por medio de centrifugaciones. **D.** Finalmente el precipitado permite evaluar los niveles activos de GTPasa y compararlos con los niveles totales de GTPasa que se obtuvo desde el extracto proteico total de la célula.

La **Figura 26A** muestra un WB representativo de 3 ensayos de pull down para evaluar los niveles activos de Rab 5 luego de estimular con CGP42112. Cuando las células se incubaron por 30 min con CGP42112 se observó una disminución considerable de los niveles de Rab5 activa solo en las células B16F10(cav-1). Por su parte la **Figura 26B** muestra un WB de un ensayo de pull down, en donde se

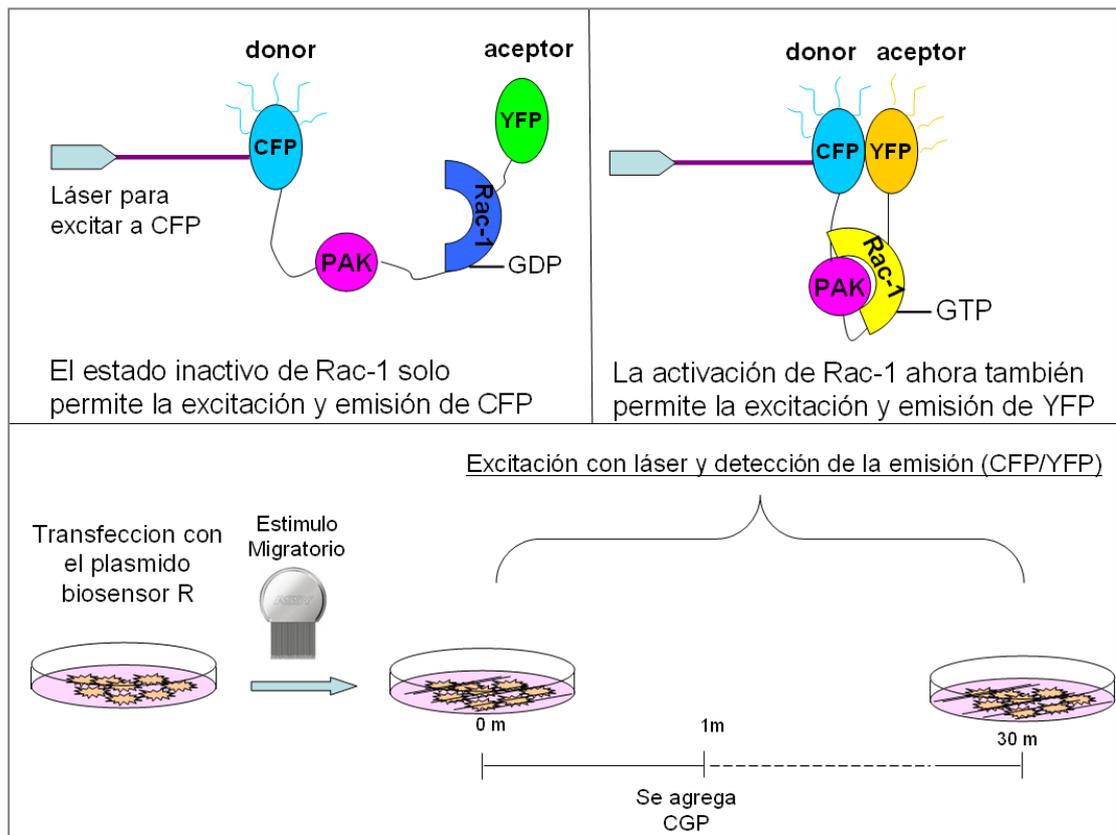
evaluaron los niveles activos de Rac-1. Al igual que en el pull down de Rab5, la preincubación de las células por 30 min con CGP42112 también disminuyó los niveles activos de Rac-1 en las células B16F10(cav-1).



**Figura 26. Efecto del agonista del AT2R en los niveles de Rab 5 y Rac-1 activos de células B16F10.** Los niveles de Rab 5 y Rac-1 activos se evaluaron mediante el ensayo de pull down. Para ello, las células se pre-incubaron con CGP42112 (1  $\mu$ M) por 30. Luego se obtuvieron los extractos celulares y se incubaron con la proteína de fusión PBD-GST para el caso de Rac-1 y R5BD-GST para Rab 5. La presencia de Rab 5 y Rac-1 se detectó por Western blot. **Panel A** muestra un WB de los niveles de Rab 5 activo y Rab 5 total. El gráfico muestra el promedio del análisis densitométrico de los niveles Rab 5 activo respecto del Rab 5 total. Los datos se expresaron como unidades relativas (U.R.) respecto al control B16F10(cav-1). **Panel B** muestra un WB de los niveles de Rac-1 activo y Rac-1 total. El gráfico muestra el promedio del análisis densitométrico de los niveles Rac-1 activo respecto del Rac-1 total. Los datos se expresaron como unidades relativas (U.R.) respecto al control B16F10(cav-1). La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1) sin estímulo y sus diferencias están indicadas como \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$ .

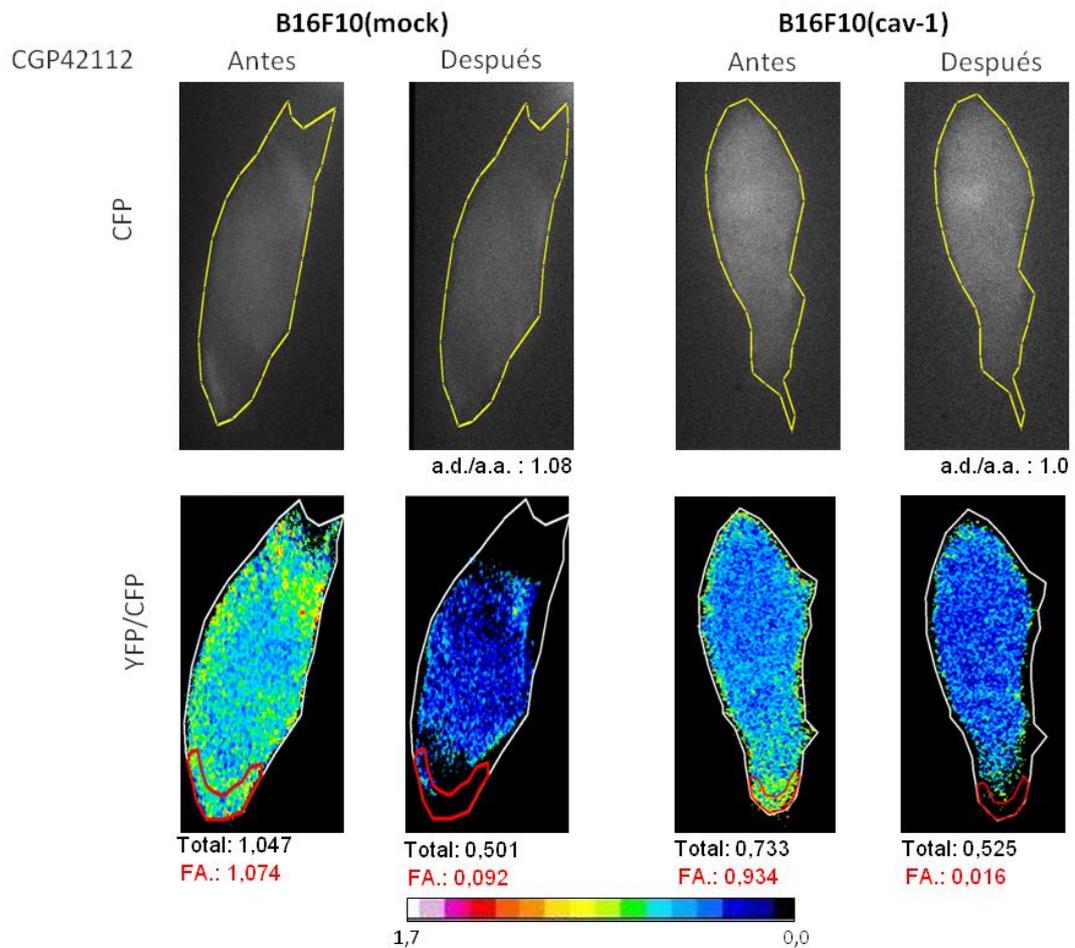
Estos resultados confirman que AT2R disminuye la actividad de las GTPasas río abajo de CAV1, indicando que el AT2R efectivamente disminuye la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Sin embargo, aún no sabemos si el AT2R está actuando sobre todo el Rac-1 presente en la célula o solo sobre la fracción de Rac-1 responsable de promover migración. Para responder esta pregunta se evaluó si la disminución en los niveles de Rac-1 en toda la célula o solo de manera local en los

sitios que promueve migración, como es el frente de avance (FA.). Para este fin se realizó el ensayo de *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), el cual consiste en transfectar las células con un plásmido que codifica para una proteína de fusión que está compuesta por Rac-1 y el dominio de unión a su efector PAK, ambos acoplados a los fluoróforos GFP e YFP. El láser solo permite la excitación de CFP el cual emite en el rango de excitación del segundo fluoróforo, YFP. Cuando algún estímulo migratorio promueve la activación de Rac-1, ésta se une a su efector permitiendo la cercanía de ambos fluoróforos. Esta cercanía permite que CFP excite a YFP, el cual emite a una longitud característica que puede ser medida mediante microscopía. Finalmente la razón de emisión de ambos fluoróforos (YFP/CFP) es representada mediante mapas de calor que revelan en células vivas y en tiempo real, los sitios en donde Rac-1 se encuentra activo y en los cuales disminuyó su actividad por efecto del AT2R (**Figura 27**).



**Figura 27. Ensayo de FRET.** El plásmido biosensor Raichu-Rac1 permite la expresión de una proteína de fusión que está compuesta por Rac-1y el dominio de unión a su efector PAK, ambos acoplados a fluoróforos CFP y YFP. En **A** se muestra un esquema de lo que sucede cuando la proteína de fusión es excitada con el láser del microscopio en condiciones en que Rac-1 se encuentra inactivo (unido a GDP). En estas condiciones proteína CFP se excita y emite en una longitud de onda que podría excitar a YFP. Sin, embargo no logra excitar a YFP por la lejanía entre ambas moléculas. En **B** se muestra lo que sucede cuando el láser del microscopio excita a CFP en condiciones en que Rac-1 se encuentra en su estado activo (unido a GTP). En este caso, la emisión de la proteína CFP logra excitar a YFP dada la cercanía de ambas moléculas. Esto sucede porque la activación de Rac-1 y la consecuente unión con su efector (PAK) promueve la cercanía de ambos fluoróforos. En **C** se muestran el procedimiento experimental. Las células se transfectaron con el plásmido biosensor Raichu-Rac1. Luego de 24 h se estimuló la migración realizando múltiples heridas en la monocapa con un peine metálico en presencia de medio con suero. Luego se midió la fluorescencia por 30 min utilizando un microscopio Leica Macro zoom. Transcurrido un minuto de medición se agregó CGP42112 (1  $\mu$ M) con el fin de evaluar en que sitios de la célula CGP42112 disminuyó la activación de Rac-1.

