



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“LA SECRECIÓN DE FACTORES QUIMIOTÁCTICOS
PROMOVIDA POR EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO
ES REGULADA POR LA GTPASA RAB27B”**

TESIS

Que Presenta

M. en C. Cesar Zavala Barrera

Para obtener el grado de

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

**Directora de tesis:
Dra. Guadalupe Reyes Cruz.**

México, CDMX.

OCTUBRE, 2021

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con numero de CVU 555303 y fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Doctora Guadalupe Reyes Cruz y apoyado por el proyecto de CONACyT 1794.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
AGRADECIMIENTOS	4
<i>A mi tutor y asesores</i>	<i>4</i>
<i>A mis padres y hermanos</i>	<i>4</i>
<i>A mis amigos y compañeros</i>	<i>4</i>
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	7
ANGIOGÉNESIS.....	7
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRS).....	9
<i>Receptor Sensor de Calcio (CaSR)</i>	<i>11</i>
<i>CaSR en enfermedad y cáncer</i>	<i>13</i>
.....	15
<i>CaSR y Secreción</i>	<i>16</i>
GTPASAS RAB.....	17
<i>Activación de las Rabs GTPasas</i>	<i>18</i>
<i>Rabs Secretorias</i>	<i>19</i>
<i>Rabs en cáncer</i>	<i>19</i>
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
METODOLOGÍA.....	22
<i>Líneas celulares</i>	<i>22</i>
<i>Secreción de factores quimiotácticos</i>	<i>23</i>
<i>Activación de Rab27B</i>	<i>24</i>
<i>Western blot</i>	<i>25</i>
<i>Análisis estadístico</i>	<i>27</i>
RESULTADOS	27
LA SECRECIÓN DE FACTORES QUIMIOTÁCTICOS PROMOVIDA POR EL CASR ES DEPENDIENTE DE RAB27B.....	27
LA SECRECIÓN DE CITOCINAS DEPENDE DE LA PARTICIPACIÓN DE RAB27B.....	30
EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB27B.....	33
LA ACTIVACIÓN DE RAB27B INVOLUCRA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE PKA Y PI3K-AKT.....	36
LA EXPRESIÓN DE RAB27B ES REGULADA POR EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO.....	39
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

AGRADECIMIENTOS

A mí tutor y asesores

Deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis doctoral, Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al departamento y a su laboratorio.

A mis asesores les agradezco todos sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo de tesis.

A mis padres y hermanos

Ustedes han sido siempre el motor que impulsa mis sueños, quienes estuvieron siempre a mi lado. Siempre han sido mis mejores guías de vida. Hoy cuando concluyo mis estudios de doctorado, les dedico a ustedes este logro, como una meta más conquistada.

“Gracias por ser quienes son y por creer en mí”

A mis amigos y compañeros

Mis amigos y compañeros, hoy culmina esta maravillosa aventura y no puedo dejar de recordar cuantas tardes y horas dentro y fuera del laboratorio nos juntamos a lo largo de nuestra formación. Hoy se cierra un capítulo maravilloso en esta historia de vida y no puedo dejar de agradecerles por su apoyo y constancia.

RESUMEN

Los factores quimiotácticos y angiogénicos secretados dentro del microambiente tumoral facilitan la diseminación metastásica de las células cancerosas. El receptor sensor de calcio (CaSR) activa las vías secretoras en las células de cáncer de mama a través de un mecanismo promovido por el tráfico vesicular de este receptor. Sin embargo, queda por elucidar el mecanismo molecular de cómo el CaSR controla a las proteínas asociadas a las vesículas secretoras. En el presente estudio, demostramos que el CaSR promueve la expresión y activación de la GTPasa secretora Rab27B a través de la activación de PI3K, PKA, mTOR y MADD, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, también conocido como DENN/MADD/Rab3GEP. Además, demostramos que la Rab27B activa conduce a la secreción de diferentes citocinas, como IL-6, IL-1 β e IL-8. Por otro lado, la expresión de Rab27B es regulada por el CaSR en células de cáncer epitelial de mama MDA-MB-231. Nuestros hallazgos brindan información valiosa sobre cómo el receptor sensor de calcio participa en la activación de un mecanismo dependiente de Rab27B para controlar la secreción de factores que intervienen en los circuitos de comunicación celular paracrina dentro del microambiente tumoral.

ABSTRACT

Chemotactic and angiogenic factors secreted within the tumor microenvironment facilitate the metastatic spread of cancer cells. The calcium sensing receptor (CaSR) activates secretory pathways in breast cancer cells through a mechanism promoted by vesicular trafficking of this receptor. However, it remains to be elucidated how CaSR controls vesicles secretory proteins. In the present study, we demonstrate that CaSR promotes the expression of Rab27B and activates this secretory GTPase through the activation of PI3K, PKA, mTOR and MADD, a guanine nucleotide exchange factor, also known as DENN/MADD/ Rab3GEP. On the other hand, the active Rab27B leads to the secretion of different cytokines, including IL-6, IL-1 β and IL-8. Furthermore, the expression of Rab27B is regulated by the CaSR in MDA-MB-231 breast epithelial cancer cells. Our findings provide valuable information on how the calcium sensing receptor participates in the activation of a Rab27B-dependent mechanism that controls the secretion of factors involved in paracrine cell communication profile within the tumor microenvironment.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad heterogénea y dinámica con múltiples componentes moleculares, que se ha constituido como una de las principales causas de muerte en el mundo. En los últimos 50 años, los investigadores se han esforzado en identificar algunos principios comunes de este padecimiento. Varios modelos han sido propuestos para explicar que la transformación de una célula normal en una célula cancerosa se debe a la activación de oncogenes, pérdida del reloj biológico vía la telomerasa, así como capacidades obtenidas durante el desarrollo de un tumor como la capacidad de mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión celular y la metástasis, además de otras características que favorecen la progresión de un tumor como la inflamación e inestabilidad genómica. Esta acumulación de cambios en las células tumorales que han adquirido ventajas de crecimiento e invasión les permite expandirse hacia otros tejidos distintos al suyo (Hanahan and Weinberg, 2011; Moses et al., 2018). Además de los cambios genéticos y de propagación durante la transformación tumoral, se requiere de un proceso en particular que les permita a los tumores expandirse y colonizar otros tejidos; este proceso se denomina angiogénesis, que permite la inducción y formación de unos nuevos vasos sanguíneos que facilita a los tumores crecer y propagarse a otros tejidos. (Polverini, 2002).

Angiogénesis

Como en los tejidos normales, las células malignas requieren oxígeno y nutrientes para sobrevivir y proliferar y, por lo tanto, deben residir muy cerca de los vasos sanguíneos para acceder al sistema circulatorio. La inducción de nuevos vasos sanguíneos está regulada por una gran cantidad de factores angiogénicos. Cuando los factores angiogénicos y antiangiogénicos están en equilibrio, la vasculatura se encuentra inactiva y las células endoteliales no pueden proliferar. Esto cambia cuando la señalización proangiogénica domina, dando paso a un proceso que en los tumores se ha denominado *switch* angiogénico. Hasta ahora el modelo clásico de inducción angiogénica se ha basado en la regulación y

balance de las moléculas que promueven este proceso (Bergers and Benjamin, 2003) (**Figura 1**). El *switch* angiogénico se desencadena por alteraciones genéticas en las células tumorales que conducen a una mayor proliferación celular e induce la hipoxia o la expresión de factores proangiogénicos. El hecho de que los tumores sean dependientes de un suministro sanguíneo ha estimulado a investigadores a buscar y diseñar estrategias antiangiogénicas para poder tratar el cáncer (Carmeliet, 2003).

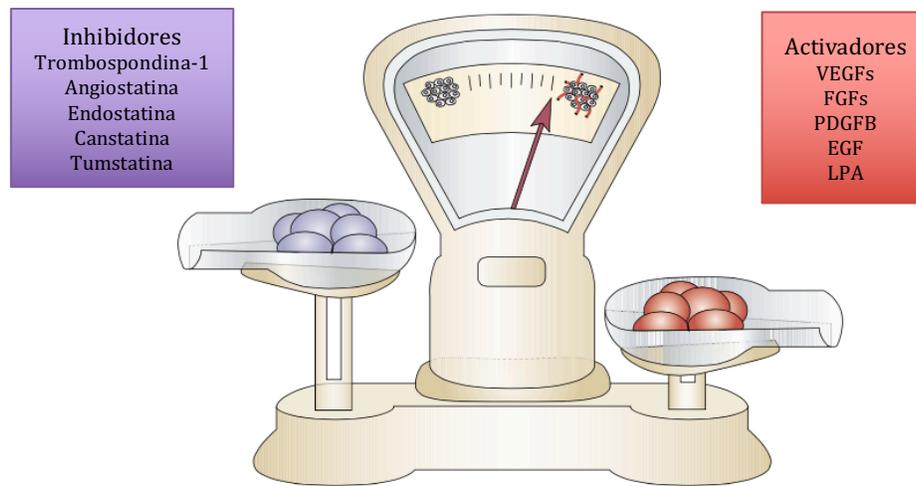


Figura 1. Balance angiogénico. La angiogénesis es regulada por una variedad de activadores e inhibidores. Tomada y modificada de Bergers and Benjamin, 2003.

El proceso angiogénico difiere de la angiogénesis tumoral. El proceso normal de formación de nuevos vasos es detenido en cierto punto por la secreción de factores angiostáticos; por el contrario, en un tumor la angiogénesis se lleva de manera continua. Además, la vasculatura del tumor tiene características morfológicas atípicas y se caracteriza por tener vasos sanguíneos dilatados, tortuosos y desorganizados. Esta desorganización en la vasculatura permite que exista una permeabilidad excesiva y un aumento de la hipoxia (Gacche, 2015; Viallard and Larrivé, 2017). Por otra parte, dentro de los factores angiogénicos capaces de activar a células endoteliales se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los cuales tienen la capacidad de inducir la secreción de DLL4 (ligando tipo Delta-4). El DLL4 secretado por las células endoteliales activa la señalización de las células endoteliales vecinas induciendo la expresión de VEGFR1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial

vascular); de esta manera, las células endoteliales adquieren fenotipos más móviles e invasivos, secretando proteínas que degradan la matriz extracelular y guían la formación de nuevos vasos sanguíneos hacia el gradiente de VEGF. Así, la degradación de la membrana basal le permite a las células endoteliales migrar, proliferar y eventualmente diferenciarse para formar nuevos vasos sanguíneos finalmente, cuando las células están diferenciadas pueden alojarse en una nueva membrana basal para poder secretar nuevos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual atrae a células que van a ayudar con el soporte y estabilización de nuevos vasos (Farnsworth et al., 2014; Lugano et al., 2020; Viallard and Larrivé, 2017). Por otro lado, se ha descrito que la secreción de estos factores es regulada por receptores de membrana dentro de los cuales los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) juegan un papel relevante.

Receptores Acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) comprenden una gran familia de proteínas de membrana que llevan a cabo procesos de señalización celular y son blancos importantes de fármacos y medicamentos (Lappano and Maggiolini, 2011). Constituyen una gran familia de receptores con más de 800 miembros (Nieto Gutierrez and McDonald, 2018). Los GPCRs humanos se pueden clasificar en cinco familias principales de receptores: rodopsina, secretina, glutamato, adhesión y *frizzled* (Fan et al., 2017). Los GPCRs median la señalización de la percepción sensorial, quimiotaxis, neurotransmisión, comunicación celular, los sentidos de la vista, el olfato, el gusto y muchos otros eventos vitales (George et al., 2002; Lappano and Maggiolini, 2011). Este tipo de receptores responde a una gran variedad de ligandos como aminas biogénicas, iones, lípidos, péptidos, proteínas y luz (Wooten et al., 2018). Todos los GPCRs comparten una estructura conservada que está compuesta por una parte extracelular (amino terminal extracelular, N-Terminal), un dominio transmembranal de siete hélices y una parte que sirve como sitio de unión para las proteínas G (carboxilo terminal, C-Terminal).

La activación de los GPCRs está mediada por un cambio conformacional en los pases transmembranales estabilizada por la unión de ligandos extracelulares; cuando estos se unen

al lado extracelular o dominios transmembranales de un GPCR, favorecen los cambios estructurales que permiten que las proteínas G se unan a la interfaz intracelular de un GPCR. Este mecanismo de control es muy complejo: por ejemplo, ligandos elegidos apropiadamente pueden estimular diferentes vías de señalización intracelular de forma independiente a través de un solo GPCR, y por otro lado existen GPCRs que poseen múltiples sitios de unión a ligando que influyen en la señalización intracelular de distintas formas (Bockaert and Pin, 1999; Bouvier, 2013; Latorraca et al., 2017; Leioatts et al., 2014; Manglik and Kruse, 2017; Moreira, 2014). Cuando los GPCRs son activados por el ligando apropiado, estos interactúan con las proteínas G y estas son responsables de un efecto particular sobre una vía de señalización intracelular (Bouvier, 2013).

Las proteínas heterotriméricas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) transmiten directamente las señales de los GPCRs, funcionan como interruptores moleculares y su actividad biológica es determinada por el nucleótido unido. Las proteínas G están compuestas por subunidades α , β y γ (Kostenis et al., 2020; Neer, 1994). La subunidad α de las proteínas G se inserta en la parte interna de la membrana principalmente por grupos miristoil o palmitoil y la subunidad γ lo hace por medio de un grupo frenilo (Syrovatkina et al., 2016). Las subunidades β y γ están estrechamente asociadas y pueden considerarse como una unidad funcional. La unión del ligando a un GPCR induce la disociación de $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$ dando como resultado dos subunidades funcionales ($G\alpha$ y $G\beta\gamma$) (Kostenis et al., 2020; Syrovatkina et al., 2016). Tanto las subunidades $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ pueden activar diversas vías celulares. (Iiri et al., 1998; Jones et al., 1990). La subunidad α activa interactúa con efectores como la adenilato ciclasa y fosfolipasas; de forma similar, el complejo $\beta\gamma$ interactúa con diferentes proteínas efectoras (Neer, 1994). Los efectores con los que interactúan las proteínas G dependen del tipo de subunidad $G\alpha$ ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$) con el que interactúan (Tsvetanova et al., 2015). Cuando, la señalización de la subunidad $G\alpha$ es finalizada por la actividad GTPasa intrínseca de $G\alpha$ que lleva a hidrolizar el GTP unido convirtiéndolo en GDP. Este proceso de hidrólisis es acelerado por las proteínas que activan las GTPasas (GAPs); estas se unen a $G\alpha$ y aceleran la actividad GTPasa que es intrínsecamente baja. Por otro lado, la señalización de $G\beta\gamma$ se termina cuando se asocia de nuevo con $G\alpha$ inactiva (Syrovatkina et al., 2016).

Existe una promiscuidad en cuanto al acople de los GPCRs con las proteínas G, ya que pueden activar distintos tipos de proteínas G, lo cual ha sido observado en algunos casos de padecimientos patológicos como el cáncer (Dorsam and Gutkind, 2007). De esta manera los GPCRs están involucrados en una gran serie de eventos celulares como proliferación celular, regeneración de tejidos, inflamación, angiogénesis y crecimiento normal celular (Lappano and Maggiolini, 2011). Sin embargo el descubrimiento del oncogén *MAS*, el cual codifica un GPCR, provee un vínculo directo entre la transformación celular maligna y los GPCRs (Dorsam and Gutkind, 2007; Tsvetanova et al., 2015). La sobreexpresión de algunos GPCRs favorece la proliferación de células cancerígenas, contribuyendo al crecimiento tumoral. Por ejemplo, el receptor activado por proteasas (PARs), receptores de quimiocinas y receptores para lípidos bioactivos como LPA. Además, la secreción de péptidos vía paracrina o autocrina promueve la proliferación celular y conlleva a que algunos tipos de cáncer humanos sean muy agresivos (Lappano and Maggiolini, 2011; O'Hayre et al., 2013). Por otro lado, se ha descrito que un GPCR que se sobreexpresa en cáncer participa en procesos de secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos que podrían estar regulando de manera favorable la progresión tumoral; éste es el Receptor sensor de calcio (CaSR) (Brennan et al., 2013; Hernández-Bedolla et al., 2015).