La **Figura 28** muestra una fotografía de una célula migrando, 30 seg antes y 30 min después de agregar CGP42112, correspondiente a un único experimento. En los paneles superiores se muestra la fluorescencia de la célula antes y después del estímulo, en la longitud de onda correspondiente a la emisión de CFP. Debido a que este fluoróforo emite siempre e independiente de la activación o desactivación de Rac-1 se puede evaluar cómo cambia la morfología de la célula antes y después del estímulo midiendo su emisión. Los resultados muestran que las células B16F10(mock) cambian ligeramente su morfología aumentando su área en un 8%, mientras que las células B16F10(cav-1) no experimentan cambios. En el panel inferior se muestra un mapa de calor que indica la intensidad del FRET, en donde los colores calidos indican mayores valores de la relación YFP/CFP, que significa mayor actividad de Rac-1. Aunque no se cuenta con un número suficiente de experimentos para hacer una validación estadística, se observan cambios muy evidentes después del estímulo, sobre todo en el FA. Los resultados muestran que las células B16F10(mock) disminuyeron la actividad de Rac-1 tanto en el total como en el FA en un 52 y 91%, respectivamente, mientras que las células B16F10(cav-1) disminuyeron un 29% en el total y un 98% en el FA. Estos resultados sugieren que el efecto del AT2R sobre Rac-1 es principalmente sobre la porción de Rac-1 que se encuentra en el FA, aunque también lo hace sobre el total pero en menor medida.

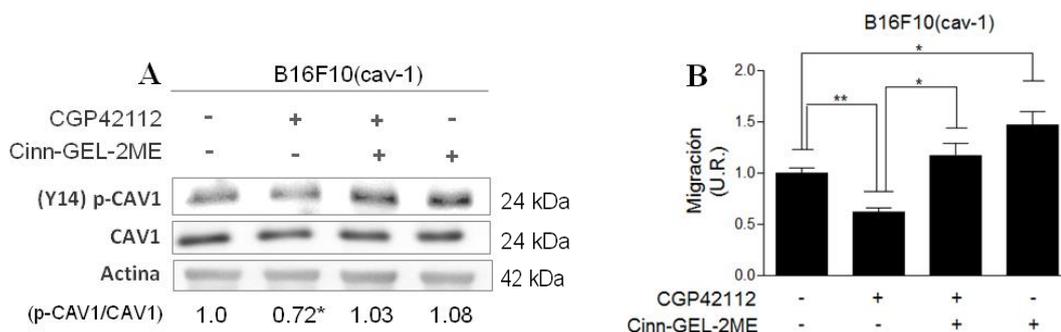


**Figura 28. Localización del efecto del agonista del AT2R sobre los niveles de Rac-1 activos en células B16F10 mediante FRET.** La figura muestra el ensayo de FRET de un único experimento de una célula B16F10(cav-1) y B16F10(mock) 30 seg antes y 30 min después de ser estimuladas con CGP42112. Para el ensayo de *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), las células B16F10(cav-1) y B16F10(mock) se transfectaron con el plasmido biosensor Raichu-Rac1. Luego se midió la intensidad de fluorescencia que emiten las moléculas CFP e YFP, (480 y 535 nm, respectivamente) mediante microscopía. La medición se realizó durante 1 min antes y 30 min después de agregar CGP42112 (1  $\mu$ M), mientras la célula migraba. El panel superior muestra una fotografía de la morfología de la célula, dada por la emisión de CFP. Los valores numéricos corresponden a la razón del área de la célula después (a.d.) y antes (a.a.) del estímulo. En el panel inferior se muestra el mapa de calor del análisis hecho del ensayo de FRET. Los valores numéricos corresponden a la medición de la intensidad del FRET del total de la célula y del Frente de Avance (FA).

**La inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 promovida por activación del AT2R se debe al aumento en la actividad del PTP1B.**

Los resultados sugieren que el AT2R tiene efectos inhibitorios sobre la vía transduccional CAV1/Rab5/Rac-1, disminuyendo los niveles de (Y14)p-CAV1. Sin embargo, aún se desconocía el mecanismo por el cual el AT2R promovía desfosforilación de CAV1. Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de acción del AT2R involucran principalmente la activación de fosfatasa (George y cols., 2010). Una de las fosfatasas relacionada con la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 es la PTP1B. Estudios de nuestro Laboratorio (no publicados) y otros grupos de investigación han evidenciado que esta proteína forma parte de complejos multiproteicos con CAV1 (Lee y col., 2006; Shin y col., 2006).

Para evaluar si esta fosfatasa podría participar en la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 que promueve AT2R, se determinaron, en primer lugar, los niveles de (Y14)p-CAV1 de células B16-F10(Cav-1) incubadas con CGP42112 y un inhibidor farmacológico de PTP1B (Cinn-GEL-2ME). La **Figura 29A** muestra la cuantificación de los niveles de (Y14)p-CAV1 en las células B16F10(Cav-1) bajo las condiciones antes mencionadas. Los resultados muestran que Cinn-GEL-2ME revirtió los efectos del AT2R, aumentando los niveles de (Y14)p-CAV1 que disminuyó CGP42112.

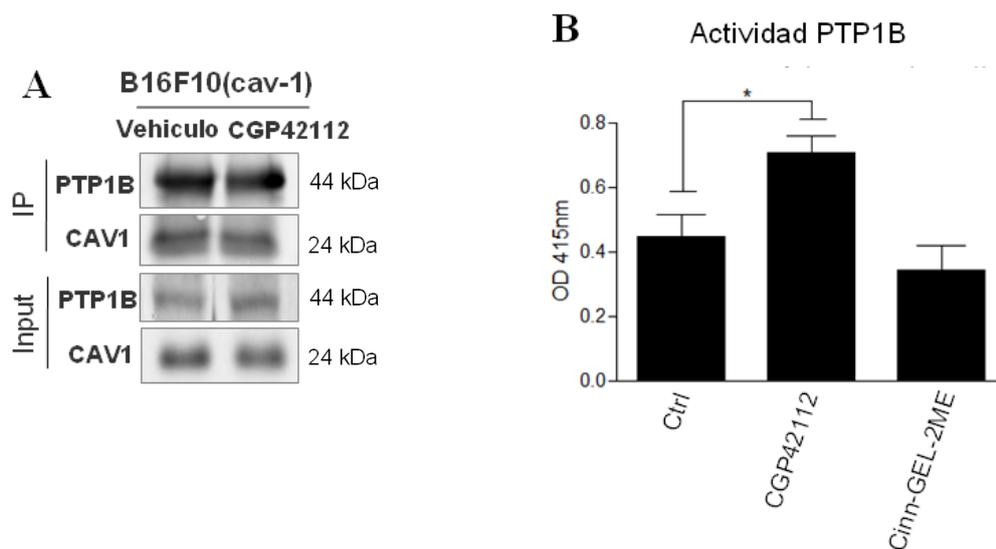


**Figura 29. Efecto de PTP1B sobre los niveles de (Y14) p-CAV1 y la migración de células B16F10(cav-1).** Para evaluar el efecto de PTP1B sobre los niveles de (Y14) p-CAV1 se preincubaron las células por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M) o 1 h con el inhibidor de PTP1B, Cin-GEL-2ME (20  $\mu$ M). Los extractos proteicos de las células se separaron por SDS-PAGE al 10% y se analizaron mediante WB usando los anticuerpos anti-p-CAV1, anti-CAV1 y anti-actina. El panel A muestra un WB representativo de cuatro experimentos independientes donde se analizaron los niveles de (Y14) p-CAV1 de B16F10(cav-1) luego de la pre-incubación con el vehículo (1,00 $\pm$ 0,05), CGP42112 (1  $\mu$ M) (0,72 $\pm$ 0,07), CGP42112 + Cin-GEL-2ME (1,03 $\pm$ 0,16) y Cin-GEL-2ME (1,08 $\pm$ 0,20) min. Los valores corresponden al promedio de 4 experimentos independientes de los niveles proteicos de (Y14) p-CAV1 respecto de CAV1 total y normalizados respecto a los niveles de B16-F10(Cav-1) con el vehículo. La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1) en ausencia de estímulo y sus diferencias están indicadas como \*\*p<0,01 y \*p<0,05. Para evaluar el efecto de PTP1B sobre la migración se preincubaron las células por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M) o 1 h con Cin-GEL-2ME (20  $\mu$ M) y luego fueron tripsinizadas y contadas. Se sembraron 200.000 células en la cámara superior del Transwell en RPMI sin suero, mientras en la cámara inferior se agregó RPMI con suero fetal bovino al 10% como estímulo migratorio. Se incubaron las células a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 h y posteriormente se fijaron con cristal violeta durante una noche y se eliminaron las células de la cámara superior del pocillo. Finalmente mediante un microscopio se fotografió la cara exterior de la membrana del Transwell y se contabilizaron las células que lo atravesaron. El panel B muestra en un gráfico del promedio del número de células B16F10(cav-1) que migraron luego del estímulo con CGP42112 y Cin-GEL-2ME de 3 experimentos independientes. Los datos se expresaron como unidades relativas (U.R.). La comparación estadística de todas las condiciones fue hecha entre las células B16F10(cav-1); sin estimular vs CGP42112; CGP42112 vs CGP42112 + Cin-GEL-2ME y sin estimular vs Cin-GEL-2ME. Sus diferencias están indicadas como \*\*p<0,01 y \*p<0,05.

Estos datos sugieren que PTP1B podría ser el blanco de acción del AT2R, por el cual disminuye la actividad de la CAV1/Rab5/Rac-1 y en consecuencia también la

migración celular. Para probar esta hipótesis, se evaluó el potencial migratorio de células B16F10(cav-1) incubadas con CGP42112 y Cinn-GEL-2ME. La **Figura 29B** muestra la cuantificación del ensayo de migración en células B16F10(cav-1) bajo las condiciones ya mencionadas. Los resultados indicaron que Cinn-GEL-2ME al igual que como ocurrió con la fosforilación de CAV1, revirtió los efectos de CGP42112 en la migración celular. Estos resultados sugieren que el AT2R podría ejercer su efecto anti-migratorio por medio de la activación de la PTP1B.

Finalmente para corroborar que el AT2R efectivamente aumenta la actividad de la vía se midió la actividad de PTP1B luego de estimular el AT2R. Para ello la PTP1B se inmunoprecipitó en células B16F10(cav-1) expuestas a diferentes estímulos; CGP42112, Cinn-GEL-2ME, o el vehículo. El inmunoprecipitado se utilizó para medir la actividad fosfatasa usando como sustrato p-nitrofenil fosfato, el cual adquiere una coloración amarilla cuando es desfosforilado. La reacción enzimática se realizó a 37°C, midiendo con un espectrofotómetro (415 nm) a diferentes tiempos de incubación (1-48 h). La **Figura 30A** muestra el resultado de la inmunoprecipitación de PTP1B, la cual se inmunoprecipitó esta fosfatasa con CAV1 de manera independiente de la acción del AT2R ya que CGP42112 no generó ningún cambio en la formación del complejo. La **Figura 30B** muestra que la actividad de PTP1B inmunoprecipitada desde células B16F10(cav-1) pre-tratadas con CGP42112, Cin-GEL-2ME o el vehículo. El resultado muestra que la pre-incubación de las células B16F10-(cav-1) con CGP42112 aumentó la actividad de PTP1B comparado con las otras condiciones mencionadas, indicando que el AT2R aumenta la actividad de PTP1B en las células B16F10.