Receptor Sensor de Calcio (CaSR)

El receptor sensor de calcio (CaSR) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que se identificó por primera vez debido a su capacidad para regular la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) en respuesta a calcio (Ca^{2+}) (Brown et al., 1993). Este receptor se encarga de mantener constantes los niveles de Ca^{2+} que un organismo necesita para su correcto funcionamiento celular (Hofer and Brown, 2003). El CaSR pertenece a la familia de receptores de glutamato, que también incluye receptores GABA, receptores gustativos y receptores de feromonas (Brown, 2013). El CaSR es una proteína compuesta de 1078 aminoácidos, con un gran dominio extracelular de 612 aminoácidos que forma dos lóbulos que adoptan una conformación de Venus atrapamoscas (VFT), seguido por 250 aa que forman su dominio transmembranal de 7 α -hélices y finalmente, por 216 aa en su C-terminal. Tras la unión del agonista, la hendidura abierta del VFT se cierra y esto induce cambios

conformacionales en los otros dominios con lo cual inicia la transducción de señales (Vanhouten and Wysolmerski, 2013). El CaSR está altamente glicosilado y reside en la superficie celular como un dímero vinculado por puentes bisulfuro formado por cisteínas de cada monómero (Hu and Spiegel, 2007). El amino terminal del CaSR en su forma de monómero asume una estructura bilobada tipo atrapamoscas; dentro de esta estructura existe una cooperación positiva de varios sitios de unión para Ca^{2+} en estado activo, por cada monómero (Gao et al., 2021; Geng et al., 2016b; Huang et al., 2009). En la clínica existen moduladores alostéricos positivos (calcimiméticos) y moduladores negativos (calcilíticos) que sensibilizan o inhiben, la respuesta del receptor al Ca^{2+} . Estos moduladores se unen en la parte transmembranal del receptor a través de mecanismos aun desconocidos (Petrel et al., 2004) (**Figura 2**).

La actividad del CaSR es regulada por otros moduladores alostéricos endógenos, sintéticos, pH, fuerza iónica y responde a una gran variedad de ligandos, incluyendo los cationes divalentes Mg^{2+} y Sr^{2+} , trivalentes como el La^{3+} y Gd^{3+} , y policationes orgánicos como poli-L-lisina, poli-L-arginina y neomicina (Geng et al., 2016b). A estos agonistas se les conoce como agonistas tipo 1 ya que activan directamente al receptor sin la necesidad de calcio. Por otra parte, los L-aminoácidos como L-Phe y L-Trp aumentan la sensibilidad de CaSR hacia calcio y se les considera moduladores alostéricos positivos del CaSR (Geng et al., 2016b; Ray, 2015). A estos agonistas se les conoce como agonistas tipo 2 ya que son los que necesitan que el calcio esté presente para poder activar al receptor (Conigrave and Ward, 2013). A pesar de su promiscuidad farmacológica, el CaSR juega un papel fundamental en la homeostasis del calcio y es capaz de detectar concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Breitwieser, 2013; Conigrave and Ward, 2013; Gao et al., 2021). El receptor esta típicamente inactivo a concentraciones bajas de Ca^{2+} (0.2 mM) y se activa por arriba de la concentración de 0.5 mM, dependiendo del contexto celular y el nivel de expresión (Conigrave and Ward, 2013).

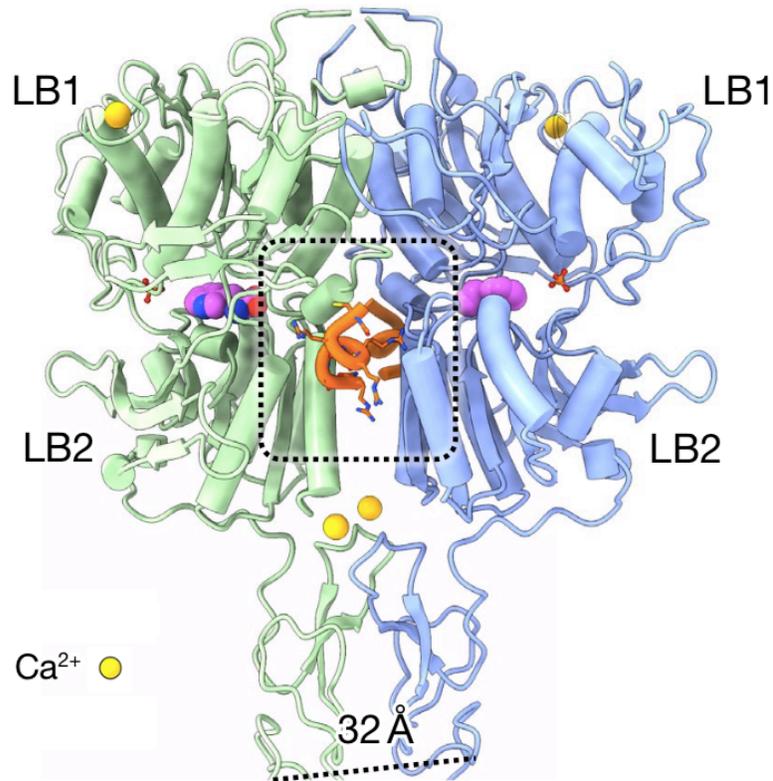


Figura 2. Dominio extracelular del CaSR. Se destaca la estructura dimérica del dominio extracelular, asumiendo la estructura tipo atrapamoscas en cada monómero, se marcan los sitios de unión del Ca^{2+} entre los dos lóbulos en estado activo del CaSR. Tomado y modificado de Gao et al, 2021.

Se ha descrito que el CaSR interactúa con diversas proteínas G; canónicamente se une a $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, $G_{12/13}$ y en sólo algunas condiciones patológicas a G_s . Este acople a las proteínas G determina la vía de señalización que el receptor va a activar río abajo (Conigrave and Ward, 2013) (**Figura 3**).

CaSR en enfermedad y cáncer

Algunos de los principales padecimientos relacionados al receptor sensor de calcio y son causados por mutaciones en el gen *CASR* que codifica a este receptor; estos trastornos están directamente relacionados a la homeostasis del calcio (Hannan et al., 2018). Las patologías en la cuales la homeostasis del calcio se ve afectada son la hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) y el hiperparatiroidismo severo neonatal (NSHPT) (Hannan and Thakker, 2013; Hannan et al., 2018). Además, se han encontrado mutaciones de ganancia de función en hipocalcemia autosómica dominante (ADH) y el síndrome de Bartter tipo V (Hannan et

al., 2018). También se han descrito enfermedades autoinmunes del CaSR debido a la presencia de anticuerpos anti-CaSR (Vahe et al., 2017). Estos pueden tener efectos estimulantes sobre el CaSR o pueden bloquear la actividad del CaSR, causando hipoparatiroidismo autoinmune o hipercalcemia hipocalciúrica autoinmune, respectivamente (Chattopadhyay, 2006; Endres, 2012; Vahe et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito que en cáncer el CaSR tiene un gran número de mutaciones (Brennan et al., 2013). A pesar de esto, ninguna mutación se ha relacionado de manera directa con algún tipo de cáncer. Sin embargo, se ha descrito que su sobreexpresión y su función alterada contribuyen a la progresión tumoral (Brennan et al., 2013; O’Hayre et al., 2013). En algunos tipos de cáncer, el CaSR actúa como un oncogén como por ejemplo en cáncer de ovario, próstata, testículo (Brennan et al., 2013; Saidak et al., 2009). También, se ha visto que participa en el desarrollo de tumores malignos como adenomas de paratiroides, cáncer de mama, próstata, cáncer de colon y cáncer de ovario (Saidak et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que el CaSR en tumores de mama, está sobreexpresado, y participa en la secreción del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP), conllevando a un mayor riesgo de metástasis al hueso (Chattopadhyay, 2006; Kozlow and Guise, 2005).

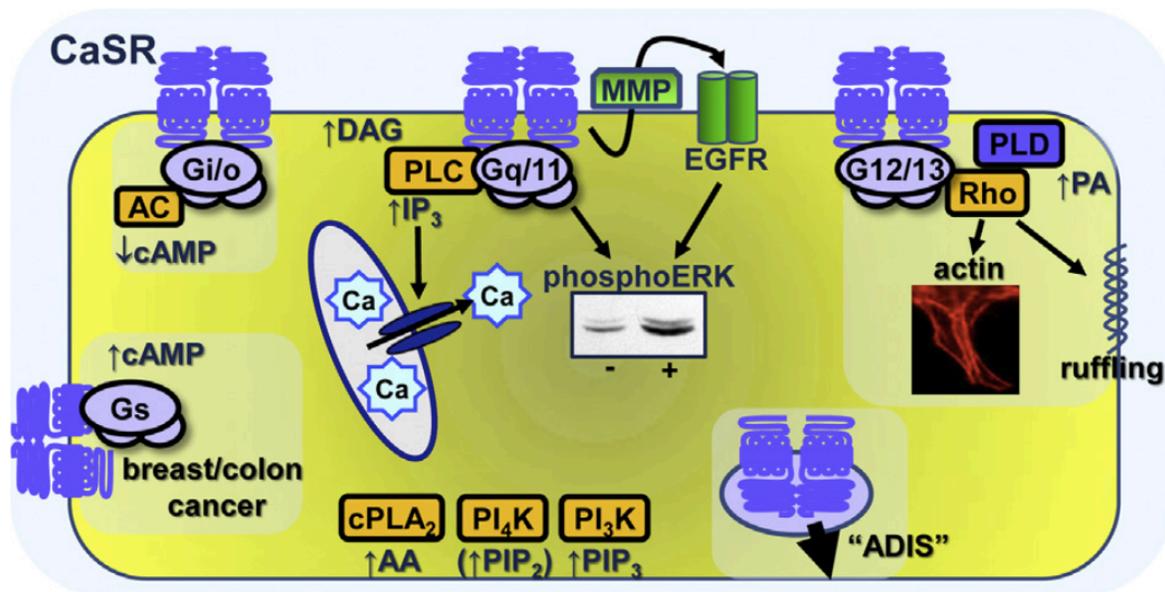


Figura 3. Representación de las vías de señalización desencadenadas por el CaSR. El receptor interactúa principalmente con tres principales subfamilias de proteínas G con la excepción de una interacción atípica con la proteína G_s en ciertos tipos de cáncer. Existe un proceso denominado ADIS (señalización

insercional dirigida por agonista) en el cual el receptor al estar activado dirige su propio tráfico a membrana plasmática. Tomado de Conigrave et al. 2013.

La metástasis a hueso se ha visto frecuentemente en pacientes con ciertas formas de cáncer, como cáncer de mama (Chattopadhyay, 2006). El hueso es un órgano muy atractivo debido a que tiene una gran cantidad de propiedades bioquímicas y físicas que lo hacen ideal para el crecimiento de tumores. Este nicho metastásico es el mayor depósito de calcio en el organismo, también es un sitio de almacenamiento de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor derivado de plaquetas (PDGF) (Käkönen et al., 2002). Existen dos tipos de metástasis a hueso, una osteoblástica y otra osteolítica (Chirgwin et al., 2004). Los dos tipos de metástasis se han visto en cáncer de mama (Guise et al., 2005). En la metástasis osteolítica el calcio junto con el TGF- β , juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión tumoral, induciendo tanto la expresión como la secreción de PTHrP en las células tumorales de mama. Este factor es conocido como inductor de la resorción de hueso. Además, se ha descrito que promueve un ciclo vicioso iniciado por las células de cáncer de mama y se agrava por la señalización del CaSR (Das et al., 2020; Guise et al., 2005; Kozlow and Guise, 2005) (**Figura 4**).

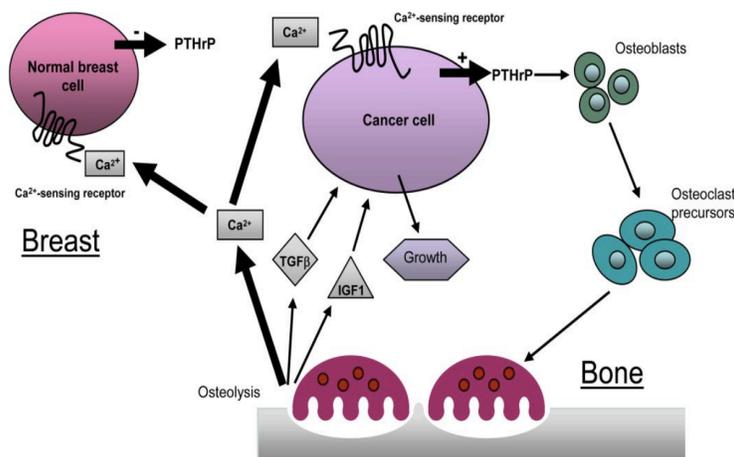


Figura 4. Representación esquemática del ciclo vicioso entre células tumorales de mama y el hueso. Tomada de Saidak, *et al.* 2009.

CaSR y Secreción

El CaSR está altamente expresado en la glándula paratiroides y en el riñón, donde actúa como el principal regulador de la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) en respuesta a cambios en las concentraciones de calcio (Brown, 2013). Por lo tanto, es de vital importancia en la regulación apropiada de la homeostasis del calcio y hueso. Sin embargo, su función no está limitada a la regulación homeostática de la secreción de PTH. También regula procesos celulares como proliferación, diferenciación y transporte de iones (Vanhouten and Wysolmerski, 2013). Regula la secreción del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) en respuesta a cambios en las concentraciones de calcio en varios tipos celulares, tales como astrocitos, células ováricas epiteliales, osteoblastos, células de cáncer de próstata, células HEK-293 transfectadas con el CaSR, y células de cáncer de mama (Chattopadhyay, 2006). Además, también se ha visto que regula la secreción de otros péptidos como gastrina en células G gástricas (Feng et al., 2010), wnt5a, BMP-2 en miofibroblastos de colon y colecistoquinina en células duodenales (MacLeod, 2013; Pacheco and MacLeod, 2008).

En 2007 nuestro grupo reportó que la secreción de PTHrP está vinculada al tráfico vesicular del CaSR; esta secreción se inhibe al interrumpir el reciclamiento lento del receptor usando una mutante dominante negativa de la proteína Rab11 (S25N), de esta manera se concluyó que la secreción de PTHrP está directamente ligada a la endocitosis del CaSR (Reyes-Ibarra et al., 2007). Por otro lado, en 2015 se reportó que en la línea celular metastásica de cáncer de mama MDA-MB-231 el CaSR regula la secreción de algunos factores de crecimiento como el EGF, dependiendo directamente de su activación y, por otro lado, algunos factores como la IL-6 son secretados de manera constitutiva (Hernández-Bedolla et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo involucrado en la secreción regulada por el receptor sensor de calcio (CaSR) aún no se ha dilucidado del todo.

GTPasas Rab

Las proteínas Rab son proteínas monoméricas pequeñas (21-25 kDa) de unión a GTP y forman la rama más grande de la superfamilia de Ras (Bhuin and Roy, 2014; Pereira-Leal and Seabra, 2000). Son conservadas y se encuentran en organismos que van desde levaduras hasta los seres humanos. A la fecha, en los seres humanos se han reportado 70 diferentes proteínas Rab (Pfeffer, 2017). Estas proteínas se han implicado en diversas funciones celulares como el crecimiento, el tráfico de proteínas, la secreción de proteínas, la transducción de señales, el direccionamiento y la fusión de organelos a la membrana (Bhuin and Roy, 2014). Las Rabs se encuentran en el citoplasma celular y son capaces de asociarse a diferentes organelos, así como a vesículas de transporte (Fukuda, 2008; Pereira-Leal and Seabra, 2000; Stenmark, 2009). Las proteínas Rab, después de su síntesis, son modificadas postraduccionalmente por lípidos que implican la unión de un grupo geranyl-geranilo en el carboxilo-terminal, la cual es crucial para su correcto funcionamiento. Después de la síntesis, las proteínas Rab forman un complejo al asociarse con la proteína escort de Rab (REP) (Hutagalung and Novick, 2011). Este complejo funciona como sustrato para la enzima de Rab-geranylgeranyltransferasa (Rab-GGT) y se somete a una doble prenilación en sus motivos de cisteína en el carboxilo terminal. La proteína Rab geranylgeranilada se asocia con REP, que lleva a la GTPasa a un organelo específico o vesícula de transporte. Las GTPasas Rabs asociadas a REP están inactivas unidas a GDP y están listas para que sean activadas, en el sitio blanco, por la participación de una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) (Stenmark, 2009). Entonces, la Rab intercambia el GDP por GTP y ahora se convierte en una Rab activa que permite la disociación de REP para así poder llevar a cabo su función biológica (Bhuin and Roy, 2014; Stenmark, 2009).

Activación de las Rabs GTPasas

Para poder llevar a cabo sus procesos de activación e inactivación, las proteínas Rabs necesitan la cooperación de otras proteínas conocidas como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y a las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs), respectivamente (Stenmark, 2009)(**Figura 5**). A pesar del gran número de Rabs, muy pocos GEFs y GAPs han sido identificados para las Rab27. Por citar algunos ejemplos, MADD/DENN/Rab3GEP un GEF para Rab27 posee un dominio DENN y se expresa diferencialmente en células normales y células neoplásicas; además, se ha reportado que está presente en endosomas (Levivier et al., 2001). Por otro lado, se sabe que los GAPs de las proteínas Rab27 comparten el dominio común TBC1 (Tre-2 / Bub2 / Cdc16) (Barr y Lambright, 2010, Marat et al., 2011). EPI64B (TBC1D10B) es el GAP para Rab27B (Gallo et al., 2014; Hou et al., 2013). Sin embargo, existen muy pocos estudios enfocados sobre el mecanismo de activación de las proteínas Rabs; a la fecha sólo se ha demostrado que el receptor para la angiotensina II promueve la unión de GTP a Rab5a (Seachrist et al., 2002). Este estudio mostró por primera vez que un GPCR puede controlar la actividad de una proteína Rab por una interacción directa entre el receptor y la GTPasa (Seachrist et al., 2002). Por otro lado, cabe resaltar que este estudio de activación de Rabs fue para Rab5, quien regula eventos de endocitosis.

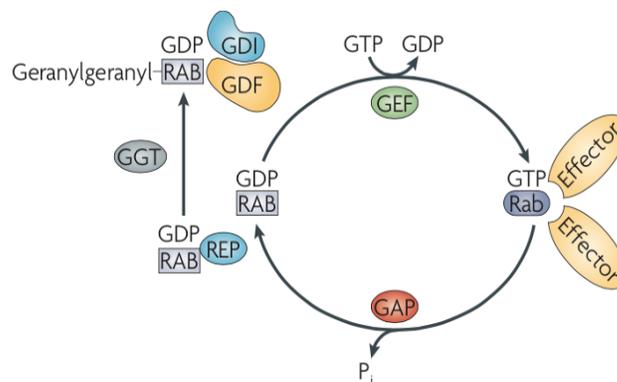


Figura 5. Ciclo de activación de las proteínas Rab. El ciclo comienza con la activación de una Rab inactiva unida a GDP, con la ayuda de un GEF intercambia GDP por GTP para poder llevar a cabo su función biológica mediante la interacción con efectores. Cuando termina su función ésta es desactivada por la

ayuda de una proteína que activa su propiedad de GTPasa (GAP), liberando un fosfato inorgánico y llevando a la Rab a su estado inactivo de nuevo. Tomado de (Stenmark, 2009).

Rabs Secretorias

La expresión de las proteínas Rab varía dependiendo del tipo celular (Fukuda, 2008). Estas proteínas pueden tener papeles únicos dentro del tipo celular o tejido en el que se encuentren. Estudios en las vías secretorias en donde vesículas de secreción se anclan y fusionan a membrana plasmática se han limitado a isoformas específicas de proteínas Rabs, como por ejemplo la Rab3 (Handley et al., 2007). Aunque existe evidencia de que también algunas otras Rabs están asociadas a vesículas de secreción como la Rab27, que es la proteína con mayor similitud en su secuencia génica y de aminoácidos a Rab3 en el árbol filogenético (Fukuda, 2013). Las Rabs que controlan la secreción son nombradas como Rabs secretorias. Se han descrito distintas Rabs secretorias con sus isoformas correspondientes como, por ejemplo, Rab3 (A/B/C/D), Rab26, Rab27 (A y B) y Rab37; estas proteínas se encuentran principalmente en vesículas secretorias maduras. La Rab3 y la Rab27 están alojadas sobre vesículas neuronales, endocrinas, exocrinas y vesículas de secreción en células inmunes, mientras que Rab26 y Rab37 están presentes sobre vesículas de tipos celulares especializados, como células del páncreas y mastocitos, respectivamente. Las Rabs se han visto involucradas en la secreción de una gran variedad de proteínas y neurotransmisores y ciertas isoformas se han visto involucradas en padecimientos como el cáncer (Fukuda, 2013; Pavlos et al., 2005). Sin embargo, aún se desconoce si algún GPCR tiene la capacidad de activar alguna Rab involucrada en secreción.

Rabs en cáncer

La expresión aberrante de las GTPasas de Rab a menudo se asocia con el cáncer, especialmente para las Rabs involucradas en la endocitosis y la secreción de moléculas necesarias para la migración y metástasis celular, la señalización y la división celular (Krishnan et al., 2020). Por ejemplo, Rab5 se sobreexpresa en células altamente proliferativas y metastásicas (Zhang et al., 2017). Su sobreexpresión induce la proliferación e invasión celular al participar en la activación de la vía de señalización de la cinasa de adhesión focal

(FAK) en el carcinoma hepatocelular. Por otro lado, participa en la regulación de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) en el cáncer oral (Geng et al., 2016a; Zhang et al., 2017). Otro ejemplo relevante es la participación de Rab11 en el reciclamiento de la integrina $\alpha 6\beta 4$ a la superficie celular en condiciones de hipoxia, de esta manera la hipoxia incrementa la presencia de la integrina $\alpha 6\beta 4$ en la membrana lo que regula la invasión y migración de las células MDA-MB-231 (Kelly et al., 2012). Por lo que, se cree que Rab11 estaría ayudando a la invasión de células cancerosas en condiciones de hipoxia (Yoon et al., 2005). Por otro lado, en un estudio donde se transfectó al gen que codifica Rab8 constitutivamente activa, se observó que ésta regula el transporte de vesículas secretorias que acarrean o transportan a metaloproteasas como la MT1-MMP a la membrana plasmática para la degradación de la matriz extracelular, lo que ayuda a los procesos de invasión (Bravo-Cordero et al., 2007). También otras Rabs se han relacionado con la secreción de metaloproteasas, como la Rab2a que participa en la secreción de MT1-MMP en cáncer de mama y la Rab40 que participa en la secreción de MMP2 y MMP9 y esto contribuye a la formación de los invadopodios promoviendo migración, invasión y metástasis en cáncer gástrico (Guadagno and Progida, 2019). Adicionalmente, en el cáncer de mama y ovario, la sobreexpresión de las proteínas Rab25 y Rab27 está asociada fuertemente a la disminución en la sobrevivencia celular y a la baja sobrevivencia de pacientes (Cheng et al., 2004; Zhang et al., 2012). Importantemente, en 2010 Hendrix y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de la Rab 27B regula la secreción de HSP90 y la relacionaron directamente con la invasión y metástasis del cáncer mamario, mientras que Rab 27A no participa en estos eventos. Sin embargo, en 2012 Bobrie y colaboradores reportaron que Rab 27A regula la progresión tumoral a través de la secreción de exosomas en células de carcinoma mamario murino 4T1 (Bobrie et al., 2012; Hendrix et al., 2010).

Justificación

El cáncer de mama es el más frecuente en el mundo. Este padecimiento tiene una alta tasa de mortalidad que cobra la vida de millones de personas al año. En México es la primera causa de muerte en mujeres. Por lo cual es importante entender que mecanismos y moléculas subyacen a esta patología, esto permitirá establecer a futuro nuevas estrategias de diagnóstico y terapéuticas. Por otra parte, el CaSR y la GTPasa Rab27b han sido relacionadas a la progresión tumoral; sin embargo, aun se desconoce si estas moléculas trabajan de manera sinérgica para llevar a la progresión de los tumores. Con este trabajo pretendemos elucidar si el CaSR tiene alguna relación con la GTPasa Rab27b. Esto permitirá en un futuro establecer al CaSR y a la Rab27b como marcadores moleculares de relevancia diagnóstica y como blancos para el tratamiento de esta enfermedad.

Todo lo antes descrito nos llevo a plantear la siguiente hipótesis.

Hipótesis

La secreción de factores quimiotácticos mediada por activación del receptor sensor de calcio es regulada a través de la GTPasa Rab27B.

Objetivo general

Determinar si el CaSR regula la actividad de Rab27B vinculándola a los procesos de secreción y evaluar la participación de Rab27B en la secreción de factores quimiotácticos dependientes de la activación del CaSR

Objetivos particulares

- Determinar si el CaSR regula la expresión de Rab27B.
- Determinar la participación de Rab27B en la secreción de factores quimiotácticos dependientes de la activación del CaSR.
- Determinar si el CaSR promueve la activación de la GTPasa Rab27B
- Determinar cuál vía de señalización participa en la activación de Rab27B promovida por el CaSR.
- Determinar la participación del GEF(MADD) en la activación de Rab27B

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y PAE. La primera son células epiteliales de adenocarcinoma mamario humano altamente metastásicas. Las segundas son células endoteliales de aorta de porcino. Todas estas células fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, D-7777), mas 3.7 g/litro de Bicarbonato de sodio (Sigma, S-5761), suplementado con 5% o 10% DE SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco, 10437-028), mas antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062). Se uso la línea celular Hela procedente de Adenocarcinoma de cérvix, estas células fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, D-7777) suplementado con 10% DE SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco, 10437-028) mas antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062). Se uso la línea celular PC3 procedente de Adenocarcinoma de próstata, estas fueron crecidas en medio RPMI-1640 (Sigma R-6504), mas 3.7 g/litro de Bicarbonato de sodio (Sigma, S-5761), suplementado con 10% DE SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco, 10437-028) mas

antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062). Todas estas células se incubaron a 5% de CO₂ y 37°C de temperatura en una incubadora NuAIRE.

Secreción de factores quimiotácticos

- a) Para determinar la participación del receptor sensor de calcio en la secreción de factores quimiotácticos, células MDA-MB-231 se ayunaron durante 24 horas con medio DMEM (Gibco, cat. 21068-028) suplementado con 0.25 mM de CaCl₂ (medio bajo calcio de ayuno) y se estimularon durante 6 horas con CaCl₂ 1.5 mM, 1 μM de R-568 (Tocris Bioscience, cat. 3815) un modulador alostérico positivo para el CaSR, el cual aumenta la afinidad del receptor por el Ca²⁺, y en presencia del modulador alostérico negativo NPS-2143 (Tocris Bioscience, cat. 3626) 5 μM. Los medios de cultivo condicionados se recuperaron y se dializaron con una membrana para retirar todas las moléculas menores de 3.5kD (SnakeSkin® Dialysis Tubing 3.5 kDa, 68035) en buffer para diálisis (EDTA 1mM, Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM) y se utilizaron como estímulos para ensayos de migración en cámara de Boyden.

- b) Para determinar la participación de Rab27B en la secreción de factores quimiotácticos, células MDA-MB-231 se transfectaron con 5 μg de MISSION shRNAs-Rab27B (shRNA-I: Clone ID: NM_004163.3-217s1c1 y shRNA-II: Clone ID:NM_004163.3- 235s1c1, donados amablemente por Dra. Clotilde Théry del Instituto Curie) usando Lipofectamina LTX (Invitrogen 15338030). También se transfectaron Rab27A, Rab27B y Rab3D todas estas con la etiqueta fluorescente EGFP (donados amablemente por Dr. Jean Marie Naeyaert del NIH), 24 horas postransfección las células se ayunaron durante 24 horas con medio DMEM bajo calcio y se estimularon durante 6 horas con CaCl₂ 1.5 mM en presencia de 1 μM R-568; los medios condicionados se recuperaron y se dializaron para retirar todas las moléculas menores de 3.5kD (SnakeSkin® Dialysis Tubing 3.5 kDa, cat. 68035) y se utilizaron como estímulos para ensayos de migración en cámara de Boyden.

- c) Para los ensayos de migración se utilizaron cámaras de Boyden (Neuro Probe AA12) de 12 pozos; cultivos confluentes de células endoteliales de aorta de porcino (PAE) fueron ayunadas por 16 horas con medio DMEM bajo calcio. Pasadas las 16 horas,

las células PAE fueron despegadas de la placa de cultivo con tripsina-EDTA 1X (Sigma, T-3924) se resuspendieron en medio bajo calcio y se contaron en cámara de Neubauer (Bright-Line™ Hemacytometer Z359629) para que en el pozo superior de la cámara de Boyden se colocasen un promedio de 100,000 células. En el pozo inferior de la cámara se colocaron los medios condicionados previamente recuperados, cargando 165 µL/pozo, y por encima del pozo inferior se colocó un filtro de policarbonato de 8 µm (Neuro probe, PFB8) recubierto con gelatina de piel de bovino (Sigma, G9391) al 2%; la cámara se incubó a 37°C durante 6 horas, los filtros se fijaron en metanol por 5 minutos y se tiñeron con el colorante cristal violeta (Sigma, C3886) por 15 minutos. Las células que no migraron fueron removidas del filtro con un algodón humedecido con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 9.81 mM, KH₂PO₄ 2 mM).

- d) Por otra parte, las citocinas presentes en medios condicionados se cuantificaron por medio de citometría de flujo usando el kit CBA (BD. Cat. 551811). Se usaron 10 µL de perlas para cada condición y se agregaron 200 µL de muestra, se agregaron 10 µL de ficoeritrina del kit y se incubó por 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 200 µL de buffer de lavado, se centrifugó a 13,200 rpm (16,110 × g) durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf 5415R a 4°C. Por último, se descartó el sobrenadante y se agregaron 150 µL de buffer de lavado del kit a las perlas y se pasaron a tubos para citometría (BD, 352003).

Activación de Rab27B

- a) Para determinar la activación de Rab27B, las células se sometieron a un ayuno con medio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco, 11380-037) suplementado con 0.25 mM de CaCl₂ (MEM bajo calcio) y libre de suero por 16 horas; posterior al ayuno se les dio un estímulo de 15 minutos con CaCl₂ 1.5 mM y 1 µM de R-568. En algunos experimentos se utilizaron moduladores alostéricos negativos del receptor sensor de calcio, tal como NPS2143 7.5 µM y Calhex 5mM (Tocris Bioscience, 3626, 4387). Por otra parte, células MDA-MB-231 se transfectaron con el shRNA-Rab27B (shRNA-I) y se inhibió la expresión del GEF-MADD específico para Rab27B con un esiRNA (MISSION® esiRNA, EHU064901 de Merck) usando Lipofectamina LTX

y Lipofectamina RNAiMAX (13778-150 de Invitrogen), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- b) Para analizar las vías de señalización que participan en la activación de Rab27B, células MDA-MB-231 se ayunaron 16 h con medio MEM bajo calcio y se estimularon con CaCl_2 1.5 mM en presencia de 1 μM R-568, ya sea en presencia o ausencia de inhibidores de las vías de señalización. Las células fueron preincubadas con Forskolina 10 μM (15 min), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) 100 μM (15 min), Rapamicina 40 ng/mL (Merck, R0395) (1h) y Wortmanina (Wm) 300 nM (Calbiochem, 681676) durante una hora. Por otra parte, se transfectó con Lipofectamina LTX el inhibidor de la vía de señalización de PKA, PKI 750 ng (cDNA amablemente donado por el Dr. Silvio Gutkind, UC San Diego).
- c) Ensayo de *pull-down*: éste se realizó para determinar la activación de Rab27B. Para esto, se utilizaron perlas de GST-JFC1, un efector de Rab27B que la reconoce en su estado activo unido a GTP. Las perlas se incubaron durante 45 minutos en agitación constante con los lisados recuperados. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 4°C, 5 minutos a 13,200 rpm ($16,110 \times g$). El sobrenadante se aspiró con la ayuda de vacío con mucho cuidado para sólo quedarse con la pastilla de perlas GST-JFC1 y la Rab27B activa, las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y fosfatasa (NaF 1 mM, NaVO_3 1 mM y β -glicerol fosfato 10 mM). Posteriormente se agregaron 35 μL de buffer de muestra SDS laemmli 1X y se congelaron a -70°C para revelar la fracción activa de Rab27B por análisis de Western blot.

Western blot

La expresión de proteínas transfectadas, la activación de vías de señalización y los abatimientos de la expresión de algunas proteínas se analizó por la técnica de Western blot, usando los siguientes anticuerpos primarios: Anti-Myc (Sigma, M5546), anti-Rab27B (Sigma, SAB1411178), anti-EGFP (MMS-118R; Covance Research Products), anti-pAKT (cell signal, Ser473, 4060), anti-MADD (Sigma, PRS1150), Anti-S6 (S6, 2317), anti-pS6

(Ser240/244, 2215), anti-pCREB (cell signal Ser133, 9191) y anti-CREB (cell signal, 9197) de Cell Signaling Technology.

Para los anticuerpos secundarios se utilizaron los siguientes: Anti-rabbit IgG (H + L) y anti-mouse IgG (gamma) marcados con peroxidasa, ambos de KPL.

- a) En geles de poliacrilamida al 10%, se cargaron 20 µg de la muestra y se sometieron a electroforesis a 120 V, usando buffer de corrida SDS-PAGE 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.01%).
- b) Una vez terminada la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Merck, HATF00010) durante 2 horas 30 minutos a 320 mA usando el buffer de transferencia (Tris-Glicina 1X pH 8.3).
- c) Después de los lavados con TBS-Tween al 0.05% (Tris 2.42 g/L, NaCl 17.53 g/L, Tween 0.05%), la membrana se bloqueó con leche sin grasa (Svelty 0% grasa) al 5% en TBS-Tween al 0.05% durante 1 hora en agitación constante.
- d) Al término del bloqueo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween al 0.05% (Tris 2.42 g/L, NaCl 17.53 g/L, Tween 0.05%).
- e) Las membranas se cortaron al nivel de la proteína de interés y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C en agitación constante.
- f) Al siguiente día, los anticuerpos se recuperaron y se hicieron tres lavados con TBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos.
- g) Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios en leche libre de grasa (Svelty 0% grasa) durante una hora en agitación constante a T.A.
- h) Se llevó a cabo un enjuague con agua bidestilada para eliminar el exceso de leche y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.05% de 5 minutos en agitación constante a T.A.

Revelado

- a) Se usó el sustrato Luminol y solución peroxidasa de SuperSignal® WestPico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific 34080) a una dilución 1:1 (vol/vol) y se bañó la membrana durante un minuto con ayuda de una micropipeta de 1 mL.
- b) Se eliminó el exceso de mezcla de la membrana, se cubrió con película plástica y se colocó en un cassette para autoradiografía.