**Figura 30. Efecto del agonista del AT2R en la actividad enzimática de PTP1B.**

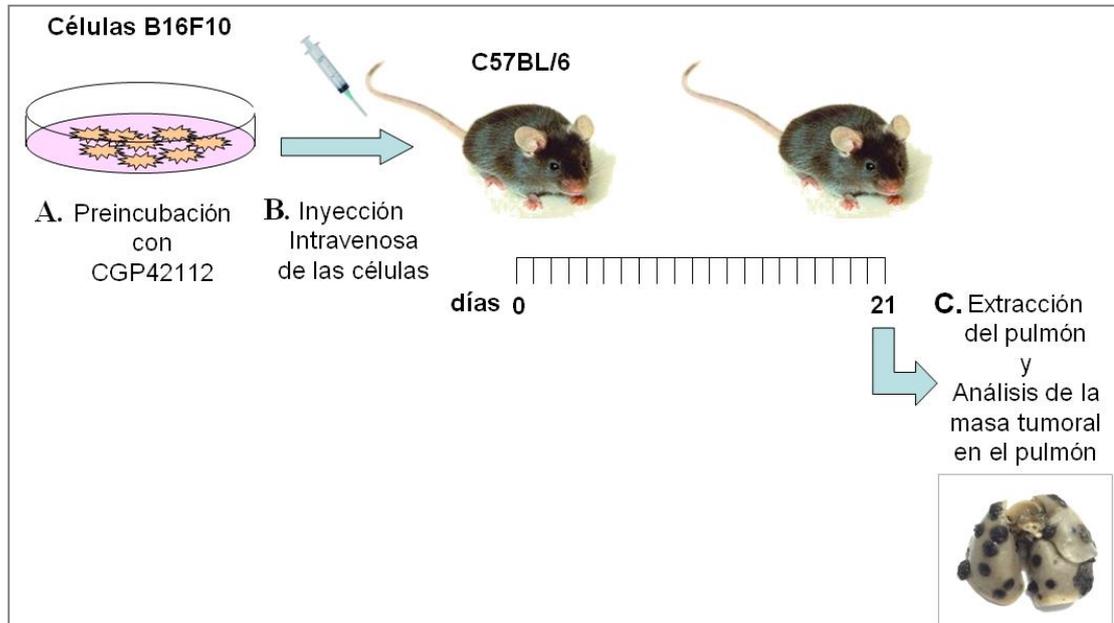
Para medir la actividad de la PTP1B primero se inmunoprecipitó la enzima. Para ello las células B16F10(cav-1) se trataron con el vehículo, CGP42112 o el inhibidor de PTP1B, Cinn-GEL-2ME (20  $\mu$ M). Luego de 30 min de incubación el extracto proteico (1,5 mg) se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal para PTP1B (2.5  $\mu$ g por condición). El inmunoprecipitado (IP) y el extracto proteico total (Input) se separaron mediante SDS-PAGE y se detectó por inmunoblot la presencia de proteínas con el anticuerpo anti-PTP1B y anti-CAV1. En **A** se muestra un WB de un único experimento del inmunoprecipitado (IP) y del extracto proteico original (Input) en donde se detectó la presencia de PTP1B y CAV1. Para medir la actividad luego de pre-incubar las células con CGP42112 por 30 min se inmunoprecipitó PTP1B. El inmunoprecipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer acetato pH 5,6 con p-nitrofenil fosfato como sustrato enzimático y luego la mezcla se incubó a 37°C, hasta medir la densidad óptica a 415 nm en un espectrofotómetro. En **B** se muestra en un gráfico del promedio de 3 experimentos independientes de la O.D. (415nm) que alcanza la mezcla del inmunoprecipitado PTP1B con su sustrato enzimático, luego de 24 h de incubación. La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1) en ausencia de estímulo (Ctrl) y sus diferencias están indicadas como \* $p < 0,05$ .

**OBJETIVO 3 Determinar si la activación del AT2R inhibe la metástasis dependiente de la vía transduccional CAV1/Rab5/Rac-1 en modelos animales.**

**La activación del AT2R disminuye la metástasis de las células B16F10**

Hasta el momento se observa que la activación del AT2R en las células B16F10 tiene un efecto negativo sobre la migración de células tumorales. Sin embargo, se desconoce si la disminución de la migración que promueve AT2R podría tener un impacto sobre la metástasis. Para dilucidar esta incógnita se evaluó el efecto que tiene la activación del AT2R en la metástasis por medio de ensayos *in vivo* en ratones C57BL/6. Es importante destacar que aunque este ensayo es llamado “ensayo de metástasis” solo permite evaluar las últimas etapas de la metástasis de una célula tumoral, correspondientes a la adhesión al endotelio de los vasos, extravasación, invasión en el tejido de destino y conformación de un tumor. Esto se debe a que en este ensayo las células son inyectadas directamente al torrente sanguíneo, sin considerar las primeras etapas de la metástasis como son la liberación de la célula del tumor primario, invasión del tejido adyacente y posterior intravasación. El ensayo consistió en armar 4 grupos de ratones. Los dos primeros grupos correspondientes al los grupos controles se inocularon por la vena de la cola con células B16F10(mock) o B16F10(cav-1) pre-tratadas con el vehiculo (agua), mientras que los otros dos son inoculados con las células pre-tratadas con CGP42112. Transcurridos 18-21 días se extrajo el pulmón y se fijó. Luego se pesó el tejido completo, se analizó la masa metastásica y se registraron las diferencias (**Figura 31**). Todo este procedimiento se describe en detalle por la Dra. Lorena Lobos en su Tesis

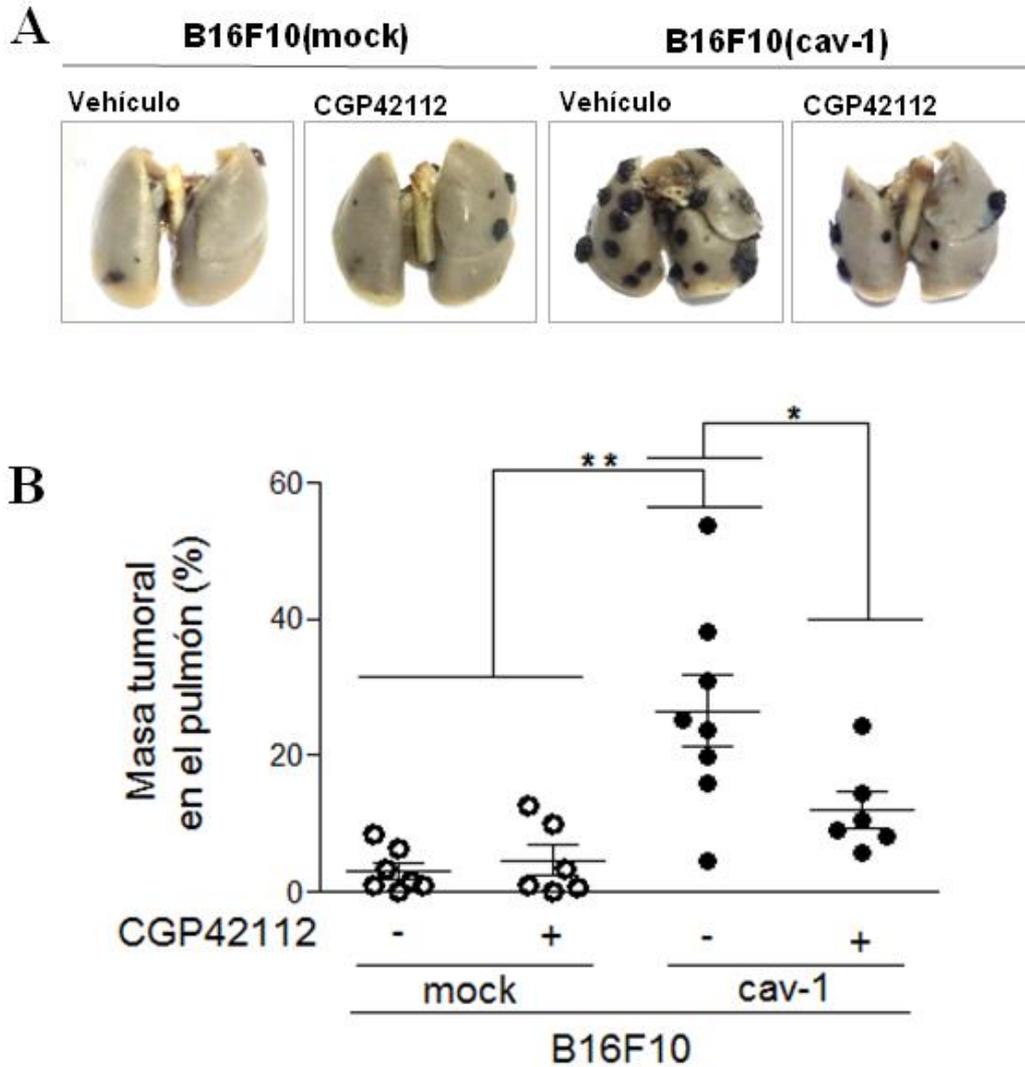
de Doctorado (2011) y en sus artículos (Lobos-Gonzalez y col., 2013; Lobos-Gonzalez y col., 2014).



**Figura 31. Ensayo de metástasis.** A. Las células B16F10 se preincubaron con CGP42112. B. Luego fueron lavadas, tripsinizadas y contadas, para luego ser inyectadas en el torrente sanguíneo de los ratones C57BL/6. C. Una vez que los animales llegaron al día 21 post inyección se sacrificaron, para extraer el pulmón, el cual se fijó en la solución de Feketes. Una vez fijado el pulmón, se pesó el tejido completo, luego se separó y se pesó la masa tumoral (negra).

Los resultados del ensayo se muestran en la **Figura 32A**. Las fotografías corresponden a los pulmones más representativos de cada uno de los grupos de los ratones C57BL/6 con metástasis, transcurrido los 21 días post-inoculación. La masa tumoral se aprecia como una masa de color oscuro en el pulmón. Como se puede observar, al igual como sucedió en los ensayos de migración, las células B16F10(cav1) tenían un nivel de metástasis mayor al de B16F10(mock) cuando son tratadas sólo con el vehículo. Este efecto se debe al potenciamiento de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 que promueve CAV1. Sin embargo, cuando estas células fueron tratadas con CGP42112, la metástasis de las células B16F10(cav-1) disminuyó de

manera significativa de un 27% a un 12%, mientras que no generó cambios evidentes en las células B16F10(mock) (**Figura 32B**).



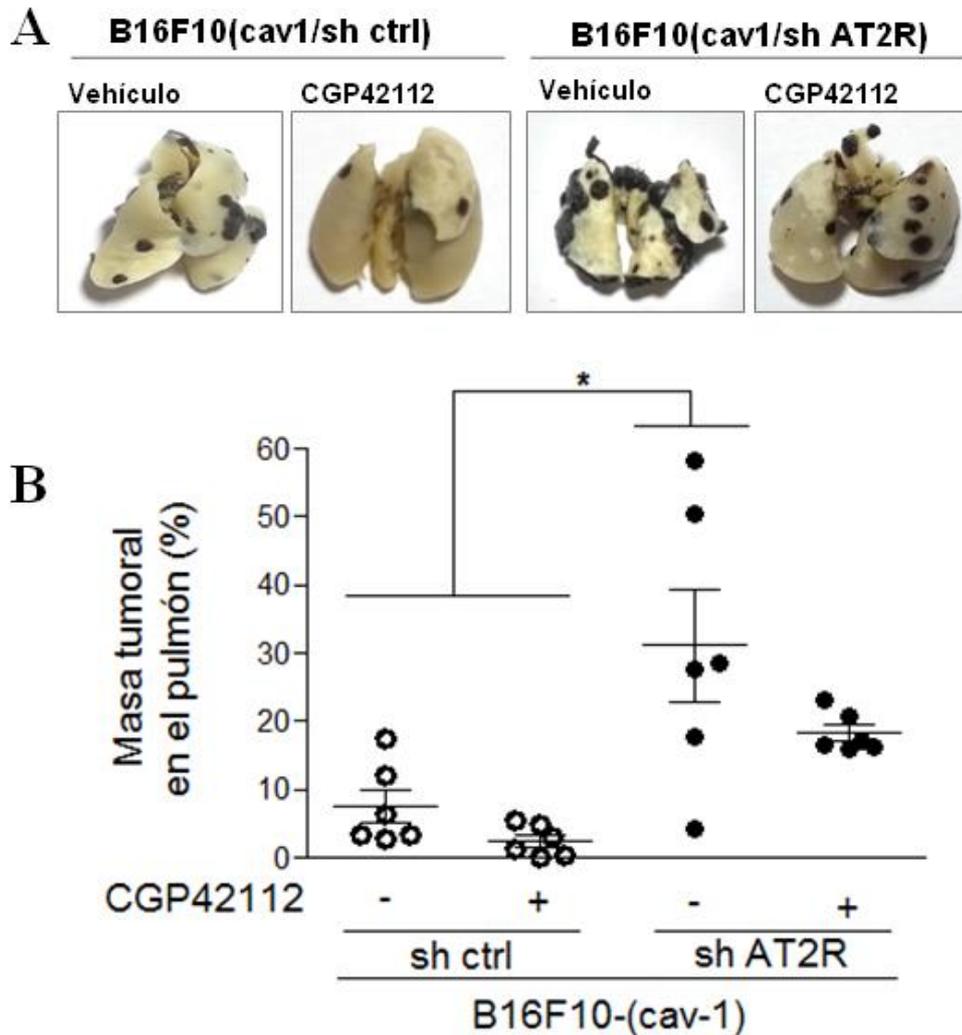
**Figura 32. Ensayo de metástasis de células B16F10 expuestas al agonista CGP42112.** Se inyectaron 200.000 células B16F10(mock) y B16F10(cav-1) pre-incubadas por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M), además de sus respectivos controles preincubados con vehículo (agua). Las células se administraron intravenosamente por la vena de la cola. A los 21 días se sacrificó a los animales, se extrajeron los pulmones y se fijaron en la solución Feketes, para luego cuantificar la masa de los nódulos metastásicos presentes en este órgano. En el panel **A** se observan imágenes representativas de los pulmones obtenidos luego de realizado el experimento *in vivo*, con células B16F10(mock) y B16F10(cav-1) pre-incubadas o no con el ligando. En el panel **B** se observa la cuantificación de la masa tumoral que generaron las células B16F10(mock) y B16F10(cav-1), la cual se encuentra expresada como el porcentaje del cociente de la masa tumoral en el pulmón respecto a la masa del pulmón completa. Cada círculo representa a un animal al que se le realizó la inoculación y se

sacrificó. La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1) sin estimular y sus diferencias están indicadas como \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$ .

### **El silenciamiento del AT2R aumenta la metástasis de las células B16F10**

Con el fin de corroborar que efectivamente AT2R era el responsable de disminuir la metástasis de las células B16F10(cav1) se repitió el ensayo anterior pero utilizando las células B16F10(cav1) con el receptor silenciado (sh AT2R). Para ello se armaron 4 grupos de ratones, los dos primeros inoculados por la vena de la cola con células B16F10(cav1/sh ctrl) o B16F10(cav1/sh AT2R) pre-tratadas con el vehículo, mientras que los otros dos grupos se inocularon con las mismas células pero pre-tratadas con CGP42112.

La **Figura 33A** muestra una fotografía de los pulmones más representativos de cada uno de los grupos. La cuantificación de la masa tumoral indicó que la ausencia del AT2R en las células B16F10(cav-1) aumentó significativamente sus niveles de metástasis desde un 7,5% hasta un 31,2% (**Figura 33B**). Además, consistente con nuestra hipótesis, las células B16F10(cav-1/sh AT2R) no disminuyeron su metástasis luego del estímulo con el agonista probando que la disminución en la metástasis que generó CGP42112 en el ensayo anterior se debió a la actividad del AT2R. Sin embargo, al igual que ocurrió anteriormente las células B16F10(cav-1/sh ctrl) no respondieron al estímulo con CGP42112 como lo hacen las células B16F10 en el ensayo anterior. Esto nuevamente sugiere que las células B16F10(cav-1/sh ctrl) no son el control más adecuado para comparar los cambios que genera la ausencia de AT2R en este ensayo.



**Figura 33. Ensayo de metástasis de células B16F10 con el AT2R silenciadas expuestas al agonista CGP42112.** Se transfectaron 200.000 células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R) pre-incubadas por 30 min con CGP42112 (1  $\mu$ M), además de sus respectivos controles sin tratamiento. Las células se administraron intravenosamente por la vena de la cola. A los 21 días se sacrificaron los animales, se extrajeron sus pulmones y fijaron en la solución Feketes, para luego cuantificar la masa de los nódulos metastásicos presentes en este órgano. En **A** se observan imágenes representativas de los pulmones luego de realizado el experimento *in vivo* con células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R) pre-incubadas o no con el ligando. En el gráfico **B** se observa la cuantificación de la masa tumoral que generaron las células B16F10(cav-1/sh ctrl) y B16F10(cav-1/sh AT2R), la cual se expresada como el porcentaje del cociente de la masa tumoral en el pulmón respecto a la masa del pulmón completa. Cada círculo representa a un animal al que se le realizó la inoculación y se sacrificó. La comparación estadística de todas las condiciones se realizó con respecto a las células B16F10(cav-1/shAT2R) sin estimular y su diferencias están indicadas como \* $p < 0,05$ .

## DISCUSION

La metástasis es un proceso secuencial de varios pasos (Sahai y col., 2007), responsable del 90% de las muertes asociadas al cáncer (Mehlen y Puisieux, 2006) por lo que se ha convertido en un objetivo prioritario para el tratamiento del cáncer. Los componentes del sistema SRA como el AT2R controlan el proceso de metástasis pero no están claro sus los mecanismos (Ager y col., 2010; Guimond y col., 2013; Molina y col., 2013; Rodrigues-ferreira y Nahmias, 2015; Li y col., 2016; ). Recientemente se describió un nuevo mecanismo en el que CAV1, un conocido inductor de metástasis (Williams y Lisanti, 2005), promueve la metástasis en el melanoma y el cáncer de mama, a través el eje CAV1/Rab5/Rac-1 (Urta y col., 2012; Díaz y col., 2014; Ortiz y col., 2016) . La promoción de metástasis a través de esta vía comienza cuando CAV1 se fosforila en Y14, lo que aumenta la actividad de Rab5 y Rac1 y promoviendo la migración y la metástasis de las células tumorales. Algunos trabajos previos han correlacionado el SRA con la actividad de CAV1 ( Wyse y col., 2003; Piastowska-Ciesielska y col 2013;Forrester y col., 2017), controlando específicamente dicha fosforilación (Chen y col., 2012). En este trabajo se investigó si la activación del AT2R puede inhibir la actividad de esta vía, disminuyendo la migración y metástasis del cáncer de melanoma y mama.

## **Expresión diferencial del AT2R entre líneas celular de melanoma murino (B16F10) y cáncer de mama (MDA-MB-231).**

Poco se sabe acerca de la expresión del AT2R en el tumor de melanoma. Aunque se existen trabajos que muestran que los melanocitos normales no expresan este receptor (Um y Henz, 2004), recientemente se ha detectado su expresión en líneas celulares humanas de melanoma (Navin y col., 2018). Esto se debe a que, tal vez, los melanocitos durante su transformación a melanoma comienzan a sobreexpresar el AT2R, evento que ya se había observado en varios tipos de cáncer en los que el receptor se encuentra ausente en la célula normal pero comienza a expresarse en etapas más avanzadas de la enfermedad (George y col., 2010).

Nuestros resultados han mostrado que las células B16F10 del melanoma murino expresan el AT2R tal como se ha informado recientemente en líneas celulares humanas de melanoma (Navin y col., 2018). Sin embargo, su expresión parece ser independiente de CAV1 dado que las células que sobreexpresan CAV1 (B16F10(cav-1)) tienen niveles similares respecto a las células de control B16F10(mock) (**Figura 11A**). Por lo tanto, estos resultados descartan un posible control de CAV1 sobre la expresión de AT2R.

En relación al cáncer de mama se ha mostrado que el AT2R se expresa en las células epiteliales luminales de la mama normal, aumentando significativamente en la hiperplasia y los carcinomas de mama (Paepe y col., 2002). Sin embargo, nuestros resultados con MDA-MB-231 mostraron que estas células no expresan el

AT2R (**Figura 11A**). Aunque existen algunos estudios que han detectado pequeñas cantidades del mRNA del AT2R en líneas celulares de cáncer de mama como D3H2LN, MDA-MB-231 y MCF7, estos niveles no son suficientes para generar efectos biológicos o para la detección de la proteína mediante WB (Lewandowska y col., 2011). Dado estos antecedentes, algunos investigadores han modificado líneas celulares como MDA-MB-231 para que sobreexpresen el AT2R de manera estable a modo de tener modelos que permitan para evaluar su rol en el cáncer de mama (Rodriguez y col., 2012).

La **Figura 11B** mostró que el AT1R se expresa de manera similar en todos los tipos celulares, lo que permitió evaluar la funcionalidad del AT2R ya que se ha descrito que la activación de AT1R promueve la fosforilación de PKC $\alpha$  y que la activación del AT2R conduce a su desfosforilación (George y cols., 2010). La incubación de B16F10 con un ligando común para ambos receptores (Ang II) mostró niveles de fosforilación de PKC $\alpha$  que parecen que incrementaron cuando el receptor AT2R se inhibió (**Figura 13B**). Sin embargo, estos resultados no permiten aseverar que el AT2R contrarresta la acción de AT1R debido a que aquellos cambios no fueron significativos. Considerando el número de condiciones es posible que se requiera un número mayor de ensayos para saber definitivamente si existen diferencias significativas entre estas.

**La activación del AT2R disminuye la capacidad migratoria de células de melanoma murino (B16F10) y de cáncer de mama (MDA-MB-231) en forma dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.**

CAV1 promueve la migración de células tumorales en el melanoma, cáncer de mama y cáncer de colon a través del eje CAV1/Rab5/Rac1 (Díaz y col., 2014). Estos resultados explican la mayor migración que tienen las células que expresan CAV1 (B16F10(cav-1) y MDA-MB-231(shC)) con respecto a sus controles. Se utilizaron diferentes concentraciones del agonista del AT2R CGP42112 para elegir una lo suficientemente baja que evite cualquier activación inespecífica del AT1R, lo cual se ha descrito que ocurre cuando se utilizan concentraciones superiores a 10  $\mu$ M (Bosnyak y col., 2011). La disminución significativa de la migración de las B16F10(cav-1) a los niveles que presentan las B16F10(mock) utilizando CGP42112 (1  $\mu$ M) sugiere que la activación del AT2R disminuyó la migración celular, inhibiendo la actividad de la vía CAV1/ Rab5/Rac1 (Figura 14).

El estudio del papel de CAV1 en la migración celular ha permitido identificar algunos procesos en los que CAV1 es crucial. Algunos estudios indican a CAV1 como un factor clave durante la migración transendotelial. Por ejemplo, CAV1 es un regulador clave del tráfico de linfocitos a través de la pared endotelial (Wu y col., 2016) y también regula la extravasación de neutrófilos (Marmon y col., 2009). En el contexto de la metástasis, CAV1 ha sido responsable de promover el proceso de extravasación, potenciando la metástasis del melanoma (Arpaia y col.,

2012). Cuando se evaluó esta capacidad de CAV1 en el ensayo de TEM, se observó que CAV1 efectivamente aumentó la migración transendotelial de B16F10(cav-1), pero más importante aún este efecto puede ser prevenido luego del tratamiento con el agonista CGP42112 (**Figura 16**). Este resultado sugiere que el AT2R no solo inhibe la migración, sino que su papel también podría afectar procesos más complejos como la intravasación y extravasación, posiblemente inhibiendo la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Sumado a lo anterior, la ausencia del AT2R en las células MDA-MB-231 ayudó a confirmar que el papel del AT2R era inhibir la migración ya que CGP42112 no la disminuyó en estas células carentes del receptor (**Figura 17**).