- c) Una vez en el cuarto oscuro, se tomó una placa para rayos X (Afga® Gevaert, EVYJC) y se expuso por contacto a diferentes tiempos. Se revelaron con revelador y fijador (*CareStream*, 1900943, 1901875)
- d) Las placas se dejaron secar y posteriormente se marcaron los pesos moleculares en estas de acuerdo con el marcador de peso (BioRad, 1610374). La cuantificación densitométrica se realizó empleando el software *Image J*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado por una prueba de comparación múltiple, con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software GraphPad Prism, versión 6.0 considerando los valores de $p < 0.05$ como significativos.

RESULTADOS

La secreción de factores quimiotácticos promovida por el CaSR es dependiente de Rab27B

Se sabe que el CaSR promueve la secreción de algunos factores quimiotácticos en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y esta secreción es dependiente de la activación del receptor. (Hernández-Bedolla et al. 2015). Para demostrar la participación del CaSR en la secreción de factores quimiotácticos, utilizamos células MDA-MB-231 que expresan de forma endógena al receptor sensor de calcio, las cuales fueron ayunadas y estimuladas por 6 horas con Ca^{2+} 2 mM y R-568 1 μM . Los medios condicionados se recuperaron y se dializaron para evaluar su potencial quimiotáctico en ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando células PAE. En la **Figura 6A** se observa un incremento en la migración de células PAE cuando se utilizaron como estímulo los medios condicionados de las células MDA-MB-231 estimuladas con calcio y R-568. Para demostrar que el aumento en la migración es regulado por el CaSR, inhibimos a éste con el modulador alostérico negativo NPS-2143. La gráfica demuestra que los medios condicionados de células estimuladas con calcio en la presencia de NPS-2143 no promueven la migración de células PAE, concluyendo que el CaSR es el responsable de mediar la secreción de factores que promueven migración sobre las células PAE.

Actualmente se desconoce el mecanismo de secreción promovido por el CaSR en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Sin embargo, se ha reportado que en la progresión del cáncer de mama participa la proteína Rab27B relacionada a la secreción de factores involucrados a este proceso. Por ello, nos preguntamos si Rab27B regula la secreción de factores quimiotácticos promovidos por el CaSR. Para determinar si Rab27B participa en la secreción, lo que hicimos fue inhibir su expresión, usando dos shRNAs específicos para Rab27B. En la **figura 6B** se muestran las secuencias de los shRNAs. Para evaluar la participación de la proteína Rab27B sobre la secreción de factores quimiotácticos se realizaron ensayos de migración de células PAE en cámara de Boyden utilizando medios condicionados de células MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos que codifican los shRNAs específicos para la proteína Rab27B. En la **Figura 6C y 6E** se observa un incremento en la migración de células PAE cuando se utilizó como estímulo el medio condicionado de las células MDA-MB-231 transfectadas con el vector vacío y estimuladas con calcio y R-568. Cuando se utilizó medio condicionado de células MDA-MB-231 transfectadas con 5 μg de los shRNAs-Rab27B y estimuladas con 1.5 mM de Ca^{2+} y R-568 1 μM , ya no se observó un incremento sobre la migración de células PAE. Lo cual nos lleva a concluir que la Rab27B estaría regulando la secreción de factores quimiotácticos promovidos por el CaSR cuando éste es estimulado con calcio y R-568. Corroboramos la disminución de la expresión de Rab27B por efecto de los shRNAs con análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-Rab27B. En las **figuras 6D y 6F** observamos la disminución de la expresión de Rab27B cuando se transfectaron los shRNAs específicos para el gen Rab27B. Un efecto interesante que notamos en estos experimentos fue un aumento considerable de la expresión de Rab27B cuando se estimula al receptor sensor de calcio y este efecto se vio interrumpido cuando usamos los shRNAs para Rab27B, por otro lado, en ningún caso logramos disminuir de manera significativa la expresión de Rab27B por debajo de la expresión basal.

Figura. 6. La secreción de factores quimiotácticos promovida por el CaSR depende de Rab27B. **A)** Se probó el efecto quimiotáctico de medios condicionados dializados (MDA-CM) en ensayos de cámara de Boyden. Células MDA-MB-231 fueron ayunadas 24 h con medio bajo calcio y posteriormente estimuladas durante 6 h con calcio y R-568. Posterior al estímulo se recuperaron los medios condicionados y se analizó la migración de células endoteliales de aorta de porcino (PAE), en presencia o ausencia de NPS-2143 (un modulador alostérico negativo del CaSR, el cual se preincubó durante una hora antes del estímulo). Se muestra un filtro representativo de seis experimentos independientes. ***, $p = 0,0002$; &&&&, $p < 0.0001$ (ANOVA unidireccional seguido de Fisher). **B)** Secuencia parcial de Rab27B. Se indican las secuencias de los shRNAs I y II. Siendo el blanco de los shRNAs la región efectora de la proteína que forma parte del dominio RAB. **C y E)** Efecto quimiotáctico de los medios condicionados de células transfectadas con los plásmidos que codifican el shRNA-I y shRNA-II y estimuladas con calcio 1.5 mM +1 μ M R-568. Los medios condicionados se usaron como quimioatrayentes endoteliales en ensayos de cámara de Boyden. Las gráficas representan los valores densitométricos de 4 y 3 experimentos independientes, respectivamente. *, $p = 0.04$; ****, $p < 0.0001$; &&&&, $p < 0.0001$; **, $p < 0.002$; &&, $p < 0.006$. (ANOVA unidireccional seguido de Fisher) **D y F)** Disminución de la expresión de Rab27B utilizando shRNA I y shRNA-II. El efecto de los shRNAs sobre la expresión de Rab27B se analizó mediante Western blot utilizando lisados de células MDA-MB-231 de las que se obtuvieron los medios condicionados. Las gráficas representan los valores densitométricos de 4 y 3 experimentos independientes respectivamente de la expresión de Rab27B normalizados, usando actina como control de carga. **, $p < 0.007$; &&&& $p < 0.0001$; ****, $p < 0.0001$; &&&& $p < 0.0001$. (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Fisher). Se muestran los Western blots representativos.

La secreción de citocinas depende de la participación de Rab27B

Por otra parte, se ha descrito que el CaSR en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 regula la secreción de citocinas y factores de crecimiento de manera diferencial, ya que la secreción de algunos factores de crecimiento como el EGF dependen de la activación del CaSR (Hernández-Bedolla et al., 2015). Debido a esto nos preguntamos si la secreción depende de la participación de Rab27B cuando se estimula al CaSR. Para determinar cuáles citocinas son secretadas, utilizamos medios condicionados de células MDA-MB-231 transfectadas con el vector y células transfectadas con los shRNAs-Rab27B. En la **Figura 7A** mostramos la disminución de la expresión cuando transfectamos 5 μ g de los shRNAs I y II de Rab27B. Por otra parte, para determinar cuáles citocinas se ven afectadas cuando inhibimos la expresión de Rab27B, utilizamos citometría de flujo mediante el kit CBA (**Figura 7B**). Con esta técnica encontramos que la citocina IL-6 se secreta de manera constitutiva, esto quiere decir que su secreción se lleva a cabo en ausencia de ligando y cuando el receptor es activado se observa una disminución significativa lo cual representaría una regulación negativa por parte del receptor en la secreción de esta citocina. Este mismo efecto fue descrito por Hernández-Bedolla en su trabajo de 2016 en el que describió que la secreción de IL-6 se regula de manera constitutiva ya que de igual manera en presencia de

ligando la secreción se disminuye significativamente, adicionalmente observo que la expresión del CaSR es importante para la secreción de IL-6. Por otro lado, nosotros observamos que la secreción de IL-6 es dependiente de la presencia de Rab27B, ya que al inhibir la expresión de Rab27B su secreción constitutiva es abatida por debajo de los niveles basales. Por otro lado, en las **figuras 7C y 7D** notamos que IL-1 β e IL-8 se secretan de manera dependiente del estímulo y su secreción depende de la presencia de Rab27B debido que, al inhibir su expresión, la secreción de estas dos citocinas es abatida por debajo de los niveles basales.

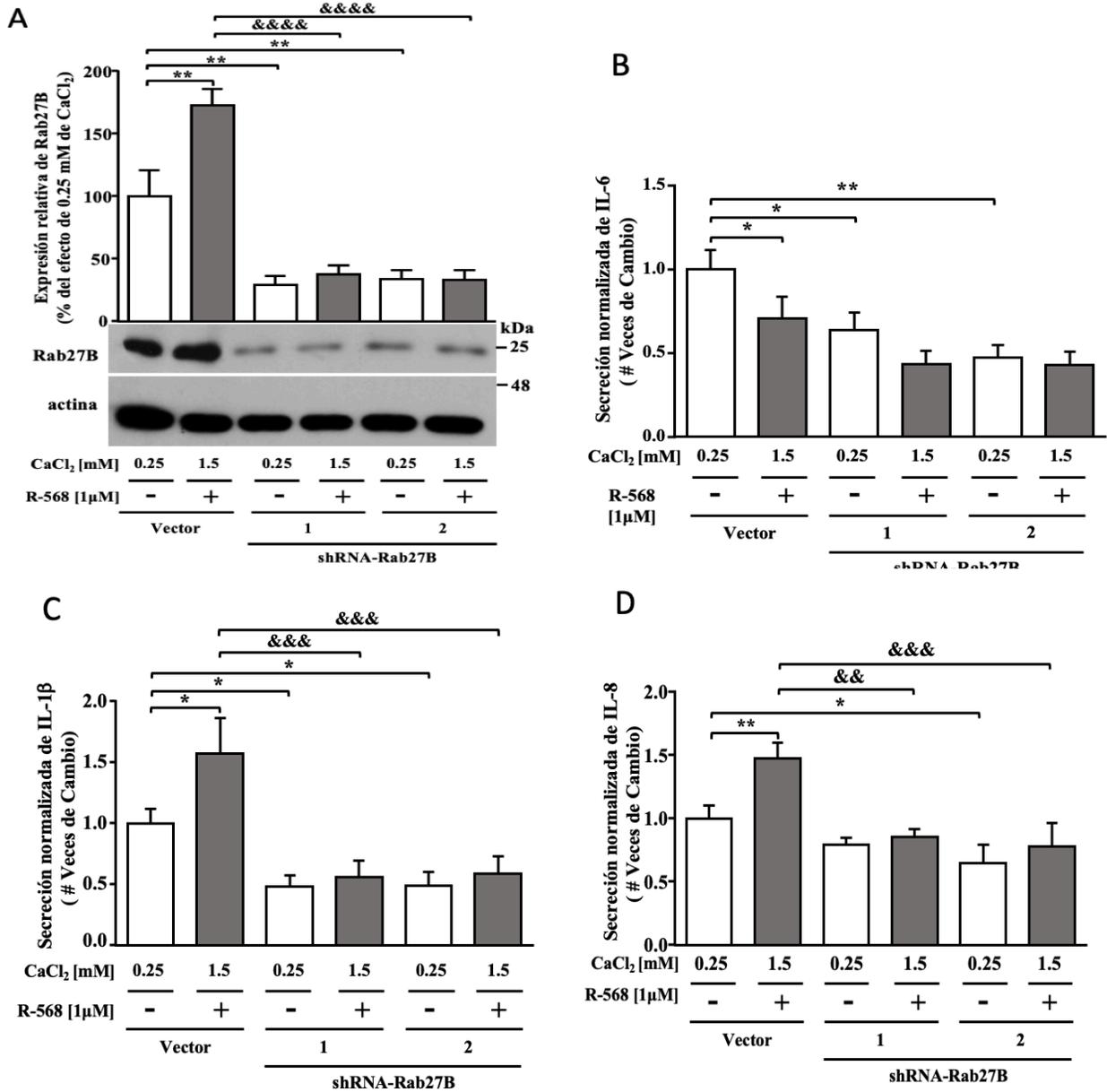


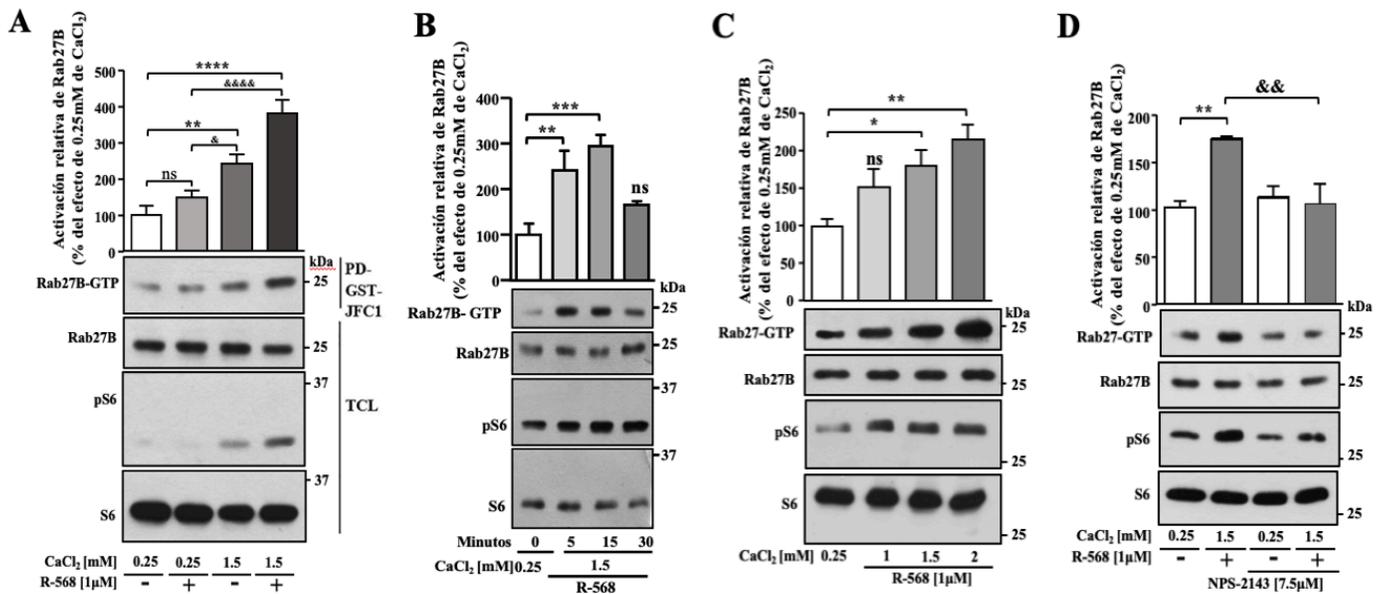
Figura 7. Efecto del abatimiento de la expresión de Rab27B sobre la secreción de IL-1 β , IL-8 e IL-6. **A)** Disminución de la expresión de Rab27B utilizando shRNA-I y shRNA-II. El efecto de los shRNAs sobre la expresión de Rab27B se analizó mediante Western blot utilizando lisados de células MDA-MB-231 de las que se obtuvieron medios condicionados. Las gráficas representan los valores densitométricos de cinco experimentos independientes, ** $p = 0.0025$, ** $p = 0.0033$, ** $p = 0.0059$, &&&& $p < 0.0001$, &&&& $p = 0.0001$ (ANOVA unidireccional seguida de la prueba de Tukey). **B-D)** medios condicionados de células de cáncer de mama MDA-MB-231 (control e inhibición de Rab27B) se probaron mediante CBA para determinar la presencia de IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-8 (D). Las gráficas representan los valores de 5 experimentos independientes. (B) IL-6. *, $p = 0.04$; #, $p = 0.01$; ** $p = 0.00$. (C) IL-1 β . *, $p = 0.02$; #, $p = 0.03$; ∂∂∂, $p = 0.0002$; &&&, $p = 0.0003$. (D) IL-8. **, $p = 0.008$; *, $p = 0.04$; && $p = 0.001$; &&& $p < 0.0004$ (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Fisher).