El silenciamiento del AT2R en las células B16F10 solo fue exitoso mediante el tratamiento de selección clonal. La **Figura 18A** muestra que los niveles del AT2R en todos los clones obtenidos reveló que solo dos clones disminuyeron parcialmente los niveles del AT2R (clones 2 y 5). El análisis estadístico de la expresión de AT2R en la **Figura 16B** estableció que aunque los niveles del AT2R solo disminuyeron de manera parcial, esta diferencia es significativa entre las células B16F10(cav-1/sh AT2R) (clon 5) y las células control B16F10(cav-1/sh ctrl). Sin embargo, estas últimas también sufrieron una disminución en los niveles de expresión del AT2R, lo que sugiere que el sh ctrl (sh scramble) podría tener un efecto negativo sobre la expresión de AT2R en estas células o bien el proceso de selección clonal afectó negativamente la expresión del AT2R. A pesar de lo anterior, la disminución en los niveles del AT2R que experimentaron las células B16F10(cav-1/sh ctrl), no parece afectar la acción anti-migratoria que tiene el AT2R ya que el

ensayo de migración mostró que las células B16F10(cav-1/sh ctrl) siguen disminuyendo su migración en presencia de CGP42112, a diferencia de lo que sucede con B16F10(cav-1/sh AT2R) (clon 5) que si bien no logró una disminución absoluta del receptor ya no responde a CGP42112. Estos datos indican que a pesar de que las células B16F10(cav-1/sh ctrl) también disminuyeron sus niveles de AT2R, éstas siguen siendo un buen control para estudiar el rol de AT2R, al menos en migración.

El silenciamiento del AT2R en B16F10 y su sobreexpresión en MDA-MB-231 sugieren que AT2R podrían ejercer su función anti-migratoria, inhibiendo la vía CAV1/RAB5/Rac1. Esta sugerencia se debe a que CGP42112 no disminuyó la migración de B16F10(cav-1/sh AT2R) como lo hizo con B16F10(cav-1/sh ctrl) (**Figura 16B**) pero también porque la sobreexpresión del AT2R en MDA-MB-231 solo disminuyó la migración de células que expresan CAV1 (MDA-MB-321(ctrl/AdnHA-AT2R)) (**Figura 20**).

Aunque el resultado con los adenovirus resultó como esperábamos, es importante considerar que el gen utilizado para sobreexpresar el AT2R en las células MDA-MB-231 era de rata, por lo tanto, es posible que los efectos observados podrían diferir con respecto a los que podríamos obtener con la sobreexpresión del AT2R de origen humano. Al respecto, la literatura señala que el gen de AT2R humano comparte mas de un 92% de homología con el de rata (Li y col., 2012) y aún no se han descrito diferencias funcionales entre ellos. Sin embargo, la caracterización de su porción C-terminal ha revelado diferencias en algunos aminoácidos que están

involucrados en su exportación desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática (Zhang y col., 2011). Por lo tanto, es posible que el AT2R de rata hubiera sufrido dificultades para translocarse a la membrana en estas células. Los resultados no descartan la posibilidad de que el AT2R este ejerciendo su efecto anti-migratorio desde el interior de la célula ya que esto es algo que ya ha sido reportado en receptores acoplados a proteína G (Tsvetanova y col., 2015). Sin embargo, independiente del lugar desde donde este señalizando AT2R el efecto siempre afecta a células que sobreexpresan CAV1, apoyando la hipótesis de que AT2R inhibe la migración que promueve CAV1.

Interesantemente, tanto en los ensayos utilizando células de melanoma con el AT2R silenciado como en los que se sobreexpresó el AT2R en las células de cáncer de mama se observó que al parecer existe una actividad del AT2R intrínseca. El silenciamiento del AT2R en las células B16F10 aumentó la migración celular, mientras su sobreexpresión en las células MDA-MB-231 disminuyó la migración en ausencia de estímulo. Esta actividad constitutiva del AT2R ha sido descrita cuando el AT2R forma homo-oligómeros. En esta conformación y la interacción intermolecular entre los receptores induce la señalización celular independiente de la estimulación del ligando (Miura y col., 2005). Por lo tanto, es probable que una porción del AT2R se encuentra formando oligómeros (lo que explicaría la actividad intrínseca) y el resto podría ser responsable del efecto de CGP42112 que observamos en la migración. Sin embargo, es importante considerar que en el caso de las células que fueron silenciadas no se descarta que este aumento en la migración sea más bien un artefacto dado por la disminución del potencial migratorio de las células control.

### **AT2R promueve la desfosforilación de CAV1 en Y14.**

En cuanto al mecanismo de acción del AT2R, se sabe que este receptor es un activador de fosfatasas, lo cual sugiere que podría disminuir la migración a través de la desfosforilación de Y14-p-CAV1. El análisis mostró una disminución significativa de los niveles de Y14-p-CAV1 luego del tratamiento con CGP42112. Sin embargo, esta disminución fue muy leve, alrededor del 22%, sugiriendo que solo una pequeña cantidad de CAV1 es responsable de promover la migración (**Figura 22A**). Esto es compatible con algunos trabajos que indican que la cantidad de CAV1 fosforilada que promueve la migración celular es solo la que está presente en el frente de avance y adhesiones focales (Nethe y Hordijk, 2011)

Por otra parte, el análisis de las células silenciadas del AT2R mostró un aumento en los niveles de fosforilación con respecto a la condición de control (**Figura 22B**), lo cual apoya la hipótesis de que existe una porción de AT2R que se encuentra constitutivamente activa. Sin embargo, la estimulación de las células B16F10(cav-1/sh ctrl) con CGP42112 no disminuyó los niveles de Y14-p-CAV1, probablemente debido a que los niveles del AT2R que presentan estas células disminuyeron demasiado luego del silenciamiento y su posterior selección clonal. Lo anterior sugiere que las células B16F10(cav-1/sh ctrl) no son el mejor control de silenciamiento para evaluar el efecto de AT2R sobre la fosforilación de CAV1.

Los ensayos con la mutante fosfomimética B16F10(cav-1/Y14E) ayudó a confirmar que la discreta disminución en la fosforilación que promueve el AT2R sobre CAV1 es en definitiva, la causa de la inhibición de la migración que genera este receptor. Los resultados muestran que la migración de estas mutantes no se altera con CGP42112, como ocurrió con las B16F10(cav-1) (**Figura 24**). Esto se debe a que la mutación de CAV1 en estas células es precisamente en el residuo Y14, por lo que CGP42112 no estimula la desfosforilación de CAV1 y por lo tanto no disminuye su potencial migratorio.

Existen investigaciones que han mostrado que la fosforilación en Y14 de CAV1 puede promover la migración a través de diferentes vías (Nuñez-Wehinger y col., 2014), siendo la vía CAV1/ Rab5/Rac-1, una de las últimas en descubrirse. Por lo tanto, para afirmar que el AT2R ejerce su inhibición principalmente sobre la vía CAV1/Rab5/Rac-1 y descartar otras vías, fue necesario evaluar los componentes río debajo de CAV1, las GTPasas Rab5 y Rac-1.

El análisis de los niveles activos de Rab5 mediante el ensayo de pull down mostraron una disminución significativa después del tratamiento con CGP42112 en B16F10(cav-1) pero no en B16F10(mock) (**Figura 26A**). Aunque hasta el momento no se ha informado que el AT2R pueda influir en la activación de Rab5 se ha descrito que el AT2R puede aumentar la expresión de p85 $\alpha$  (Senbonmatsu y col., 2003), una GAP de Rab5 que es secuestrado por Y14-p-CAV1 y que es, en última instancia, la responsable de aumentar la activación de Rab5 en la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Sin embargo, un posible aumento en la expresión de p85 $\alpha$  no

podría explicar el efecto del AT2R sobre Rab5 ya que la estimulación con el agonista CGP42112 fue solo por 30 min, un tiempo muy corto para esperar cambios en la expresión de esta proteína.

Los niveles activos de Rac-1 analizados en ensayos de pull down revelan que el AT2R también disminuyó sus niveles activos (**Figura 26B**), probablemente debido a la disminución de los niveles activos de Rab5. Aunque aún no se describe un enlace directo entre AT2R y Rac-1, se ha descrito una relación entre Rac-1 y PP2A, una de las clásicas fosfatasa activadas por AT2R. Sin embargo, esta relación todavía es controversial porque, si bien en algunos casos PP2A puede disminuir los niveles de Rac-1 a través de la desfosforilación de TIAM1 (Zhu y col., 2015), en otro caso promueve su estado inactivo (Bousquet y col., 2015).

Mediante FRET se determinó en qué sitios de la célula, Rac-1 disminuyó su actividad por efecto de la activación del AT2R. Estos resultados corresponden a un solo experimento de modo que no es posible establecer diferencias significativas. Sin embargo, este experimento fue útil para confirmar que la discreta disminución que provocó CGP42112 y que se detectó mediante pull down corresponde a la Rac-1 involucrada en el proceso de migración celular. Antes del estímulo, los resultados mostraron que Rac-1 activo se encuentra localizado por todo el contorno de las células B16F10(cav-1) y principalmente en el frente de avance, promoviendo migración. A diferencia de lo que ocurre en las células B16F10(mock), en donde Rac-1 activo se distribuyó por toda la célula. Como consecuencia de lo anterior, la estimulación del AT2R en las células B16F10(cav-1) afectó principalmente a la Rac-

1 localizada en el frente de avance. Esto explicaría la inhibición de la migración que provocó el AT2R en estas células. En cambio en las B16F10(mock) aunque AT2R también disminuyó la actividad de Rac-1, esto no influyó en la migración celular debido a que Rac-1 activo no está localizado únicamente en el frente de avance en estas células, lo que sugiere que no participaría en su migración. El análisis de la morfología de la célula antes y después del estímulo ayudó a descartar que la disminución en la fluorescencia observada en el contorno de la célula y principalmente en el frente de avance, sea consecuencia de la retracción de la célula.

Interesantemente, el ensayo de pull down nunca reveló una disminución en los niveles activos de Rac-1 al estimular las células B16F10(mock) con CGP42112 como ocurrió en el ensayo de FRET. Esto podría explicarse porque en el ensayo de FRET, el estímulo con CGP42112 se realizó luego de estimular la migración de la célula, en cambio en el ensayo de pull down, las células recibieron el estímulo estando estáticas (**Figura 28**). Lo anterior sugiere que las células B16F10(mock) podrían aumentar sus niveles activos de Rac-1 durante la migración de una manera independiente de CAV1. Pero más importante aún, estos datos sugieren que el AT2R podría disminuir los niveles activos de Rac-1 mediante un mecanismo alternativo independiente de CAV1, que se hace más evidente cuando el receptor se activa durante la migración celular.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la desfosforilación promovida por la activación del AT2R en CAV1 es la responsable de disminuir la migración. Sin embargo, aunque la disminución en la actividad de Rab5 y Rac-1 al incubarse con CGP42112 son consistentes con la hipótesis que plantea

que AT2R inhibe la vía Cav1/Rab5/Rac-1, aún no se ha corroborado que esta desfosforilación es la responsable de disminuir la activación de estas GTPasas. Para ello será necesario evaluar cómo varía la activación de estas GTPasas en las mutantes fosfomiméticas incubadas con CGP42112.

**La desfosforilación de CAV1 en Y14 promovida por el AT2R se debe al aumento en la actividad de la fosfatasa PTP1B.**

Considerando que el AT2R es un conocido activador de fosfatasa (Fariacosta y col., 2014), es muy probable que una fosfatasa unida a CAV1 sea la responsable de los efectos que AT2R ejerce sobre esta proteína. La desfosforilación de Y14-p-CAV1 depende de la actividad de PTP1B (Lee y col., 2006; Shin y col., 2006). Aunque no hay evidencia en la literatura que indique que la actividad de PTP1B puede ser modulada por AT2R, se ha descrito que Ang II, el ligando del AT1R y del AT2R, puede promover la activación de PTP1B (Nemoto y col., 2014). Los resultados usando el inhibidor específico de PTP1B (Cinn-GEL2ME) mostraron que la inhibición de esta fosfatasa no solo restauró los niveles de Y14-p-CAV1 que disminuyó CGP42112 en las células B16F10(cav-1) (**Figura 29A**) sino que también los niveles de migración que disminuyó CGP42112 en estas células (**Figura 29B**). Estos resultados sugieren que la PTP1B está implicada en el efecto que promueve AT2R sobre la migración dependiente de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.

Para corroborar que la activación del AT2R aumenta la actividad de PTP1B, primero se inmunoprecipitó esta enzima con el fin de medir su actividad. La inmunoprecipitación mostró que PTP1B es parte de un complejo que comparte con

CAV1 (**Figura 30A**) y al parecer esta asociación no es modificada en presencia de CGP42112, Sin embargo, debido a que solo se trata de un único experimento no se puede descartar la posibilidad que el AT2R podría disminuir los niveles de Y14-p-CAV1, influyendo sobre la estabilidad del complejo. La medición de la actividad de fosfatasa alcalina de PTP1B inmunoprecipitada mostró que el AT2R aumenta la activación de PTP1B comparada con la condición control (**Figura 30B**). Sin embargo, tenemos que considerar que la actividad enzimática medida corresponde a todas las fosfatasas alcalinas presentes en el complejo inmunoprecipitado de PTP1B que, si bien se encuentra enriquecido en dicha fosfatasa, no se puede descartar la contribución de otra fosfatasa presente en el complejo. A pesar de lo anterior, es muy probable que AT2R controle la actividad de PTP1B porque esta fosfatasa aumenta su actividad cuando los niveles de ROS disminuyen (Touyz y col., 2004), que es uno de los efectos más clásicos de AT2R (Salsman y col., 2005).

### **AT2R disminuye la metástasis de melanoma**

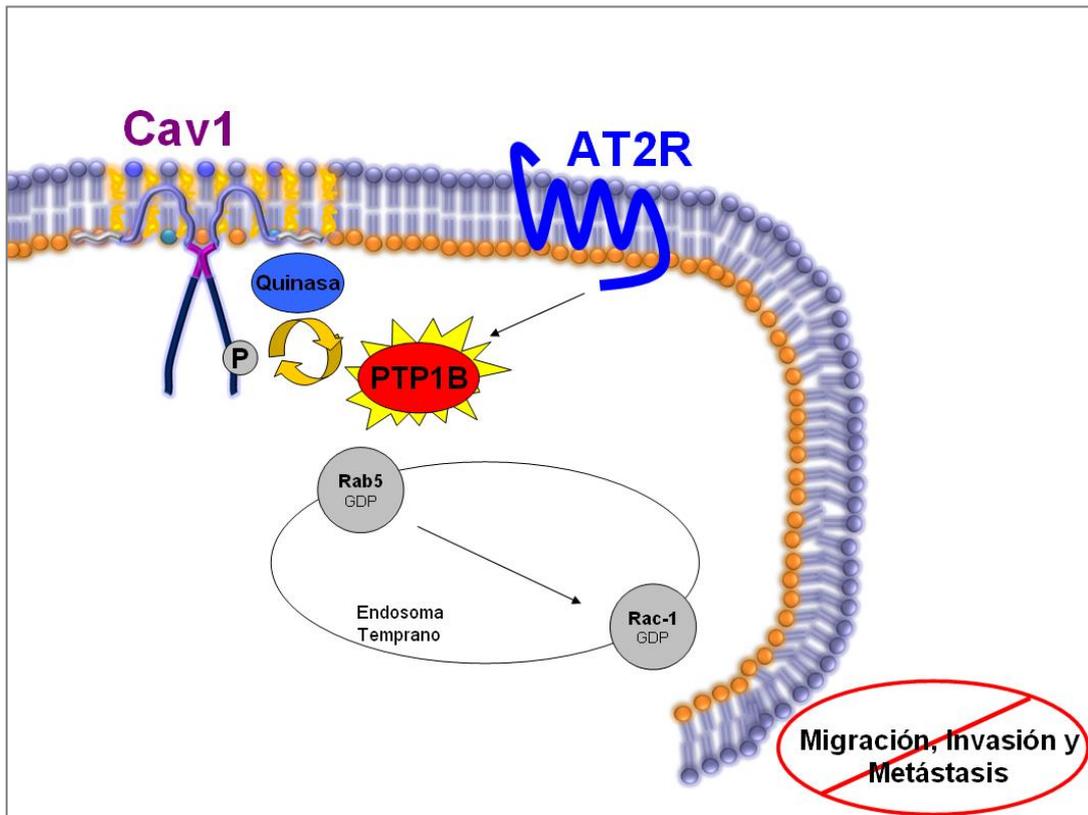
El papel del AT2R como inhibidor de metástasis se evaluó mediante el ensayo de metástasis. Este ensayo ayudó a evaluar el potencial metastásico de una célula de melanoma que ha sido previamente incubada con CGP42112. Los resultados mostraron una disminución significativa de la metástasis de B16F10(cav-1) tratada con CGP42112, pero no de las células B16F10(mock) (**Figura 32**), tal como ocurrió en los ensayos de migración. Esto sugiere que el efecto de AT2R sobre la metástasis es mediante la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.

Sumado a lo anterior, los resultados del ensayo de metástasis utilizando las células silenciadas mostraron que CGP42112 no disminuyó la metástasis en B16F10(cav-1/sh AT2R), confirmando la importancia de este receptor en este proceso (**Figura 33**). Además, tal como se observó en los ensayos de migración con las células B16F10(cav-1/sh AT2R), el silenciamiento del AT2R aumentó el potencial de metástasis con respecto a su control (B16F10(cav-1/sh ctrl)), sugiriendo que la activación intrínseca del AT2R también influye en la metástasis. Sin embargo, las células (B16F10(cav-1/sh ctrl) no disminuyeron los niveles de metástasis luego de ser incubadas con CGP42112. Este resultado sugiere que la disminución de la expresión de AT2R experimentada en estas células puede haber afectado su capacidad de responder a CGP42112. Aunque ya habíamos constatado que la disminución en la expresión del AT2R en las células (B16F10(cav-1/sh ctrl) no afectaba su capacidad de respuesta a CGP42112 en procesos como la migración (**Figura 18D**), no se evaluó si estas células seguían respondiendo a CGP42112 en otros procesos más complejos que también son parte de la metástasis como por ejemplo la invasión, migración transendotelial, etc. La metástasis es un proceso complejo que involucra más etapas, es necesario una actividad de AT2R lo suficientemente alta para inhibir la migración durante todo el proceso, algo que probablemente con las células (B16F10(cav-1/sh ctrl) no se puede lograr debido a la baja expresión de este receptor.

Adicionalmente, otro argumento que puede explicar la incapacidad de estas células de disminuir su metástasis al ser estimuladas con CGP42112, es que hayan disminuido su potencial migratorio por la disfunción o ausencia de alguno de los componentes de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Aún no se ha comparado el potencial

migratorio de las células B16F10(cav-1/sh ctrl) con las B16F10(cav-1), por lo que se desconoce si las primeras modificaron su potencial migratorio comparado con el que tienen las segundas. La comparación entre los niveles de metastasis que alcanzan las células B16F10(cav-1) (aproximadamente 30%) con el de las (B16F10(cav-1/sh ctrl) (aproximadamente 7%) sugiere que estas últimas efectivamente disminuyeron su potencial metastasico. Sin embargo, esto es algo que aún no ha sido evaluado en un ensayo que incorpore ambos tipos celulares.

A pesar de que el silenciamiento del AT2R no permite corroborar el rol de esta proteína en la metástasis, los resultados obtenidos hasta el momento han sido consistentes en sugerir que AT2R inhibe la migración de melanoma y cáncer de mama mediante la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1. Sin embargo, estos resultados aun no permiten sostener esta hipótesis con certeza. Para ello, es necesario realizar experimentos con las mutantes fosfomimeticas con el fin de corroborar que la desfosforilacion promovida por la activación del AT2R es la responsable de inhibir la actividad de las GTPasas río abajo y no es un efecto directo de AT2R sobre estas proteínas. Además, es necesario utilizar mutantes constitutivamente activas de las GTPasas para corroborar que la disminución en su actividad es efectivamente la responsable de inhibir la migración y metástasis. A pesar de que aun quedan preguntas por resolver, colectivamente estos resultados sugieren un posible mecanismo de acción por el cual el AT2R podría inhibir la migración y metástasis de estas células tumorales, el cual se seguirá explorando **(Figura 34)**.



**Figura 34. Modelo propuesto para el mecanismo por el cual el AT2R inhibe la actividad de la vía CAV1/Rab5/Rac-1.** PTP1B es una fosfatasa que forma parte de un complejo multiproteico con CAV1 y que desfosforila a CAV1 en Y14. La activación del AT2R con el agonista CGP42112 estimula la actividad de la fosfatasa PTP1B, promoviendo la desfosforilación de CAV1. Esta desfosforilación desactiva la vía CAV1/Rab5/Rac-1, inhibiendo los procesos de migración, invasión y metástasis.

## CONCLUSIONES

- La presente investigación propone un nuevo mecanismo por el cual el AT2R inhibe la metástasis de melanoma y del cáncer de mama. En base a los resultados se concluye que la inhibición de la vía CAV1/Rab5/Rac-1 dada por la desfosforilación de CAV1 promovida por el AT2R es el principal mecanismo por el cual este receptor inhibe la metástasis en este tipo de cánceres. Este estudio además identificó un nuevo blanco de acción del AT2R, la fosfatasa PTP1B. Esta fosfatasa incrementa su actividad gracias a la activación de dicho receptor y es la responsable, en última instancia, de la desfosforilación que AT2R promueve sobre CAV1.
- En resumen, el presente estudio identificó que el AT2R funciona como un inhibidor de metástasis potenciado por CAV1. Este nuevo conocimiento podría ser importante para prevenir la metástasis potenciada por CAV1 mediante el desarrollo de tratamientos que impliquen la activación de AT2R en etapas claves del desarrollo de este proceso.

## BIBLIOGRAFIA

- Ager, E. I., Chong, W. W., Wen, S.-W., & Christophi, C. (2010). Targeting the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in colorectal liver metastases. *Cancer cell international*, *10*, 37. doi:10.1186/1475-2867-10-37
- Ager, E. I., Wen, S. W., Chan, J., Chong, W. W., Neo, J. H., & Christophi, C. (2011). Altered efficacy of AT1R-targeted treatment after spontaneous cancer cell-AT1R upregulation. *BMC Cancer*, *11*(1), 274. doi:10.1186/1471-2407-11-274
- Ager, E., Neo, J., & Christophi, C. (2008). The renin – angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, *29*(9), 1675–1684. doi:10.1093/carcin/bgn171
- Akhavan MM, Karimi M, Ghodrati M, F. H. (2011). AT1 receptors activation enhances the expression of MMP-2, MMP-13 and VEGF but not MMP-9 in B16F10 melanoma cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *14*(17), 821–830.
- Arpaia, E., Blaser, H., Duncan, G., Leong, H. S., Ablack, A., Nambiar, S. C., Lind, E. F., et al. (2012). The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src , Ras and Erk. *oncogene*, *31*, 884–896. doi:10.1038/onc.2011.288
- Bali, A., & Jaggi, A. S. (2013). Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, *76*, 49–57. doi:10.1016/j.phrs.2013.07.004
- Balkwill, F. R. (2012). The chemokine system and cancer. *journal of pathology*, (226), 148–157. doi:10.1002/path.3029
- Beeser, A., & Chernoff, J. (2004). Rho GTPases and Cell Motility. *Beeser, A., & Chernoff, J.*, 141–154.
- Benigni, A., Cassis, P., & Remuzzi, G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine*, *2*(7), 247–57. doi:10.1002/emmm.201000080
- Benndorf, R., Böger, R. H., Ergün, S., Steenpass, A., & Wieland, T. (2003). Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circulation research*, *93*(5), 438–47. doi:10.1161/01.RES.0000088358.99466.04
- Bertram, J. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, *21*, 167–223.