El receptor sensor de calcio promueve la activación de Rab27B

Por otro lado, se sabe que las proteínas de la familia Rab necesitan ser activadas para que lleven a cabo su función. Por otro lado, se ha descrito que algunos receptores acoplados a proteínas G son capaces de activar a una proteína Rab, como es el caso del receptor para angiotensina II. En ese estudio se demostró por primera vez que un GPCR regula la actividad de una proteína de tráfico vesicular, en este caso Rab5. No obstante, Rab5 es una proteína involucrada en procesos de endocitosis, aún se desconoce si un GPCR es capaz de regular la actividad de una proteína Rab relacionada a secreción. Por lo tanto, nos preguntamos si la actividad de Rab27B estaría siendo regulada por la señalización del CaSR. Para responder esta pregunta hicimos ensayos de captura de GTPasa activa (*pull-down* JFC1-GST) con la ayuda del efector JFC1 de la Rab27B, ya que éste sólo interacciona con Rab27B cuando está activa, es decir unida a GTP. Para responder esto, lo primero que hicimos fue utilizar R-568 para sensibilizar la respuesta del CaSR; se sabe que este modulador alostérico positivo modifica la respuesta del CaSR para activarse a 1.5 mM de CaCl₂, pero no puede ser activado por debajo de 0.5 mM; lo primero que evaluamos fue si tenía algún efecto a baja concentración de calcio 0.25 mM (condición de control). Como se muestra en la **Figura 8A**, a 15 minutos de tratamiento con 0.25 mM de CaCl₂ y el modulador alostérico positivo R568 no se incrementaron los niveles de Rab27B-GTP ni de la proteína S6 fosforilada. Por lo tanto, decidimos usar la concentración baja de calcio como control en experimentos posteriores. Por otra parte, como esperábamos, los niveles de Rab27B-GTP aumentaron considerablemente cuando estimulamos con R568 y 1.5 mM de CaCl₂. También se observó que los niveles de S6 fosforilada incrementaron con el tratamiento de calcio 1.5 mM y R568, lo cual indicaría que la señalización del CaSR fue activada por este tratamiento. Por lo tanto, decidimos usar la fosforilación de S6 como control de activación del CaSR debido a que se ha demostrado que el receptor sensor de calcio activa la vía de señalización de PDK1 y río abajo las proteínas blanco de PDK1 son PI3K siguiendo con la fosforilación de AKT y mTORc1 siguiendo con la fosforilación de S6. Lo siguiente fue determinar el tiempo de activación de Rab27B, por lo que hicimos un curso temporal desde 5 hasta 30 minutos estimulando con 1.5 mM de calcio mas R568; con este enfoque demostramos que la

activación máxima de Rab27B se da a los 15 minutos de estimulación. Como control de señalización del CaSR observamos la fosforilación de S6 (**Figura 8B**). Posteriormente, determinamos la dosis de calcio necesaria para la activación de Rab27B, para lo cual hicimos una curva dosis de calcio desde 1 mM hasta 2 mM. Encontramos que tanto a 1.5 mM como a 2 mM, Rab27B se activa de manera significativa en comparación con la condición no estimulada. Como control de señalización del CaSR observamos la fosforilación de S6 (**Figuras 8C**). A partir de este experimento decidimos utilizar la concentración de 1.5 mM para todos nuestros experimentos. Posteriormente, para demostrar que efectivamente el CaSR es el responsable de la actividad de la Rab27B inhibimos la activación del CaSR con dos moduladores alostéricos negativos NPS-2143 y Calhex (**Figuras 8D y 8E**). Observamos que tanto el NPS-2143 como Calhex impiden que Rab27B se active, lo cual nos lleva a concluir que la actividad de Rab27B es dependiente de la señalización del receptor sensor de calcio, esto lo podemos concluir ya que al inhibir el CaSR con estos moduladores negativos no logramos observar un incremento en la fosforilación de S6. Por otra parte, para corroborar que la banda observada en el Wb fuese efectivamente Rab27B (**Figura 8F**), hicimos un ensayo de captura de GTPasa activa en el cual inhibimos la expresión de Rab27B con el shRNA-I de Rab27B y observamos que al disminuir la expresión de Rab27B en consecuencia se disminuye considerablemente la banda que corresponde a Rab27B activa por debajo de la condición basal (no estimulada), concluyendo que la proteína que bajamos por ensayos de *pull-down* corresponde a Rab27B. Por último, se ha descrito que las proteínas Rab se encuentran inactivas unidas a GDP y aquellas unidas a GTP se encuentran activas. Estos procesos de activación e inactivación se realizan con la cooperación de proteínas conocidas como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs). A pesar del gran número de Rabs, muy pocos GEFs y GAPs han sido identificados. Sin embargo, ya se ha descrito que el GEF para Rab27B es la proteína MADD/DENN/Rab3GEP que posee un dominio catalítico DENN y se expresa diferencialmente en células normales y células neoplásicas, por lo cual nos preguntamos si este GEF es el responsable de la activación de Rab27B y si es regulado vía activación del CaSR. Para esto, evaluamos la participación de MADD en la activación de Rab27B mediada

por el CaSR. Para esto utilizamos un esiRNA para MADD y evaluamos la activación de Rab27B mediante ensayos de captura de GTPasa activa. Como se muestra en la **Figura 8G**, la activación de Rab27B se ve abatida hasta niveles basales al inhibir la expresión de MADD, con lo cual concluimos que MADD es el GEF responsable de la activación de Rab27B a través de la señalización del CaSR en células de cáncer de mama MDA-MB-231.



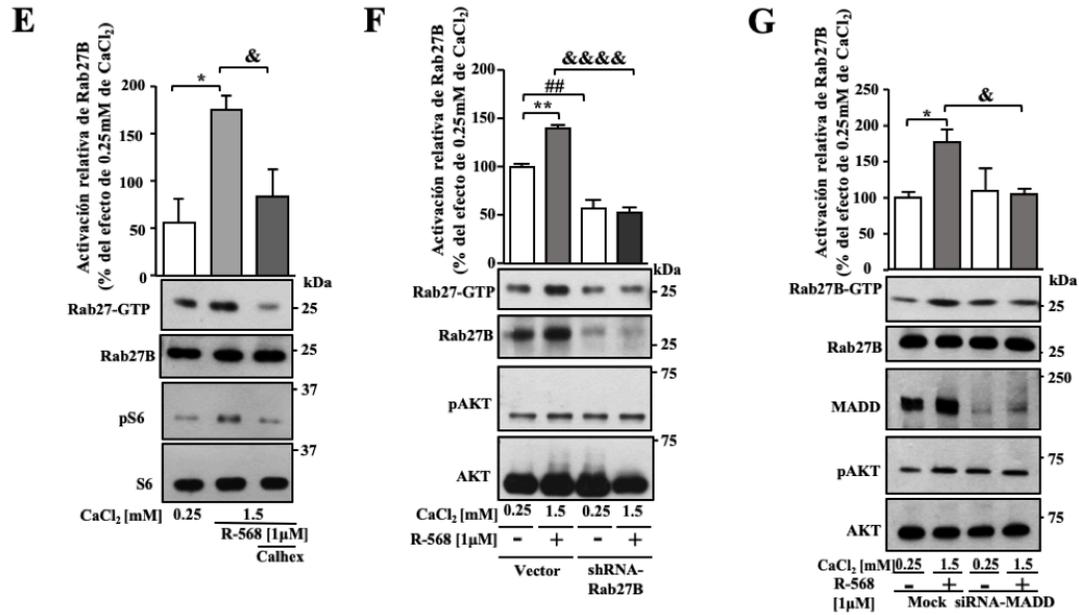


Figura 8. El CaSR promueve la activación de Rab27B. La Rab27B activa se detectó mediante ensayos de GST-JFC1 pull-down utilizando lisados de células MDA-MB-231 estimuladas con calcio extracelular y R-568 como se indica en la parte inferior de cada figura. Los datos representan los valores densitométricos promedio normalizados a los niveles de Rab27B total. **A)** En células MDA-MB-231 se sensibilizó al CaSR con R-568 para activar Rab27B. ns: efecto no significativo estadísticamente; &, $p = 0.03$; **, $p = 0.003$; ****, $p < 0.0001$; &&&&, $p < 0.0001$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 4$). **B)** curso temporal en el cual se estimuló con calcio extracelular 1.5 mM + R-568. **, $p = 0.006$; ***, $p = 0.001$; (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 3$). **C)** Curva dosis de estimulación del CaSR sobre la activación de Rab27B. *, $p = 0.02$; **, $p = 0.003$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 3$). **D y E)** inhibición de la activación del CaSR con NPS-2143 y Calhex. Las células MDA-MB-231 se preincubaron con 7,5 μM de NPS-2143 o 5 μM de Calhex antes de estimular el CaSR durante 15 min. **D)** NPS-2143: **, $p = 0.004$ y &&, $p = 0.005$ (ANOVA de una vía seguido de Sidak; $n = 3$). **E)** Calhex: *, $p < 0.01$; & $p < 0.03$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 4$). **F)** La inhibición de la expresión de Rab27B confirma el efecto estimulante de CaSR sobre Rab27B. **, $p = 0.008$; ###, $p = 0.005$; &&&&, $p < 0.0001$ (ANOVA de una vía seguido de Bonferroni; $n = 3$). **G)** El CaSR activa Rab27B a través de una vía dependiente de MADD. Se detectó Rab27B-GTP a partir de células MDA-MB-231 en donde fue inhibida la expresión de MADD. *, $p = 0.02$; &, $p = 0.02$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 3$).

La activación de Rab27B involucra las vías de señalización de PKA y PI3K-AKT

Por otra parte, el CaSR tiene la capacidad de interactuar con varias proteínas G, como $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, $G_{12/13}$ y en cáncer de mama se ha descrito que también se une a la proteína Gs (Referencias); sin embargo, no sabíamos cual vía de señalización mediada por el CaSR estaría participando en la activación de Rab27B, por lo cual evaluamos varias vías de

señalización. Inicialmente evaluamos la participación de la vía de señalización mediada por Gs en la activación de Rab27B (**Figura 9A**). Para esto utilizamos Forskolina, que es un activador de la adenilato ciclasa, e IBMX, el cual es un inhibidor de fosfodiesterasas e impide la degradación de AMPc, lo que lleva a un incremento en los niveles de AMPc. Encontramos que cuando las células se incuban con Forskolina en la condición control 0.25 mM de CaCl₂, la activación de Rab27B alcanza los niveles observados cuando se estimula al CaSR. Por otro lado, la Forskolina no induce un aumento mayor en la activación de Rab27B cuando las células además se estimulan con calcio 1.5 mM + R568, lo cual nos estaría indicando que la Forskolina está llevando al máximo de activación de Rab27B, ya que el calcio no incrementa aún más la activación de Rab27B. Por otro lado, para confirmar la participación de un efector del AMPc en la activación de Rab27B, analizamos la participación de PKA, usando un inhibidor competitivo de PKA, es este caso utilizamos PKI. Como se muestra en la **Figura 9B**, al expresar el PKI-Myc-mCherry en células MDA-MB-231, este inhibidor abolió la activación de Rab27B dependiente de la estimulación del CaSR. Por lo que, con estos dos enfoques, concluimos que la vía de señalización de PKA es relevante en la activación de la GTPasa Rab27B mediante la activación del receptor sensor de calcio. Adicionalmente, evaluamos la participación de la vía activada por Gβγ, como se muestra en las **Figuras 9C y 9D** al utilizar Wortmanina, un inhibidor de la vía PI3K, la cual es un efector de Gβγ, se abate de manera significativa la activación de Rab27B en comparación al control. Además, también utilizamos Rapamicina, un inhibidor de mTOR, una cinasa que actúa río abajo de PI3K y observamos que al inhibir mTOR se disminuye la activación de Rab27B con respecto al control con lo cual podríamos concluir que la participación de la vía de señalización regulada por Gβγ es muy importante para la activación de Rab27B.

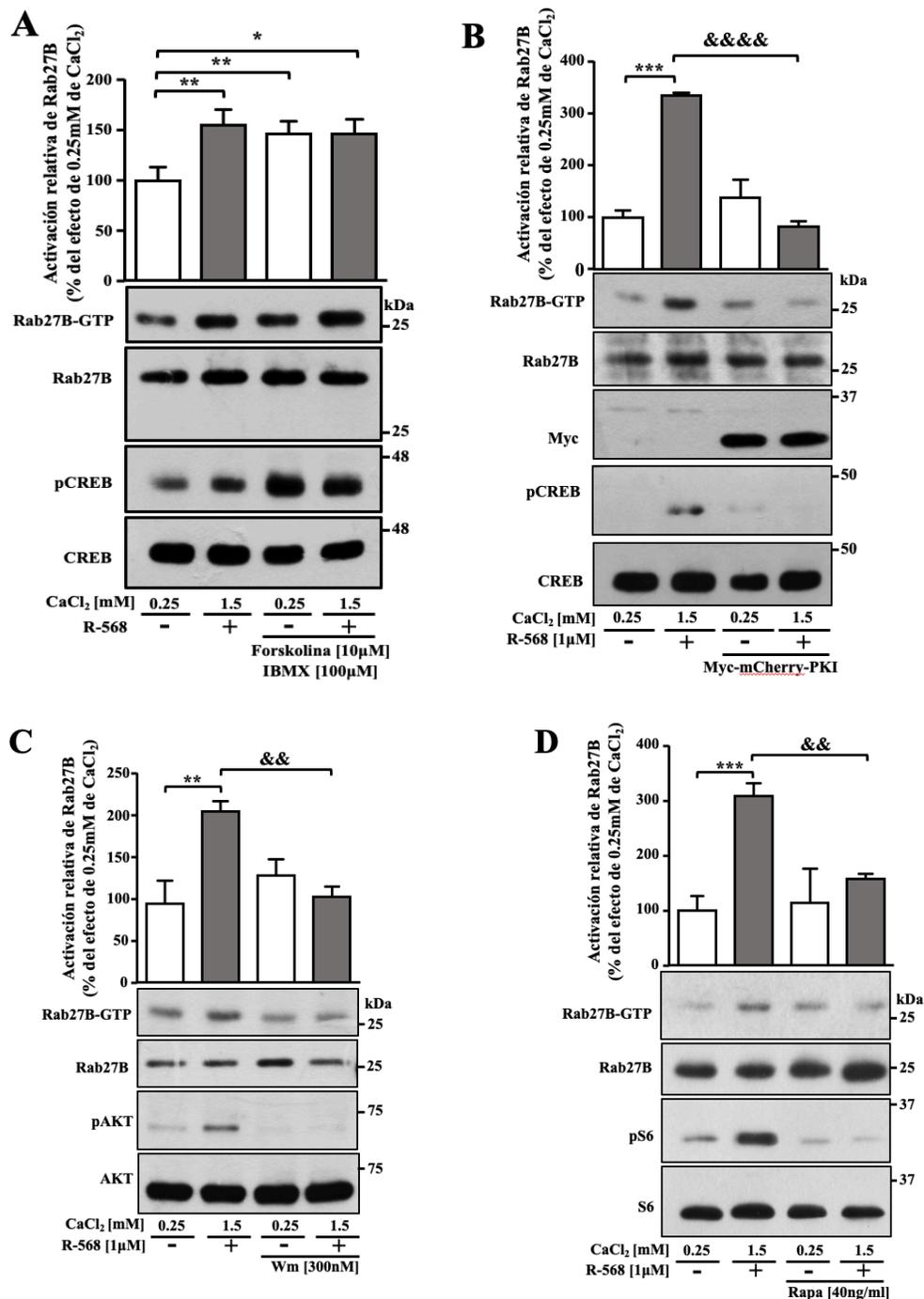


Fig. 9. El CaSR activa Rab27B a través de las vías de señalización PKA, PI3K y mTORC1. Rab27B-GTP se aisló mediante ensayos de pull-down utilizando lisados de células MDA-MB-231 sometidas a tratamientos farmacológicos para abordar el papel potencial de PKA, PI3K y mTOR en la cascada de señalización desencadenada por el CaSR. **A)** Forskolin + IBMX promueven la activación de Rab27B. Las células se pretrataron con Forskolina 10 μM más IBMX 100 μM durante 15 min y durante la estimulación con calcio extracelular y R-568. **, $p = 0.002$; ###, $p = 0.007$; *, $p = 0.02$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher, $n = 5$). **B)** CaSR activa Rab27B a través de una vía dependiente de PKA. Se aisló Rab27B-GTP de células control MDA-MB-231 y de aquellas que expresan Myc-mCherry-PKI (un inhibidor de PKA). ***, $p = 0.0001$; &&&& $p < 0.0001$. (ANOVA de una vía siguió a Tukey; $n = 3$), como control de activación de la PKA se muestran blots representativos de la fosforilación de CREB (pCREB, **A-B**) y sus respectivos