- Bosnyak, S., Jones, E. S., Christopoulos, A., Aguilar, M., Thomas, W. G., & Widdop, R. E. (2011). Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT 1 and AT 2 receptors. *Clinical Science*, *303*, 297–303. doi:10.1042/CS20110036
- Bousquet, E., Calvayrac, O., Mazières, J., Boubekour, N., Favre, G., & Pradines, A. (2015). RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition. *Oncogene*, (August 2014), 1–10. doi:10.1038/onc.2015.240
- By, J. J. (2018). Fibrinolytic Properties of a Human Endothelial Hybrid Cell Line (Ea.hy 926). *Blood*, *71*(6), 1669–1675.
- Campbell, D. J., Lawrence, A. C., Towrie, A., Kladis, A., & Valentijn, A. J. (1991). Differential Regulation of Angiotensin Peptide Levels in Plasma and Kidney of the Rat. *Journal of the American Heart Association*, *18*, 763–773. doi:10.1161/01.HYP.18.6.763
- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., & Lisanti, M. P. (1997). Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-scaffolding Domain: IMPLICATIONS FOR THE INTERACTION OF CAVEOLIN WITH CAVEOLAE-ASSOCIATED PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(10), 6525–6533. doi:10.1074/jbc.272.10.6525
- Chassagne, C., Adamy, C., Ratajczak, P., Gingras, B., Teiger, E., Planus, E., Oliviero, P., et al. (2002). Angiotensin II AT(2) receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *American journal of physiology. Cell physiology*, *282*(4), C654–64. doi:10.1152/ajpcell.00318.2001
- Chen, J., Chen, J.-K., & Harris, R. C. (2012). Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, *32*(5), 981–91. doi:10.1128/MCB.06410-11
- Deshayes, F., & Nahmias, C. (2005). Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *16*(7), 293–9. doi:10.1016/j.tem.2005.07.009
- Díaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., Díaz, N., Leyton, L., & Stupack, D. (2014). Rab5 is required for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation , migration and invasion of metastatic cancer cells. *Journal of cell science*, *127*, 2401–2406.
- Egami, K., Murohara, T., Shimada, T., Sasaki, K., Shintani, S., Sugaya, T., Ishii, M., et al. (2003). Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *The Journal of clinical investigation*, *112*(1), 67–75. doi:10.1172/JCI200316645.Introduction

- Faria-costa, G., Leite-moreira, A., & Henriques-coelho, T. (2014). Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *portuguese journal of cardiology*, 33(7-8), 439–449.
- Felicetti, F., Parolini, I., Bottero, L., Fecchi, K., Errico, M. C., Raggi, C., Biffoni, M., et al. (2010). Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma, 125(7), 1514–1522. doi:10.1002/ijc.24451.Caveolin-1
- Flores-Muñoz, M., Smith, N. J., Haggerty, C., Milligan, G., & Nicklin, S. a. (2011). Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *The Journal of physiology*, 589(Pt 4), 939–51. doi:10.1113/jphysiol.2010.203075
- Forrester, S. J., Elliott, K. J., Kawai, T., Obama, T., Boyer, M. J., Preston, K. J., Yan, Z., et al. (2017). Caveolin-1 Deletion Prevents Hypertensive Vascular Remodeling Induced by Angiotensin II. *Hypertension*, 69(1), 79–86. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08278.Caveolin-1
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-Cell Invasion and Migration : Diversity and Escape Mechanisms. *Nature*, 3(May), 362–374. doi:10.1038/nrc1075
- George, A. J., Thomas, W. G., & Hannan, R. D. (2010). The renin–angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 10(11), 745–59. doi:10.1038/nrc2945
- Goetz, J. G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S. S., Scudamore, T., Kojic, L. D., & Nabi, I. R. (2008). Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *The journal of cell biology*, 180(6), 1261–1275. doi:10.1083/jcb.200709019
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, N. I. (2008). Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis*. *Cancer Metastasis*, (27), 715–735.
- Goldstein, B., Trivedi, M., & Speth, R. C. (2017). Alterations in Gene Expression of Components of the Renin-Angiotensin System and Its Related Enzymes in Lung Cancer. *Lung Cancer International*, 2017. doi:10.1155/2017/6914976
- Grady, E. F., Sechi, L. A., Griffin, C. A., Schambelan, M., & Kalinyak, J. E. (1991). Expression of AT2 Receptors in the Developing Rat Fetus. *The Journal of clinical investigation*, 88(September), 921–933.
- Greco, S. et al. (2003). Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, 196, 370–377.
- Guimond, M.-O., Battista, M.-C., Nikjoutavabi, F., Carmel, M., Barres, V., Doueik, A. a, Fazli, L., et al. (2013). Expression and Role of the Angiotensin II

- AT2Receptor in HumanProstateTissue: In Search of a New Therapeutic Option for Prostate Cancer. *The Prostate*, 73(10), 1057–68. doi:10.1002/pros.22653
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Henrion, D. (2012). Why Do We Need a Selective Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist ? *Hypertension*, 60, 616–617. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197046
- Ho, C., Huang, P., Huang, H., & Hsu, S. (2002). Up-Regulated Caveolin-1 Accentuates the Metastasis Capability of Lung Adenocarcinoma by Inducing Filopodia Formation. *American journal of pathology*, 161(5), 1647–1656.
- Hyeongjin Cho. (2013). Chapter Seventeen - Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity. *Vitamins & Hormones*, 91, 405–424.
- Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, C. M. (2005). Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens*, 23, 463–473.
- Jian Yanga, b, Caiyu Chena, b,, Hongmei Rena, b, Yu Hana, b, Duofen Hea, b, Lin Zhoua, B., & Ulrich Hopferc, Pedro A. Josed, and Chunyu Zenga, B. (2012). Angiotensin II AT2 receptor decreases AT1 receptor expression and function via nitric oxide/cGMP/Sp1 in renal proximal tubule cells from Wistar–Kyoto rats. *Journal of Hypertension*, 30(6), 1176–1184. doi:10.1097/HJH.0b013e3283532099.Angiotensin
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., & Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(12), 1070–7. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00336.x
- Joshi, B., Strugnell, S. S., Goetz, J. G., Kojic, L. D., Cox, M. E., Griffith, O. L., Chan, S. K., et al. (2008). Phosphorylated Caveolin-1 Regulates Rho / ROCK-Dependent Focal Adhesion Dynamics and Tumor Cell Migration and Invasion. *Cancer research*, (20), 8210–8221. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0343
- Kardash, E., Bandemer, J., & Raz, E. (2011). Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nature Protocols*, 6(12), 1835–1846. doi:10.1038/nprot.2011.395
- Kilian, P., Campbell, S., Bilodeau, L., Guimond, M.-O., Roberge, C., Gallo-Payet, N., & Payet, M. D. (2008). Angiotensin II type 2 receptor stimulation increases the rate of NG108-15 cell migration via actin depolymerization. *Endocrinology*, 149(6), 2923–33. doi:10.1210/en.2007-0313

- Koren, S. (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, *1*, 621–640.
- Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-ferrer, C. F., Heringer-walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., et al. (2015). G-Protein – Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Molecular Cardiology*, *111*, 1806–1813. doi:10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D
- Lanzetti, L., Palamidessi, A., Areces, L., Scita, G., Paolo, P., Fiore, D., Europeo, I., et al. (2004). Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases, *221*(2001), 309–314.
- Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M. G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M., Paolo, P., et al. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature*, *408*(November), 374–7.
- Lara Pickel, M.S.1, Takaya Matsuzuka, Ph.D.1, Chiyo Doi, D.V.M.1, Rie Ayuzawa, M. S. ., Dharmendra Kumar Maurya, Ph.D.1, Sheng-Xue Xie, Ph.D.2, Cory Berkland, Ph.D.2, A., & Masaaki Tamura, D.V.M., P. D. . (2011). Over-expression of angiotensin II type 2 receptor gene induces cell death in lung adenocarcinoma cells. *cancer biology and therapy*, *9*(4), 277–285. doi:10.4161/cbt.9.4.10643.Over-expression
- Lee, H., Xie, L., Luo, Y., Lee, S., Lawrence, D., Wang, X., Sotgia, F., et al. (2006). Identification of Phosphocaveolin-1 as a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Substrate. *Biochemistry*, *(1)*(45), 234–240.
- Lessard, L., Stuiblé, M., & Tremblay, M. L. (2010). Biochimica et Biophysica Acta The two faces of PTP1B in cancer. *BBA - Proteins and Proteomics*, *1804*(3), 613–619. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.018
- Lewandowska, U., Lachowicz-Ochędalska, A., Domińska, K., Kaszewska, D., & Rębas, E. (2011). Angiotensin II as a factor modulating protein tyrosine kinase activity in two breast cancer lines — MCF-7 and MDA-MB-231 Angiotensyna II jako czynnik modulujący aktywność kinaz tyrozynowych. *Polish Journal of Endocrinology*, *62*(October 2014), 151–157.
- Li, H., Qi, Y., Li, C., Braseth, L. N., Gao, Y., Shabashvili, A. E., Katovich, M. J., et al. (2009, December). Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0237
- Li, J., Luo, J., Gu, D., Jie, F., Pei, N., Li, A., Chen, X., et al. (2016). Adenovirus-Mediated Angiotensin II Type 2 Receptor Overexpression Inhibits Tumor Growth of Prostate Cancer In Vivo. *Journal of Cancer*, *7*, 184–191. doi:10.7150/jca.12841

- Li, S., Lu, H., Chang, A. Y. W., Huang, W., Lin, W., Lee, C., Tien, W., et al. (2016). Angiotensin II type I receptor ( AT1R ) is an independent prognosticator of esophageal squamous cell carcinoma and promotes cells proliferation via mTOR activation. *oncotarget*, 7(41).
- Li, Y., Li, X., & Yuan, H. (2012). Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2(1), 56–62. doi:10.3978/j.issn.2223-3652.2012.02.02
- Lobos-Gonzalez, L. (2013). E-cadherin synergizes with caveolin-1 in tumor suppression and blocks Caveolin-1 enhanced metastasis of melanoma cells. *pigment cell and research proof*, 24, 555–570.
- Lobos-Gonzalez, L., Aguilar-Guzmán, L., Fernandez, J. G., Muñoz, N., Hossain, M., Bieneck, S., Silva, V., et al. (2014). Caveolin-1 is a risk factor for postsurgery metastasis in preclinical melanoma models. *Melanoma research*, 24(2), 108–19. doi:10.1097/CMR.0000000000000046
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., & Goldstein, B. J. (2001). Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein- tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade \*, 276(24), 21938–21942. doi:10.1074/jbc.C100109200
- Maria Paz Ocaranza, Luis Michea, Mario Chiong, Carlos F. Lagos, S. L. and J. E. J. (2014). Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1–9) in the cardiovascular system. *Clinical Science*, 127, 549–557.
- Marmon, S., Hinchey, J., Oh, P., Cammer, M., Almeida, C. J. De, Gunther, L., Raine, C. S., et al. (2009). Caveolin-1 Expression Determines the Route of Neutrophil Extravasation through Skin Microvasculature. *The American journal of pathology*, 174(2), 684–692. doi:10.2353/ajpath.2009.080091
- Mcindoe, G., & Zealand, N. (2017). Renin-angiotensin system and cancer : A review. *Ingrative Cancer Science and Therapeutics*, 4(2), 1–6. doi:10.15761/ICST.1000231
- McKinney, C. A., Fattah, C., Loughrey, C. M., Milligan, G., & Nicklin, S. A. (2014). Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science*, 126(12), 815–827. doi:10.1042/CS20130436
- Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews. Cancer*, 6(6), 449–58. doi:10.1038/nrc1886
- Miura, S., Karnik, S. S., & Saku, K. (2005). Constitutively Active Homo-oligomeric Angiotensin II Type 2 Receptor Induces Cell Signaling Independent of Receptor Conformation and Ligand Stimulation \*. *The Journal of biological chemistry*, 280(18), 18237–18244. doi:10.1074/jbc.M500639200