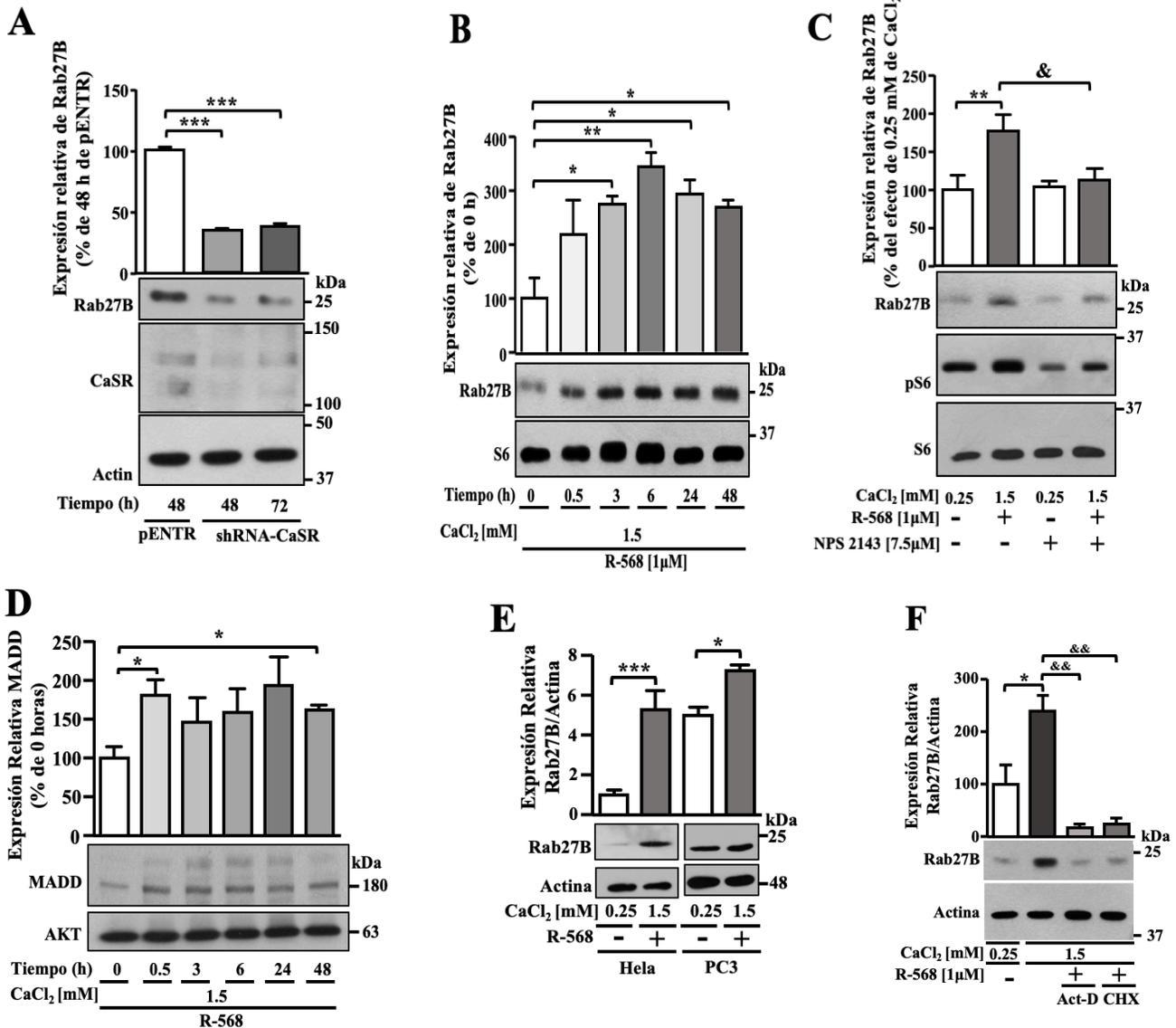
controles de expresión. **C y D**) CaSR implica la señalización de PI3K y mTORC1 para activar Rab27B. Las células se pretrataron con Wortmanina 300 nM (Wm, C) o Rapamicina 40 ng / ml (Rapa, D) durante 1 hora y durante la estimulación con calcio extracelular + R-568, (C) Wortmanina: **, $p = 0.002$; &&, $p = 0.005$ (ANOVA de una vía seguido de Bonferroni; $n = 4$). (D) Rapamicina: ***, $p = 0.0002$; &&, $p = 0.001$ (ANOVA de una vía seguido de Fisher; $n = 3$). se muestran blots representativos de la fosforilación de AKT (pAKT, fosforilación en Ser-473, C) y S6 (pS6, fosforilación en Ser-240/244, D) con sus correspondientes controles de expresión, estos son controles de la señalización de CaSR y el efecto inhibidor de Wm y Rapamicina.

La expresión de Rab27B es regulada por el Receptor Sensor de Calcio

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de la proteína Rab27B es relevante para la progresión del cáncer de mama debido a que su sobreexpresión lleva a un pronóstico poco favorable para los pacientes con cáncer de mama (Zhang et al., 2012). Adicionalmente, un estudio en células de cáncer de colón menciona que el estímulo del CaSR aumenta la expresión del RNA mensajero de Rab27B (Aggarwal et al., 2017). Por lo cual nos preguntamos si en células de cáncer de mama MDA-MB-231 el estímulo del CaSR lleva a aumentar la expresión de la proteína Rab27B. Por lo tanto, lo primero que evaluamos fue la participación del CaSR sobre la expresión de Rab27B. Para esto lo que hicimos fue inhibir la expresión del receptor durante 48 y 72 horas con un shRNA específico para el CaSR y evaluamos la expresión de Rab27B (**Figura 10A**). Encontramos que al inhibir la expresión del CaSR también se disminuye la expresión de Rab27B, tanto a 48 como a 72 horas. Ya que habíamos observado que la presencia del CaSR es relevante para la expresión de Rab27B, lo siguiente que nos preguntamos fue si la activación del CaSR llevaría a un aumento en la expresión de Rab27B. Para esto hicimos un curso temporal estimulando al CaSR con calcio y el modulador R568. Como se puede observar en la **Figura 10B** la expresión de Rab27B comienza a aumentar desde los 30 min, teniendo un pico máximo de expresión a las 6 horas de estimulación y se mantiene constante el aumento de expresión a las 24 y 48 horas comparadas con el tiempo 0. Para comprobar que efectivamente este aumento en la expresión de Rab27B se debía al estímulo del CaSR, lo que hicimos fue inhibir la activación de receptor con el modulador negativo NPS-2143. En la **Figura 10C** se observa que al inhibir la activación del CaSR la expresión de Rab27B se ve afectada, con lo cual concluimos que la expresión de Rab27B está siendo regulada por la presencia y activación del CaSR. Por otra parte, nos preguntamos si en otras líneas celulares de cáncer es relevante la participación del

CaSR en la expresión de Rab27B (**Figura 10E**), para esto usamos las líneas celulares HeLa (cáncer de cérvix) y PC3 (cáncer de próstata) y encontramos que el estímulo del CaSR lleva a un aumento en la expresión de Rab27B (datos obtenidos en colaboración con Irving García-Jimenez). Los experimentos anteriores confirmaron el efecto del CaSR sobre la expresión de Rab27B a nivel de proteína, por lo cual nos preguntamos si los mecanismos de transcripción y traducción podrían explicar el aumento de la expresión de Rab27B. para responder esta pregunta incubamos células MDA-MB-231 con Actinomicina D, un potente inhibidor de la transcripción, o con Cicloheximida, un inhibidor de la traducción; estos tratamientos previnieron el efecto del calcio extracelular 1.5 mM más R-568 sobre la expresión de Rab27B (**Figura 10F**), apoyando la idea de que la señalización del CaSR activa una vía transcripcional para aumentar la expresión de Rab27B. Además, nos preguntamos si la expresión del GEF-MADD es también afectada por estimulación del CaSR. En la **figura 10D** se muestra que la expresión de MADD se incrementa a los 30 minutos de estímulo y permanece aumentada hasta las 48 horas. Estos datos concuerdan con la expresión aumentada de Rab27B a las 48 horas (datos obtenidos en colaboración con Jorge Eduardo Del Río-Robles). Por último, para abordar directamente el efecto de la sobreexpresión de la Rab27B sobre las propiedades secretorias de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, se transfectaron estas células con las Rabs secretorias: Rab27A, Rab27B y Rab3D etiquetadas con EGFP (**Figura 10G**). Al evaluar el potencial quimiotáctico en ensayos de migración de células PAE en cámara de Boyden de los medios condicionados dializados recolectados de células MDA-MB-231 transfectadas con las distintas Rabs, encontramos que la simple sobreexpresión en células MDA-MB-231 de las diferentes Rabs secretorias llevan a un aumento de la secreción de factores quimiotácticos, evidenciado por el efecto quimiotáctico de los medios condicionados sobre las células endoteliales; este efecto fue comparable al efecto producido por la activación del CaSR en el control. Por otra parte, no se observó ningún efecto adicional de la estimulación del CaSR en células que sobreexpresaron alguna Rab secretora. Lo siguiente fue determinar el efecto celular que ejerce esta sobreexpresión de Rabs sobre los factores que se secretaron en los medios condicionados. Para esto se analizaron por análisis FACS los factores secretados en los medios condicionados obtenidos a partir de células MDA-MB-231 transfectadas con el vector control o con EGFP-Rab27B (**Figura 10H**). Como se muestra, encontramos que la sobreexpresión de esta GTPasa

aumentó significativamente los niveles de IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, IP-10 y RANTES en comparación con los medios condicionados obtenidos de células MDA-MB-231 transfectadas con el vector control (datos obtenidos en colaboración con Jennifer Paulina Hernández-Maldonado).



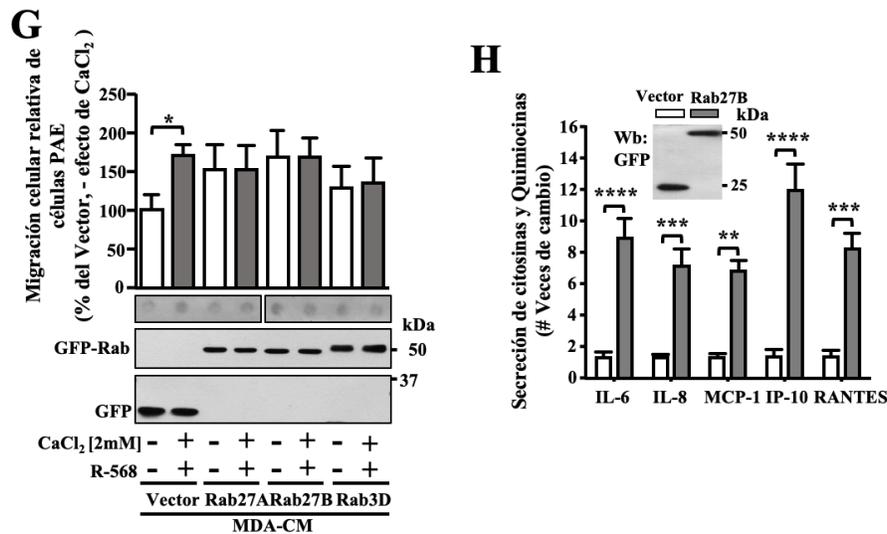


Figura 10. El receptor sensor de calcio estimula la expresión de Rab27B en células cancerosas. **A)** La inhibición de la expresión del CaSR disminuye la expresión de Rab27B. Células MDA-MB-231 se transfectaron transitoriamente con un shRNA-CaSR o vector de control (pENTR). Se muestra un Western blot representativo (n = 2). **B)** El CaSR promueve la expresión de Rab27B de una manera dependiente del tiempo. La expresión de Rab27B se analizó utilizando lisados de células MDA-MB-231 estimuladas con calcio + R-568 durante los tiempos indicados. *, p = 0.03; **, p = 0.003; #, p = 0.01; &, p = 0.04 (ANOVA de una vía seguido de Tukey; n = 3). **C)** La expresión de Rab27B depende de la activación del CaSR. La expresión de Rab27B se analizó utilizando lisados celulares de células MDA-MB-231 ayunadas y preincubadas o no con NPS-2143 durante 1 h antes de ser estimuladas con calcio 1,5 mM + 1 μM R-568. La gráfica representa los valores densitométricos de tres experimentos independientes. **, p = 0.009; &, p = 0.02, (ANOVA de una vía seguido de Fisher; n = 3). **D)** El CaSR promueve la expresión del GEF-MADD. La expresión de MADD se analizó usando lisados de células MDA-MB-231 estimuladas con calcio 1,5 mM + 1 μM R-568. La gráfica representa los valores densitométricos de tres experimentos independientes. **, p = 0,03; &, p = 0,01, n = 3). **E)** El CaSR promueve la expresión de Rab27B en células HeLa y PC3. La expresión de Rab27B se analizó usando lisados celulares de células HeLa o PC3 estimuladas con CaCl₂ 1.5 mM + R-568 o dejadas con CaCl₂ 0,25 mM (condiciones control). La gráfica representa los valores densitométricos normalizados. ****, p = 0,0007; *, p = 0,02 (ANOVA de una vía seguido de Fisher; n = 3 para HeLa y n = 4 para células PC3). La expresión relativa de Rab27B se normalizó a actina. **F)** La señalización de CaSR activa una vía transcripcional para aumentar la expresión de Rab27B. La expresión de Rab27B se analizó utilizando lisados celulares de células MDA-MB-231 ayunadas y preincubadas con 1 μg/ml de actinomicina D y 70 μM de ciclohexamida durante 1 h antes de ser estimuladas durante 48 horas con calcio 1.5 mM + 1 μM R-568 en la presencia de actinomicina D y ciclohexamida. La gráfica representa los valores densitométricos de dos experimentos independientes. *, p = 0.0173; &&, p = 0.0033; &&, p = 0.0037, (ANOVA de una vía seguido de Fisher; n = 2). **G)** La sobreexpresión de Rabs secretoras aumenta el potencial quimiotáctico de medios condicionados obtenidos de células MDA-MB-231 transfectadas con ADNc codificante para EGFP (como control), Rab27A, Rab27B o Rab3D marcados con EGFP. Los medios condicionados dializados de las células MDA-MB-231 transfectadas se usaron como quimioatrayentes en ensayos de cámara de Boyden. Las proteínas transfectadas se detectaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos contra EGFP. La gráfica representa los valores densitométricos normalizados. *, p = 0,03, (ANOVA de una vía seguido de Fisher; n = 3). **H)** Perfil de citocinas y quimiocinas secretadas por células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresan EGFP-Rab27B. Se utilizaron matrices citométricas de citocinas y quimiocinas para evaluar la presencia de los factores en el medio condicionado obtenido de células MDA-MB-231 transfectadas transitoriamente con EGFP (como control) o EGFP-Rab27B. La gráfica representa los valores medios normalizados con respecto a las condiciones de control. ****, p < 0.0001; ***, p = 0.0008; **, p = 0.0014, (ANOVA de una vía seguido de Bonferroni; n = 3).

DISCUSIÓN

El cáncer cobra millones de muertes en el mundo cada año. Es un padecimiento complejo, heterogéneo, dinámico y con múltiples componentes moleculares en progreso. La mayoría de los tipos de cáncer tienen características tales como señalización proliferativa, evasión a los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de la invasión y la metástasis de células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011; Moses et al., 2018). El microambiente tumoral es de vital importancia para la sobrevivencia de las células tumorales, el cual es generado por diferentes estructuras y tipos celulares como los vasos sanguíneos, fibroblastos, células que contribuyen a la inmunidad, células inflamatorias derivadas de la médula ósea, linfocitos, vías de señalización y la matriz extracelular; de esta manera el tumor puede interactuar con el microambiente liberando señales extracelulares que pueden promover la angiogénesis tumoral e inducir tolerancia a la inmunidad periférica que en conjunto, promueve la sobrevivencia de células malignas (Farnsworth et al., 2014; Wang et al., 2018). Este mismo microambiente puede originar otros efectos en las células tumorales como la inducción de la secreción de péptidos involucrados en la progresión tumoral (Karar and Maity, 2011). Debido a que los eventos secretorios están mediados por proteínas de la familia de las GTPasas Rab, nos interesamos en la relevancia de Rab27B en la secreción de factores quimiotácticos regulados por el CaSR (Receptor Sensor de Calcio). Se ha descrito que esta proteína participa en la progresión tumoral mediante la secreción de proteínas relacionadas con el crecimiento, invasión y metástasis tumoral (Hendrix et al., 2010). Por otra parte, la inhibición de la expresión de Rab27B por un esiRNA suprime la invasión celular in vitro de células de cáncer de vejiga y la proliferación celular de células de cáncer de mama MCF-7 (Hendrix et al., 2010; Ostfeld et al., 2014). Rab27B promueve funciones oncogénicas predominantemente aumentando la secreción de distintos factores y modulando así el microambiente tumoral. Nosotros evaluamos la secreción de factores quimiotácticos mediados por el CaSR y estudiamos cómo Rab27B participa en esta secreción. Encontramos que al estimular el CaSR en células MDA-MB-231 y obtener medios condicionados que a su vez fueron utilizados