- Molina, A., Velot, L., Ghouinem, L., Abdelkarim, M., Bouchet, B. P., Luissint, A.-C., Bouhlel, I., et al. (2013). ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer research*, *73*(9), 2905–15. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3565
- Monier, S., Dietzen, D. J., Hastings, W. R., Lublin, D. M., & Kurzchalia, T. V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS lett.*, *388*, 143–149.
- Munday, K. A., Brooks, D., Chapman, B., & Munday, K. (1978). The half-lives of angiotensin II, angiotensin II-amide, angiotensin III, Sar1-Ala8-angiotensin II and renin in the circulatory system of the rat. *Journal of physiology*, (278), 471–490.
- Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U. M., & Unger, T. (2014). AT 2 Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Current Hypertension Reports*, *16*(416). doi:10.1007/s11906-013-0416-6
- Navin, D., Hofschroer, V., Nielsen, N., Seidler, D. G., Schwab, A., & Stock, C. (2018). The Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Losartan Affects NHE1- Dependent Melanoma Cell Behavior. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *45*, 2560–2576. doi:10.1159/000488274
- Nemoto, S., Matsumoto, T., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2014). Relationships among protein tyrosine phosphatase 1B , angiotensin II , and insulin-mediated aortic responses in type 2 diabetic GotoKakizaki rats. *Atherosclerosis*, *233*(1), 64–71. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.032
- Nethe, M., Anthony, E. C., Fernandez-borja, M., Dee, R., Geerts, D., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M., et al. (2010). Focal-adhesion targeting links caveolin-1 to a Rac1-degradation pathway. *Journal of cell science*, *123*, 1948–1958. doi:10.1242/jcs.062919
- Nethe, M., & Hordijk, P. L. (2011). A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. *Cell Adhesion & Migration*, *5*(1), 59–64. doi:10.4161/cam.5.1.13702
- Nuñez-Wehinger, S., Ortiz, R. J., Díaz, N., Díaz, J., & Quest, A. F. G. (2014). Caveolin-1 in Cell Migration and Metastasis Caveolin-1 in Cell Migration and Metastasis. *Current Molecular Medicine*, *14*(January), 255–274. doi:10.2174/1566524014666140128112827
- Ortiz, R., Díaz, J., Díaz, N., & Lobos-gonzalez, L. (2016). Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *oncotarget*, *7*(26), 40571–40593.

- Paepe, B. De, Verstraeten, V. L. R. M., Potter, C. R. De, & Bullock, G. R. (2002). Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia , DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol*, 13–19. doi:10.1007/s00418-001-0356-0
- Palamidessi, A., Frittoli, E., Garré, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., et al. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*, 134(1), 135–47. doi:10.1016/j.cell.2008.05.034
- Paul, M., Mehr, A. L. I. P., & Kreutz, R. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*, (86), 747–803. doi:10.1152/physrev.00036.2005.
- Piastowska-Ciesielska, A. W., Kozłowski, M., Wagner, W., Domińska, K., & Ochędalski, T. (2013). Effect of an angiotensin II type 1 receptor blocker on caveolin-1 expression in prostate cancer cells. *Archives of medical science : AMS*, 9(4), 739–44. doi:10.5114/aoms.2012.30955
- Quest AF, Leyton L, P. M. (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol*, 82(1), 129–44.
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 13(12), 858–70. doi:10.1038/nrc3628
- Rhodes, D. R., Ateeq, B., Cao, Q., Tomlins, S. A., Mehra, R., & Laxman, B. (2009). AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan , an AGTR1 antagonist. *PNAS*, 106(25).
- Rodrigues-ferreira, S., Morel, M., Reis, R. I., Costa-neto, C. M., & Nahmias, C. (2012). A Novel Cellular Model to Study Angiotensin II AT2 Receptor Function in Breast Cancer Cells. *International Journal of Peptides*, 2012, 6. doi:10.1155/2012/745027
- Rodrigues-ferreira, S., & Nahmias, C. (2015). G-protein coupled receptors of the renin-angiotensin system : new targets against breast cancer ?, 6(February), 1–7. doi:10.3389/fphar.2015.00024
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process, 7. doi:10.1038/nrc2229
- Salsman, S. J., Hensley, K., & Floyd, R. A. (2005). Sensitivity of Protein Tyrosine Phosphatase Activity to the Redox Environment, Cytochrome c, and Microperoxidase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 1078–1088.
- Santhekadur, P. K., Akiel, M., Emdad, L., Gredler, R., Srivastava, J., Rajasekaran, D., Robertson, C. L., et al. (2014). Staphylococcal nuclease domain containing-1 (SND1) promotes migration and invasion via angiotensin II type 1 receptor

(AT1R) and TGF $\beta$  signaling. *FEBS Open Bio*, 4, 353–361. doi:10.1016/j.fob.2014.03.012

Santos RA, F. A. (2007). Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 16(2), 122–8.

Schnitzer, J. E. (2001). Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Advanced drug delivery reviews*, 49(3), 265–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551399>

Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E. J., Watanabe, O., Price, E., Roberts, R. L., Imboden, H., et al. (2003). A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *The EMBO journal*, 22(24), 6471–82. doi:10.1093/emboj/cdg637

Shin, J., Jo, H., & Park, H. (2006). Caveolin-1 is transiently dephosphorylated by shear stress-activated protein tyrosine phosphatase mu. *Biochemical and biophysical research communications*, 339, 737–741. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.077

Shit, K., & Shi, K. (2004). Protein-Tyrosine and Negatively Internalization Phosphatase 1B Associates Regulates Insulin Signaling with Insulin Receptor without Receptor, 96, 89–96. doi:10.1093/jb/mvh094

Small, J. V., & Rottner, K. (2010). *Elementary Cellular Processes Driven by Actin Assembly: Lamellipodia and Filopodia*. (Springer, Ed.) (pp. 3–33). In: Carlier M-F (ed.) Actin Based Motility: Cellular, Molecular and Physical Aspects. doi:10.1007/978-90-481-9301-1

Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., & Klemke, R. (2010). Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *Journal of cell science*, 2332–2341. doi:10.1242/jcs.069443

Suganuma, T., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., Nagasaka, T., Mizutani, S., & Kikkawa, F. (2005). Functional Expression of the Angiotensin II Type 1 Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its Blockade Therapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. *Cancer Therapy: Preclinical*, 11(7), 2686–2695.

Takeuchi, Y., Yamauchi, K., Nakamura, J., Shigematsu, S., & Hashizume, K. (2006). Angiotensin II regulates migration in mouse cultured mesangial cells: evidence for the presence of receptor subtype-specific regulation. *The Journal of endocrinology*, 191(2), 361–7. doi:10.1677/joe.1.06860

Torres, V. A., Mielgo, A., Barbero, S., Hsiao, R., Wilkins, J. A., & Stupack, D. G. (2010). Rab5 Mediates Caspase-8 – promoted Cell Motility and Metastasis, 21, 369–376. doi:10.1091/mbc.E09

- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 1263–1273.
- Tsvetanova, N. G., & Irannejad, R. (2015). G Protein-coupled Receptor ( GPCR ) Signaling via Heterotrimeric G Proteins from Endosomes \*. *The Journal of biological chemistry*, 290(11), 6689–6696. doi:10.1074/jbc.R114.617951
- Um, S., & Henz, B. M. (2004). Human skin : source of and target organ for angiotensin II. *Experimental Dermatology*, 13, 148–154.
- Urra, H., Torres, V. a, Ortiz, R. J., Lobos, L., Díaz, M. I., Díaz, N., Härtel, S., et al. (2012). Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PloS one*, 7(4), e33085. doi:10.1371/journal.pone.0033085
- Wegman-Ostrosky, T., Soto-Reyes, E., Vidal-Millán, S., & Sánchez-Corona, J. (2013). The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. doi:10.1177/1470320313496858
- Williams, T. M., & Lisanti, M. P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation , cancer , and metastasis. *The American Physiological Society*, (288), 494–506. doi:10.1152/ajpcell.00458.2004.
- Wozniak, M. a, Modzelewska, K., Kwong, L., & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta*, 1692(2-3), 103–19. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.04.007
- Wu, H., Deng, R., Chen, X., Wong, W. C., Chen, H., Gao, X. L., Nie, Y., et al. (2016). Caveolin-1 Is Critical for Lymphocyte Trafficking into Encephalomyelitis. *The journal of Neuroscience*, 36(19), 5193–5199. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-15.2016
- Wyckoff, J. B., Jones, J. G., Condeelis, J. S., & Segall, J. E. (2000). A Critical Step in Metastasis : In Vivo Analysis of Intravasation at the. *Cancer research*, (60), 2504–2511.
- Wyse, B. D., Prior, I. a, Qian, H., Morrow, I. C., Nixon, S., Muncke, C., Kurzchalia, T. V, et al. (2003). Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 23738–46. doi:10.1074/jbc.M212892200
- Xueqiang D. (2012). Down-regulation of tumor suppressor MTUS1/ATIP is associated with enhanced proliferation, poor differentiation and poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. *molecular oncology*, 6(1), 73–80. doi:10.1016/j.molonc.2011.11.002.Down-regulation

- Yamaguchi, H., Takeo, Y., Yoshida, S., Kouchi, Z., Nakamura, Y., & Fukami, K. (2009). Lipid Rafts and Caveolin-1 Are Required for Invadopodia Formation and Extracellular Matrix Degradation by Human Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 69(22), 8594–8603. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2305
- Yu, L., Hui-chen, F., Chen, Y., Zou, R., Yan, S., Chun-xiang, L., Wu-ru, W., et al. (1999). Differential expression of RAB5A in human lung adenocarcinoma cells with different metastasis potential. *Clinical & Experimental Metastasis*, 213–219.
- Yu, L., Shao, C., & Gao, L. (2014). Developmental expression patterns for angiotensin receptors in mouse skin and brain. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAASRenin*, 15, 139–149. doi:10.1177/1470320312467557
- Zhang, X., Dong, C., Wu, Q. J., Balch, W. E., & Wu, G. (2011). Di-acidic Motifs in the Membrane-distal C Termini Modulate the Transport of Angiotensin II Receptors from the Endoplasmic Reticulum to the Cell Surface \*. *The Journal of biological chemistry*, 286(23), 20525–20535. doi:10.1074/jbc.M111.222034
- Zhao<sup>1</sup>, Y., Wang<sup>2</sup>, H., Li, X., Cao, M., Lu, H., Meng<sup>1</sup>, Q., Pang, H., et al. (2014). Ang II-AT1R increases cell migration through PI3K/AKT and NF-κB pathways in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 229(11), 1855–1862.
- Zhu, G., Fan, Z., Ding, M., Zhang, H., Mu, L., Ding, Y., Zhang, Y., et al. (2015). An EGFR/PI3K/AKT axis promotes accumulation of the Rac1-GEF Tiam1 that is critical in EGFR-driven tumorigenesis. *Oncogene*, (August 2014), 1–12. doi:10.1038/onc.2015.45