como agente quimioatrayente en ensayos de cámara de Boyden, logramos apreciar un aumento en la migración de células endoteliales (PAE), lo que nos indicaría que existe un aumento de factores secretados al medio extracelular cuando se estimula al CaSR. Este efecto migratorio se vio abatido cuando se inhibió la expresión de Rab27B con dos shRNAs distintos, indicándonos que la secreción de factores quimiotácticos mediada por el receptor sensor de calcio es orquestada por la GTPasa Rab27B. Con esta inhibición demostramos que la participación de Rab27B es esencial para la secreción de factores quimiotácticos relevantes en la migración de células endoteliales. Por otra parte, identificamos qué factores secretados al medio extracelular se ven afectados cuando se inhibe la expresión de la Rab27B; así logramos identificar citocinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 1 beta (IL-1 β). Estas citocinas son relevantes para distintos tipos de cáncer. En la literatura se ha reportado que los niveles elevados de estas citocinas están asociados a la progresión tumoral (Lederle et al., 2011; Liu et al., 2016; Tulotta and Ottewell, 2018). Por otra parte, nuestro grupo describió que la secreción de IL-6 se lleva a cabo de manera constitutiva y es regulada negativamente por activación del CaSR (Hernández-Bedolla et al., 2015). Esta regulación negativa de la secreción de IL-6 podría deberse a que el CaSR al ser activado induce una vía de inhibición transcripcional sobre IL-6 (Hernández-Bedolla et al., 2016), con lo cual a pesar de que el CaSR aumenta la expresión de Rab27B esta ya no podría llevar a secretar a IL-6 debido a la poca disponibilidad de esta citocina dentro de la célula. Por otro lado, se ha demostrado que IL-6 promueve la progresión de un tumor benigno a un metastásico en un modelo de cáncer de piel, esto mediante la estimulación de la proliferación y migración de células HaCaT-ras A-5. Por otra parte, IL-6 induce una red de citocinas proinflamatorias, entre las cuales se encuentra IL-8 así como algunos factores angiogénicos, lo que conduce a la malignidad y crecimiento tumoral en modelos in vivo. De esta manera IL-6 y su red de citocinas actúan de manera autocrina sobre las células tumorales y son capaces de estimular el propio tumor sosteniendo el estroma inflamatorio y angiogénico (Lederle et al., 2011). Por otra parte, también se ha descrito que al inhibir IL-6 en medios condicionados de células troncales mesénquimales con un anticuerpo neutralizante, la migración de células de cáncer de mama MCF-7 se ve abatida drásticamente en comparación con los medios condicionados donde no se inhibió a IL-6 (Gallo et al., 2012). Por otro lado, IL-8 tiene un papel en la progresión de tumores,

participando de manera autocrina o paracrina. IL-8 tiene múltiples efectos sobre las células tumorales, incluida la proliferación, la invasión y la migración, todos estos procesos son esenciales para el crecimiento del tumor y la metástasis. Además de estos efectos, se sabe que la IL-8 derivada de células de cáncer de mama coopera con factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para establecer y expandir la neovasculatura del tumor y también activa metaloproteinasas (MMP) que están relacionadas con la metástasis. Por otra parte, es importante notar que IL-8 es casi indetectable en estados fisiológicos; sin embargo, su inducción es orquestada por citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β), la cual puede aumentar la metástasis del cáncer de mama (Liu et al., 2016). Por su parte, IL-1 β es abundante en los tejidos tumorales y promueve crecimiento tumoral, invasión y carcinogénesis. La sobreexpresión de IL-1 β en células de estómago induce inflamación gástrica y cáncer, resultados que identifican a la IL-1 β como un componente esencial para mediar la progresión tumoral asociada a inflamación. En algunos estudios se ha identificado a IL-1 β como un potencial biomarcador para predecir cuáles pacientes con cáncer de mama tienen un mayor riesgo de desarrollar metástasis debido a que promueve la producción de metaloproteinasas como MMP-9 y la invasión celular en células de cáncer de mama MCF-7 (Mon et al., 2017; Tulotta and Ottewell, 2018). Tomando juntos estos datos podemos concluir que la participación de estas citocinas proinflamatorias en los eventos migratorios observados en nuestro modelo experimental es de vital importancia y que estas a su vez podrían estar induciendo la migración de manera sinérgica y no estar actuando como entes únicos en el medio extracelular debido a que su inducción en algunos modelos experimentales es codependiente de la expresión de una u otra. Sin embargo, falta realizar las pruebas experimentales necesarias para comprobar esta hipótesis.

Por otra parte, la activación de las GTPasas es de suma importancia para que lleven a cabo su función biológica de manera correcta. Por ello, en este trabajo nos interesamos en estudiar cómo se podría estar activando Rab27B y si el receptor sensor de calcio estaría participando en este evento, ya que a la fecha, sólo se ha demostrado que el receptor para la angiotensina II promueve la unión de GTP a Rab5a, una GTPasa de la vía endocítica (Seachrist et al., 2002). Este estudio mostró por primera vez que un GPCR puede controlar la actividad de una proteína Rab por una interacción directa entre el receptor y la GTPasa. Sin embargo, aún no

se sabe si algún GPCR tiene la capacidad de activar a una Rab GTPasa involucrada en secreción. En nuestros resultados encontramos que el receptor sensor de calcio estaría llevando a la activación de Rab27B en un tiempo de 15 minutos y, mediante la inhibición del CaSR con dos moduladores negativos, comprobamos que participa en la activación de Rab27B, ya que no logramos capturar Rab27B en estado GTP (Rab27B-GTP o Rab27B activa). Consideramos que nuestros resultados son de gran relevancia ya que observamos por primera vez que una GTPasa secretoria está siendo activada por un receptor de membrana, en este caso por el CaSR, un GPCR involucrado en la secreción de citocinas y péptidos relacionados a la progresión tumoral (Hernández-Bedolla et al., 2015; Kozlow and Guise, 2005; Mamillapalli et al., 2008).

Es de relevancia señalar que la señalización desencadenada por la activación del receptor sensor de calcio es importante para los procesos secretorios. Así, hemos demostrado que los medios condicionados de células MDA-MB-231 pierden su capacidad quimiotrayente hacia células endoteliales al inhibir vías de señalización como PI3K/AKT y mTORC1 (Hernández-Bedolla et al., 2015). Estos datos refuerzan nuestros datos experimentales, ya que la activación de Rab27B dependiente del CaSR ya no se lleva a cabo al inhibir las vías de PI3K y mTORC1 con Wormanina y Rapamicina. A este respecto se ha descrito que AKT puede fosforilar al GEF-MADD para Rab27B (Li et al., 2010), lo cual apoyaría nuestras pruebas experimentales de inhibición de AKT con wormanina, ya que al inhibir esta vía de señalización el GEF podría no estar activándose y por consiguiente la GTPasa-Rab27B ya no podría ser activada. Por otra parte, el CaSR regula la secreción de IL-6 a través de la vía de señalización de PKA por la activación de la proteína Gs (Hernández-Bedolla et al., 2015, 2016). Coincidentemente con los hallazgos antes mencionados, encontramos que al inducir la vía de PKA con Forskolina, la activación de Rab27B se aumenta a niveles comparables inducidos por el estímulo de calcio. Por otro lado, al inhibir esta vía con el competidor PKI específico para secuestrar la unidad catalítica de PKA, la activación de Rab27B es abatida considerablemente en comparación a la activación inducida por el estímulo de calcio. Con respecto a esto, al analizar en la plataforma *scansite 4.0* las posibles cinasas que podrían fosforilar al GEF-MADD para posiblemente llevarlo a su activación, encontramos a la cinasa PKA que podría fosforilar a MADD en dos posibles sitios, este dato apoyaría nuestro hallazgo

de inhibición de PKA lo cual conlleva a una inhibición de la activación de Rab27B dependiente del CaSR, posiblemente la inhibición de PKA impediría que el GEF-MADD fuera fosforilado por esta cinasa y así evitar que sea activado y ya no podría llevar a la activación de la GTPasa-Rab27B. Todos estos datos nos llevarían a pensar que la participación de estas vías de señalización es relevante para la secreción de factores quimiotácticos debido a que la activación de Rab27B no se lleva a cabo cuando esta vía es inhibida.

Un evento interesante que observamos en nuestros experimentos de secreción fue un aumento en la expresión de Rab27B cuando se estimuló al CaSR con calcio. Por lo tanto, nos preguntamos si este efecto era dependiente de la participación del receptor sensor de calcio. Para esto hicimos una serie de experimentos en células MDA-MB-231 y observamos que la expresión de Rab27B se incrementa considerablemente al estimular el CaSR y con respecto al tiempo, manteniendo una expresión alta hasta las 48 horas de estudio. Por otra parte, para comprobar la participación del CaSR en el aumento de la expresión de Rab27B, lo que hicimos fue inhibir al receptor con el modulador negativo (NPS2143) y observamos que al inhibir la señalización de este receptor, la expresión de Rab27B disminuye considerablemente hasta niveles basales. Estos experimentos nos permitieron descubrir la participación del CaSR en la expresión de Rab27B a nivel de proteína; sin embargo, no estaba clara la participación del CaSR a nivel transcripcional. Por ello, inhibimos tanto la transcripción como la traducción y encontramos que el efecto del estímulo de calcio sobre la expresión de Rab27B ya no se observa, lo que nos llevaría a pensar que la señalización del CaSR enciende una vía de señalización transcripcional vital para la expresión de Rab27B. Este hecho sugiere que posiblemente el receptor activa algún factor de transcripción que pudieran estar induciendo la expresión del gen de Rab27B. Al respecto, se ha descrito que la expresión de Rab27A es regulada por el factor de transcripción IRF-1 en hepatocitos (Yang et al., 2018). Por otro lado, Egusquiza-Alvarez C. en su tesis de maestría realizó un análisis bioinformático donde encontró que existen 14 posibles factores de transcripción que tentativamente podrían unirse a la región promotora del gen que codifica Rab27B; dentro de estos factores se encontró a IRF-2 (Factor regulatorio de Interferones -2). Interesantemente, se ha descrito que el IRF-2 está asociado con la tumorigénesis mediante la activación de

transcripción de genes que participan en la oncogénesis (Mei et al., 2017); además, se ha visto que puede ser activado por fosforilaciones en residuos de serina a través de la cinasa PKA (Schwartz et al., 2011). Estos datos en conjunto nos llevarían a pensar que la vía de señalización de PKA desencadenada por el CaSR, además de estar participando en la activación de Rab27B, también estaría participando en el aumento de la expresión de Rab27B. Por otro lado, esta alteración en la expresión es relevante en cáncer ya que se ha reportado que la sobreexpresión de Rab27B es un indicador de mal pronóstico para pacientes con cáncer de mama, así como al aumento de la metástasis a nódulos linfáticos, sugiriendo que Rab27B promueve el cáncer metastásico (Hendrix et al., 2010; Ostenfeld et al., 2014; Zhang et al., 2012). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se regula la sobreexpresión de Rab27B; en este sentido, se ha descrito que los niveles de expresión de varias Rabs son controlados por microARNs (Krishnan et al., 2020). La desregulación de miR-9 en cáncer gástrico lleva al aumento de la expresión de Rab34 (Krishnan et al., 2020). Por otra parte, la expresión de Rab27A es regulada por miR-124a en células secretoras de insulina (Li et al., 2017). Esta regulación por microARNs es relevante debido a que se ha descrito que estos pueden ser secretados via exosomas al medio extracelular, por ejemplo, se ha descrito que Rab27B y Rab27A promueven la actividad oncogénica aumentando la secreción de exosomas (Bobrie et al., 2012). Este aumento en la secreción de exosomas regula el microambiente tumoral y disminuye la cantidad de microARNs intracelulares, y esta disminución juega un papel importante en la progresión tumoral ya que se ha descrito que algunos microARNs como miR23b y miR921 promueven el crecimiento de células cancerosas y metastásicas (Krishnan et al., 2020). Por otra parte, otro estudio realizado en células de melanoma reporta que el aumento en la expresión de ARNm para Rab27A se debe a una amplificación por número de copias (Bobrie et al., 2012; Li et al., 2018; Ostenfeld et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se lleva a la sobreexpresión de las Rabs aún es desconocido. Tomando en cuenta los datos mencionados, podríamos hipotetizar que la sobreexpresión de Rab27B mediada por el receptor sensor de calcio podría deberse a un conjunto de mecanismo integrados para un mismo fin, el cual es llevar a una célula tumoral a la sobrevivencia y a la proliferación descontrolada para invadir nuevos tejidos, esto mediante el aumento de su expresión posteriormente a su activación para poder llevar a cabo su función secretora, en este caso llevando a secretar citocinas como IL-6, IL-8 e IL-1 β

involucradas en la progresión tumoral, todos estos eventos orquestados por la activación y la señalización del receptor sensor de calcio (CaSR).

Es importante señalar que en algunas de nuestras pruebas experimentales usamos tiempos de estímulo de calcio prolongados. Por lo tanto, es vital mencionar que el CaSR es un receptor que puede señalizar de manera continua en la presencia crónica de su agonista, a pesar de la presencia constante del agonista, el CaSR se somete a una desensibilización funcional muy débil por lo que continúa respondiendo, mientras haya un suministro constante y elevado de calcio (Breitwieser, 2013). Esta resistencia a la desensibilización es importante para mantener los niveles de receptor en la membrana plasmática (Ray, 2015). Respecto a esto, se ha descrito que la señalización del CaSR promueve el tráfico del receptor recién sintetizado a la membrana plasmática, este fenómeno se ha denominado como señalización insercional dirigida por agonista (ADIS). Sin embargo, el mecanismo de señalización y que proteínas están involucradas en el mantenimiento de este fenómeno aun es desconocido (Ray, 2015). Por otra parte, se sabe que durante la desensibilización, el CaSR necesita ser fosforilado por PKC para que β -arrestina pueda unirse y dar paso a la internalización (Ray, 2015). También, se ha descrito que el CaSR puede tener una internalización constitutiva regulada por Rab11A (Reyes-Ibarra et al., 2007). Estos mecanismos de internalización y regulación son importantes para controlar la señalización y regular de manera eficiente la expresión del CaSR en la superficie celular. Importantemente estos eventos de internalización son de gran relevancia para la secreción de factores, ya que se ha visto que el tráfico del CaSR a través de Rab11A regula la secreción PTHrP (Reyes-Ibarra et al., 2007). Esta observación es relevante para nuestro trabajo ya que en datos aún no publicados de nuestro laboratorio se ha observado que al inhibir la expresión de Rab11A ya no se lleva a cabo la activación de Rab27B, esto implicaría que la activación de Rab27B pudiera estar llevándose en cascada a través de Rab11A, también en nuestro laboratorio se ha demostrado que el GEF-MADD interacciona con Rab11A-GTP con lo cual hipotetizamos que MADD es un efector de Rab11A y un GEF para Rab27B. Por otro lado, el proceso de internalización nos permite explicar nuestros experimentos de activación de Rab27B ya que observamos que a 30 minutos de estímulo se disminuye la activación de Rab27b. Esto posiblemente debido a que a los 30 minutos de estímulo el receptor se encuentra internalizado (Reyes-Ibarra et al.,

2007). Esta observación significaría que se necesita la presencia del receptor en membrana plasmática para poder llevar a cabo la activación de Rab27B. Por otro parte, se ha descrito que Rab1 regula la vía secretora temprana del CaSR y ayuda a mantener los niveles estables del CaSR en membrana plasmática (Zhuang et al., 2010). Además, se ha visto que el reciclamiento del CaSR es regulado por Rab11 (Reyes-Ibarra et al., 2007). Esta regulación por las Rabs, tanto de la vía secretora como de reciclamiento son vitales para mantener los niveles del CaSR en la superficie celular. Además de regular los mecanismos de secreción mediados por el receptor sensor de calcio.

Por último, nos preguntamos cual sería el efecto de la sobreexpresión de Rab secretorias en la línea celular MDA-MB-231. Para responder este cuestionamiento, transfectamos una serie de Rab secretorias, Rab27A, RAB27B y Rab3D, que contribuyen a la progresión tumoral participando en mecanismos relacionados a la secreción de exosomas, secreción de proteínas como HSP90, y la sobreexpresión de Rab3D promueve la migración de células no metastásicas MCF7 (Bobrie et al., 2012; Hendrix et al., 2010; Tzeng and Wang, 2016). Nuestros experimentos de migración en Cámara de Boyden donde usamos medios condicionados de células MDA-MB-231 transfectadas con estas Rabs secretorias, encontramos que solo la sobreexpresión de la Rabs conlleva a que los medios condicionados obtenidos de las células transfectadas con estas proteínas tengan un poder quimioatrayente comparable a la condición donde sólo se transfectó el vector y se estimuló al CaSR. Por otra parte, nos preguntamos que factores quimiotácticos se estarían secretando dentro del medio condicionado cuando se sobreexpresa a Rab27B, y encontramos que la sobreexpresión de Rab27B conlleva a un aumento significativo de los niveles de IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, IP-10 y RANTES. Es importante señalar que la secreción de IL-6 se lleva a cabo de manera constitutiva y es regulada negativamente por la activación del CaSR (Hernández-Bedolla et al., 2015). Esta regulación negativa de la secreción de IL-6 posiblemente se deba a que el CaSR tras ser activado induzca una vía inhibitoria sobre la transcripción de IL-6 (Hernández-Bedolla et al., 2016), con lo cual a pesar de que el CaSR aumenta la expresión de Rab27B ya no llevaría a secretar IL-6 debido a la poca disponibilidad de esta citocina dentro de la célula. Estos datos por un lado apoyarían nuestras observaciones experimentales donde sobreexpresamos a Rab27B, debido a que cuando aumentamos la expresión de esta GTPasa

se aumenta la secreción constitutiva de IL-6 y por otro lado cuando se inhibe la expresión de Rab27B también se abate la secreción constitutiva de IL-6. Por otro lado, cuando estimulamos a las células en donde se sobreexpreso Rab27B no observamos un efecto mayor comparado a la condición donde solo se transfectó al vector, esto posiblemente se deba a que la sobreexpresión de Rab27B llevaría al máximo de secreción y el estímulo del receptor ya no aumentaría la cantidad de factores secretados. Por otro lado, es interesante que la secreción tanto de IL-6 como de RANTES se ve aumentada ya que se ha descrito que la expresión simultánea de estos dos péptidos conlleva a un fenotipo más agresivo por parte de las células de cáncer de mama (Gallo et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo ayudan a incrementar nuestro entendimiento sobre la progresión tumoral y abren la posibilidad de usar a Rab27B como un potencial marcador de progresión tumoral.

CONCLUSIONES

1. La secreción de citocinas como IL-6, IL-8 e IL-1 β , promovida por activación del CaSR es regulada a través de la GTPasa Rab27B.
2. El CaSR regula la expresión de Rab27B.
3. La activación de Rab27B está regulada por las vías de señalización de PI3K, mTORC1 y PKA desencadenadas por la activación del CaSR.
4. El GEF MADD regula la activación de Rab27B por activación del CaSR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal, A., Schulz, H., Manhardt, T., Bilban, M., Thakker, R. V., and Kallay, E. (2017). Expression profiling of colorectal cancer cells reveals inhibition of DNA replication licensing by extracellular calcium. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1864*, 987–996.
2. Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 401–410.
3. Bhui, T., and Roy, J.K. (2014). Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp. Cell Res.* *328*, 1–19.
4. Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* *72*, 4920–4930.
5. Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* *18*, 1723–1729.
6. Bouvier, M. (2013). Unraveling the structural basis of GPCR activation and inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 539–541.
7. Bravo-Cordero, J.J., Marrero-Diaz, R., Megías, D., Genís, L., García-Grande, A., García, M.A., Arroyo, A.G., and Montoya, M.C. (2007). MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J.* *26*, 1499–1510.
8. Breitwieser, G.E. (2013). The calcium sensing receptor life cycle: Trafficking, cell surface expression, and degradation. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *27*, 303–313.
9. Brennan, S.C., Thiem, U., Roth, S., Aggarwal, A., Fetahu, I.S., Tennakoon, S., Gomes, A.R., Brandi, M.L., Bruggeman, F., Mentaverri, R., et al. (2013). Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.*

Cell Res. 1833, 1732–1744.

10. Brown, E.M. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 333–343.
11. Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, a, Hediger, M. a, Lytton, J., and Hebert, S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575–580.
12. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–660.
13. Chattopadhyay, N. (2006). Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E761–E770.
14. Cheng, K.W., Lahad, J.P., Kuo, W.-L., Lapuk, A., Yamada, K., Auersperg, N., Liu, J., Smith-McCune, K., Lu, K.H., Fishman, D., et al. (2004). The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat. Med.* 10, 1251–1256.
15. Chirgwin, J.M., Mohammad, K.S., and Guise, T.A. (2004). Tumor-bone cellular interactions in skeletal metastases. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 4, 308–318.
16. Conigrave, A.D., and Ward, D.T. (2013). Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 315–331.
17. Das, S., Clézardin, P., Kamel, S., Brazier, M., and Mentaverri, R. (2020). The CaSR in Pathogenesis of Breast Cancer: A New Target for Early Stage Bone Metastases. *Front. Oncol.* 10, 1–12.
18. Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94.
19. Endres, D.B. (2012). Investigation of hypercalcemia. *Clin. Biochem.* 45, 954–963.
20. Fan, Q.R., Guo, W.Y., Geng, Y., and Evelyn, M.G. (2017). G-Protein-Coupled Receptor Dimers. *G-Protein-Coupled Recept. Dimers.*
21. Farnsworth, R.H., Lackmann, M., Achen, M.G., and Stacker, S. a (2014). Vascular remodeling in cancer. *Oncogene* 33, 3496–3505.
22. Feng, J., Petersen, C.D., Coy, D.H., Jiang, J.-K., Thomas, C.J., Pollak, M.R., and Wank, S.A. (2010). Calcium-sensing receptor is a physiologic multimodal

- chemosensor regulating gastric G-cell growth and gastrin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17791–17796.
23. Fukuda, M. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway: Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2801–2813.
 24. Fukuda, M. (2013). Rab27 Effectors, Pleiotropic Regulators in Secretory Pathways. *Traffic* *14*, 949–963.
 25. Gacche, R.N. (2015). Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. *Oncogenesis* *4*, e153.
 26. Gallo, L.I., Liao, Y., Ruiz, W.G., Clayton, D.R., Li, M., Liu, Y.-J., Jiang, Y., Fukuda, M., Apodaca, G., and Yin, X.-M. (2014). TBC1D9B functions as a GTPase-activating protein for Rab11a in polarized MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* *25*, 3779–3797.
 27. Gallo, M., De Luca, A., Lamura, L., and Normanno, N. (2012). Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: Implications for adjuvant therapy of breast cancer. *Ann. Oncol.* *23*, 597–604.
 28. Gallo, M., Frezzetti, D., Roma, C., Chicchinelli, N., Barbieri, A., Arra, C., Scognamiglio, G., Botti, G., De Luca, A., and Normanno, N. (2018). RANTES and IL-6 cooperate in inducing a more aggressive phenotype in breast cancer cells. *Oncotarget* *9*, 17543–17553.
 29. Gao, Y., Robertson, M.J., Rahman, S.N., Seven, A.B., Zhang, C., Meyerowitz, J.G., Panova, O., Hannan, F.M., Thakker, R. V., Bräuner-Osborne, H., et al. (2021). Asymmetric activation of the calcium-sensing receptor homodimer. *Nature* *595*, 455–459.
 30. Geng, D., Zhao, W., Feng, Y., and Liu, J. (2016a). Overexpression of Rab5a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion via FAK signaling pathway. *Tumor Biol.* *37*, 3341–3347.
 31. Geng, Y., Mosyak, L., Kurinov, I., Zuo, H., Sturchler, E., Cheng, T.C., Subramanyam, P., Brown, A.P., Brennan, S.C., Mun, H.C., et al. (2016b). Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *Elife* *5*, 1–25.
 32. George, S.R., O’Dowd, B.F., and Lee, S.P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 808–820.

33. Guadagno, N.A., and Progida, C. (2019). Rab GTPases: Switching to Human Diseases. *Cells* 8, 909.
34. Guise, T.A., Kozlow, W.M., Heras-Herzig, A., Padalecki, S.S., Yin, J.J., and Chirgwin, J.M. (2005). Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin. Breast Cancer* 5 *Suppl*, S46–S53.
35. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
36. Handley, M.T.W., Haynes, L.P., and Burgoyne, R.D. (2007). Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *J. Cell Sci.* 120, 973–984.
37. Hannan, F.M., and Thakker, R. V. (2013). Calcium-sensing receptor (CaSR) mutations and disorders of calcium, electrolyte and water metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 359–371.
38. Hannan, F.M., Kallay, E., Chang, W., Brandi, M.L., and Thakker, R. V. (2018). The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 33–51.
39. Hendrix, A., Maynard, D., Pauwels, P., Braems, G., Denys, H., Van Den Broecke, R., Lambert, J., Van Belle, S., Cocquyt, V., Gespach, C., et al. (2010). Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 866–880.
40. Hernández-Bedolla, M.A., Carretero-Ortega, J., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2015). Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 166–182.
41. Hernández-Bedolla, M.A., González-Domínguez, E., Zavala-Barrera, C., Gutiérrez-López, T.Y., Hidalgo-Moyle, J.J., Vázquez-Prado, J., Sánchez-Torres, C., and Reyes-Cruz, G. (2016). Calcium-sensing-receptor (CaSR) controls IL-6 secretion in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells by a dual mechanism revealed by agonist and inverse-agonist modulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 436, 159–168.
42. Hofer, A.M., and Brown, E.M. (2003). Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 530–538.

43. Hou, Y., Chen, X., Tolmachova, T., Ernst, S.A., and Williams, J.A. (2013). EPI64B Acts as a GTPase-activating protein for Rab27B in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 288, 19548–19557.
44. Hu, J., and Spiegel, A.M. (2007). Structure and function of the human calcium-sensing receptor: Insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators: Ca²⁺-Sensing Receptor Review Series. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 908–922.
45. Huang, Y., Zhou, Y., Castiblanco, A., Yang, W., Brown, E.M., and Yang, J.J. (2009). Multiple Ca(2+)-binding sites in the extracellular domain of the Ca(2+)-sensing receptor corresponding to cooperative Ca(2+) response. *Biochemistry* 48, 388–398.
46. Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119–149.
47. Iiri, T., Farfel, Z., and Bourne, H.R. (1998). G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394, 35–38.
48. Jones, T.L., Simonds, W.F., Merendino, J.J., Brann, M.R., and Spiegel, a M. (1990). Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein alpha subunit is essential for its membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 568–572.
49. Käkönen, S.-M., Selander, K.S., Chirgwin, J.M., Yin, J.J., Burns, S., Rankin, W.A., Grubbs, B.G., Dallas, M., Cui, Y., and Guise, T.A. (2002). Transforming Growth Factor- β Stimulates Parathyroid Hormone-related Protein and Osteolytic Metastases via Smad and Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 24571–24578.
50. Karar, J., and Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1–8.
51. Kelly, E.E., Horgan, C.P., and McCaffrey, M.W. (2012). Rab11 proteins in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1360–1367.
52. Kostenis, E., Pfeil, E.M., and Annala, S. (2020). Heterotrimeric Gq proteins as therapeutic targets? *J. Biol. Chem.* 295, 5206–5215.
53. Kozlow, W., and Guise, T.A. (2005). Breast cancer metastasis to bone: Mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 169–180.
54. Krishnan, P.D.G., Golden, E., Woodward, E.A., Pavlos, N.J., and Blancafort, P.

- (2020). Rab gtpases: Emerging oncogenes and tumor suppressive regulators for the editing of survival pathways in cancer. *Cancers (Basel)*. *12*.
55. Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: Novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 47–60.
56. Latorraca, N.R., Venkatakrisnan, A.J., and Dror, R.O. (2017). GPCR dynamics: Structures in motion. *Chem. Rev.* *117*, 139–155.
57. Lederle, W., Depner, S., Schnur, S., Obermueller, E., Catone, N., Just, A., Fusenig, N.E., and Mueller, M.M. (2011). IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *Int. J. Cancer* *128*, 2803–2814.
58. Leioatts, N., Suresh, P., Romo, T.D., and Grossfield, A. (2014). Structure-based simulations reveal concerted dynamics of GPCR activation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *82*, 2538–2551.
59. Levivier, E., Goud, B., Souchet, M., Calmels, T.P.G., Mornon, J.P., and Callebaut, I. (2001). uDENN, DENN, and dDENN: Indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 688–695.
60. Li, J., Jin, Q., Huang, F., Tang, Z., and Huang, J. (2017). Effects of Rab27A and Rab27B on Invasion, Proliferation, Apoptosis, and Chemoresistance in Human Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* *46*, 1173–1179.
61. Li, P., Jayarama, S., Ganesh, L., Mordi, D., Carr, R., Kanteti, P., Hay, N., and Prabhakar, B.S. (2010). Akt-phosphorylated mitogen-activated kinase-activating death domain protein (MADD) inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking Fas-associated death domain (FADD) association with death receptor 4. *J. Biol. Chem.* *285*, 22713–22722.
62. Li, Z., Fang, R., Fang, J., He, S., and Liu, T. (2018). Functional implications of Rab27 GTPases in Cancer. *Cell Commun. Signal.* *16*, 4–11.
63. Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J.D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., and Wu, K. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *31*, 61–71.
64. Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* *77*, 1745–

1770.

65. MacLeod, R.J. (2013). CaSR function in the intestine: Hormone secretion, electrolyte absorption and secretion, paracrine non-canonical Wnt signaling and colonic crypt cell proliferation. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 385–402.
66. Mamillapalli, R., VanHouten, J., Zawalich, W., and Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J. Biol. Chem.* 283, 24435–24447.
67. Manglik, A., and Kruse, A.C. (2017). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry* 56, 5628–5634.
68. Mei, Z., Wang, G., Liang, Z., Cui, A., Xu, A., Liu, Y., Liu, C., Yang, Y., and Cui, L. (2017). Prognostic value of IRF-2 expression in colorectal cancer. *Oncotarget* 8, 38969–38977.
69. Mon, N.N., Senga, T., and Ito, S. (2017). Interleukin-1 β activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Lett.* 13, 955–960.
70. Moreira, I.S. (2014). Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 16–33.
71. Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A.R., and Blancafort, P. (2018). Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur. J. Cancer* 93, 10–18.
72. Neer, E.J. (1994). G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* 3, 3–14.
73. Nieto Gutierrez, A., and McDonald, P.H. (2018). GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cell. Signal.* 41, 65–74.
74. O'Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E.W., Handel, T.M., Seshagiri, S., and Gutkind, J.S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 412–424.
75. Ostenfeld, M.S., Jeppesen, D.K., Laurberg, J.R., Boysen, A.T., Bramsen, J.B., Primdal-Bengtson, B., Hendrix, A., Lamy, P., Dagnaes-Hansen, F., Rasmussen, M.H., et al. (2014). Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res.* 74, 5758–5771.

76. Pacheco, I.I., and MacLeod, R.J. (2008). CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *295*, 748–759.
77. Pavlos, N.J., Xu, J., Riedel, D., Yeoh, J.S.G., Teitelbaum, S.L., Papadimitriou, J.M., Jahn, R., Ross, F.P., and Zheng, M.H. (2005). Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5253–5269.
78. Pereira-Leal, J.B., and Seabra, M.C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: Definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* *301*, 1077–1087.
79. Petrel, C., Kessler, A., Dauban, P., Dodd, R.H., Rognan, D., and Ruat, M. (2004). Positive and Negative Allosteric Modulators of the Ca²⁺-sensing Receptor Interact within Overlapping but Not Identical Binding Sites in the Transmembrane Domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 18990–18997.
80. Pfeffer, S.R. (2017). Rab GTPases: Master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* *28*, 712–715.
81. Polverini, P.J. (2002). Angiogenesis in Health and Disease: Therapeutic Opportunities. *J. Dent. Educ.* *66*, 653–660.
82. Ray, K. (2015). Calcium-sensing receptor: Trafficking, endocytosis, recycling, and importance of interacting proteins (Elsevier Inc.).
83. Reyes-Ibarra, A.P., García-Regalado, A., Ramírez-Rangel, I., Esparza-Silva, A.L., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2007). Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSH-sensitive mechanism. *Mol. Endocrinol.* *21*, 1394–1407.
84. Saidak, Z., Mentaverri, R., and Brown, E.M. (2009). The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr. Rev.* *30*, 178–195.
85. Schwartz, J.L., Shajahan, A.N., and Clarke, R. (2011). The Role of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF1) in Overcoming Antiestrogen Resistance in the Treatment of Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer* *2011*, 1–9.
86. Seachrist, J.L., Laporte, S.A., Dale, L.B., Babwah, A. V., Caron, M.G., Anborgh,

- P.H., and Ferguson, S.S.G. (2002). Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J. Biol. Chem.* 277, 679–685.
87. Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.
88. Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., and Huang, X.Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* 428, 3850–3868.
89. Tsvetanova, N.G., Irannejad, R., and von Zastrow, M. (2015). GPCR signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J. Biol. Chem.* jbc.R114.617951.
90. Tulotta, C., and Ottewill, P. (2018). The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocr. Relat. Cancer* 25, R421–R434.
91. Tzeng, H.T., and Wang, Y.C. (2016). Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J. Biomed. Sci.* 23, 1–7.
92. Vahe, C., Benomar, K., Espiard, S., Coppin, L., Jannin, A., Odou, M.F., and Vantyghem, M.C. (2017). Diseases associated with calcium-sensing receptor. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 1–9.
93. Vanhouten, J.N., and Wysolmerski, J.J. (2013). The calcium-sensing receptor in the breast. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 403–414.
94. Viallard, C., and Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 20, 409–426.
95. Wang, J.J., Lei, K.F., and Han, F. (2018). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 3855–3864.
96. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M.M., and Sexton, P.M. (2018). Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 638–653.
97. Yang, M.Q., Du, Q., Goswami, J., Varley, P.R., Chen, B., Wang, R.H., Morelli, A.E., Stolz, D.B., Billiar, T.R., Li, J., et al. (2018). Interferon regulatory factor 1–Rab27a regulated extracellular vesicles promote liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 67, 1056–1070.
98. Yoon, S.O., Shin, S., and Mercurio, A.M. (2005). Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the $\alpha 6\beta 4$

- integrin. *Cancer Res.* *65*, 2761–2769.
99. Zhang, D., Lu, C., and Ai, H. (2017). Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. *Mol. Med. Rep.* *16*, 4569–4576.
100. Zhang, J.X., Huang, X.X., Cai, M.B., Tong, Z.T., Chen, J.W., Qian, D., Liao, Y.J., Deng, H.X., Liao, D.Z., Huang, M.Y., et al. (2012). Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis. *J. Transl. Med.* *10*, 1–10.
101. Zhuang, X., Adipietro, K.A., Datta, S., Northup, J.K., and Ray, K. (2010). Rab1 small GTP-binding protein regulates cell surface trafficking of the human calcium-sensing receptor. *Endocrinology* *151*, 5114–5123.